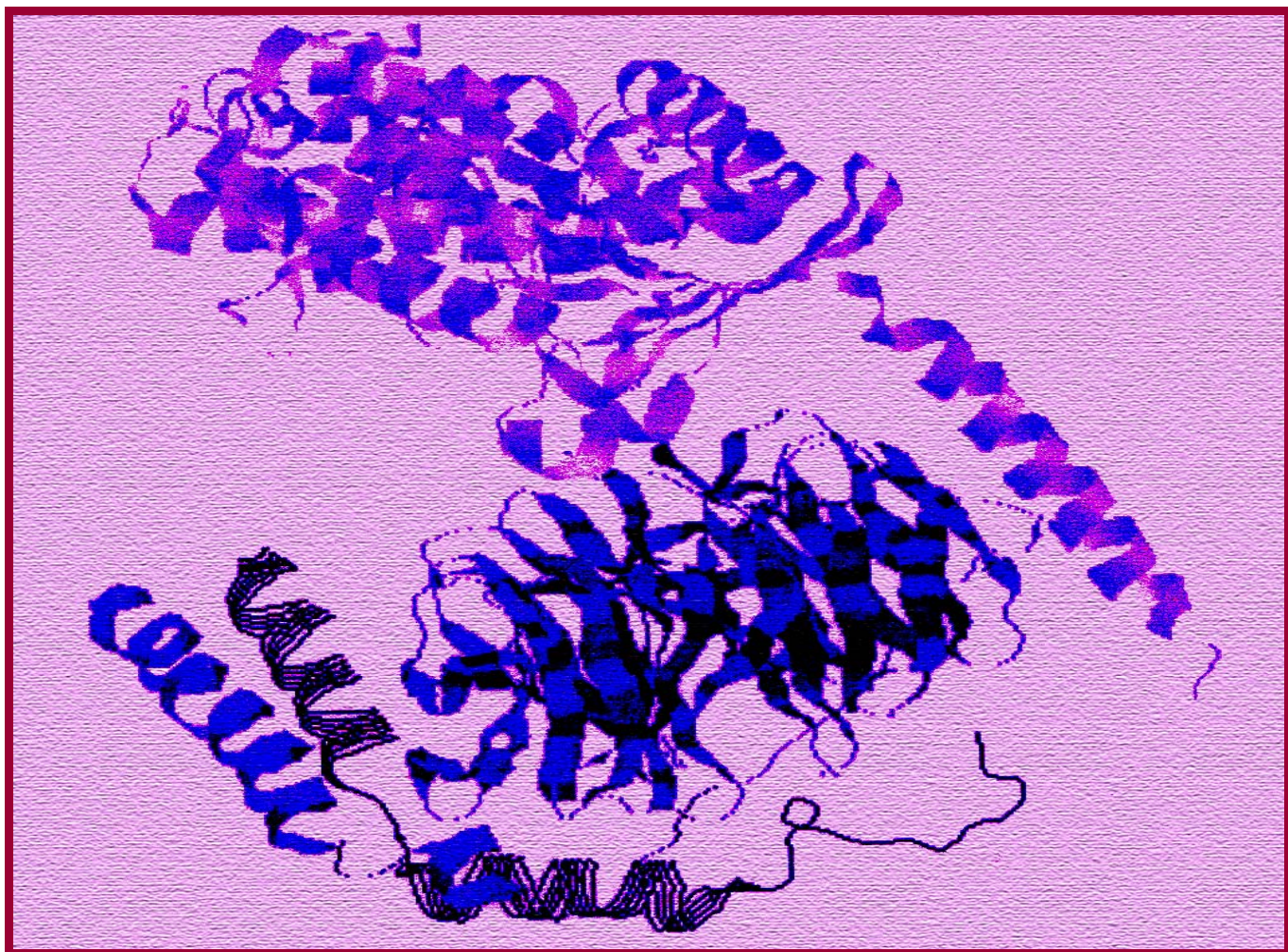




ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ.

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ.

***ΤΙΤΛΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ: ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΤΟΥ
ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ Gβ3 ΤΩΝ Gi ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ
ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΠΙΕΣΗ, ΤΟ
ΔΕΙΚΤΗ ΜΑΖΑΣ ΣΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΥΣ
ΔΕΙΚΤΕΣ.***



ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ: ΓΙΑΝΝΑΚΟΥΡΗΣ Ν. – ΛΕΚΤΟΡΑΣ

ΔΕΛΟΥΣΗΣ Γ. – ΛΕΚΤΟΡΑΣ

ΖΑΜΠΕΛΑΣ Α. – ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΔΕΛΟΥΣΗΣ Γ. – ΛΕΚΤΟΡΑΣ

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ: ΚΑΝΟΝΗ ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ Α.Μ. 9820

ΑΘΗΝΑ 2003

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.

Ευχαριστώ πολύ τον υπεύθυνο της πτυχιακής μου, κύριο Δεδούση Γιώργο, ο οποίος μου εμπιστεύθηκε την πραγματοποίηση αυτής της μελέτης και μου ενέπνευσε την αγάπη και την όρεξη για την έρευνα. Η συμβολή του στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας ήταν καθοριστική, καθώς αντιμετώπιζε με υπευθυνότητα και ενδιαφέρον τα προβλήματα που προέκυπταν. Το επιστημονικό του επίπεδο και η καλή του διάθεση σφράγισαν αυτή την συνεργασία, από την οποία αισθάνομαι ότι βγαίνω πραγματικά κερδισμένη.

Ευχαριστώ πολύ τον κύριο Παναγιωτάκο Δημοσθένη, βιοστατιστικό/επιδημιολόγο, για την πραγματοποίηση της στατιστικής ανάλυσης και την πολύτιμη βοήθειά του για την κατανόηση των αποτελεσμάτων. Επίσης, ευχαριστώ την ερευνητική ομάδα του Ιπποκρατείου νοσοκομείου και τον κύριο Πίτσαβο, που μου παραχώρησαν δείγματα και στοιχεία από την έρευνα "ΑΤΤΙΚΗ" για την πραγματοποίηση της πτυχιακής μου μελέτης.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ την Πρασά Μαργαρίτα και την Σώκαρη Σιμώνη, για την πολύτιμη βοήθειά τους στο εργαστήριο και τη διάθεσή τους να προσφέρουν όση βοήθεια μπορούσαν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	ΣΕΛ. 5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.	ΣΕΛ. 6
1.1 ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟΣ.	ΣΕΛ. 7
1.1.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑΣ ΝΟΣΟΥ.	ΣΕΛ. 7
1.1.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ.	ΣΕΛ. 12
1.1.3 Η ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗ LDL ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗ.	ΣΕΛ. 15
1.1.4 ΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗ.	ΣΕΛ. 16
1.2 ΥΠΕΡΤΑΣΗ.	ΣΕΛ. 17
1.2.1 ΡΥΘΜΙΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗΣ ΠΙΕΣΗΣ.	ΣΕΛ. 17
1.2.2 ΕΙΔΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ.	ΣΕΛ. 19
1.2.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ.	ΣΕΛ. 20
1.2.4 ΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΥΠΕΡΤΑΣΗ.	ΣΕΛ. 21
1.2.5 ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ.	ΣΕΛ. 22
1.2.6 ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ.	ΣΕΛ. 24
1.3 G ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ.	ΣΕΛ. 26
1.3.1 ΜΟΡΦΗ G ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.	ΣΕΛ. 26
1.3.2 Gβ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑ.	ΣΕΛ. 27
1.3.3 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ G ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.	ΣΕΛ. 27
1.3.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ-ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ G ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.	ΣΕΛ. 28
1.3.5 Gi ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ, ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ Na^+/H^+ ΚΑΙ ΥΠΕΡΤΑΣΗ.	ΣΕΛ. 29
1.4 ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ GNβ3.	ΣΕΛ. 31
1.4.1 ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ GNβ3.	ΣΕΛ. 31
1.4.2 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ C825T ΚΑΙ ΝΟΣΗΜΑΤΑ.	ΣΕΛ. 33
1.5 Η ΕΡΕΥΝΑ “ΑΤΤΙΚΗ”.	ΣΕΛ. 36

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.	ΣΕΛ. 37
2.1 ΣΚΟΠΟΣ.	ΣΕΛ. 38
2.2 ΔΕΙΓΜΑ.	ΣΕΛ. 38
2.3 ΣΥΛΛΟΓΗ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ.	ΣΕΛ. 38
2.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA.	ΣΕΛ. 40
2.5 ΑΛΥΣΙΑΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).	ΣΕΛ. 41
2.6 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΤΥΧΙΑΣ PCR.	ΣΕΛ. 44
2.7 ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΗ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗ.	ΣΕΛ. 45
2.8 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ ΤΗΣ ΠΕΨΗΣ.	ΣΕΛ. 48
2.9 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.	ΣΕΛ. 49
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.	ΣΕΛ. 51
3.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.	ΣΕΛ. 52
3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΑΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).	ΣΕΛ. 53
3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΨΗΣ.	ΣΕΛ. 54
3.4 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ ΣΤΟ ΔΕΙΓΜΑ.	ΣΕΛ. 56
3.5 ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ C825T ΜΕ ΤΗΝ ΗΛΙΚΙΑ, ΤΗΝ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΠΙΕΣΗ, ΤΟ ΔΕΙΚΤΗ ΜΑΖΑΣ ΣΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΥΣ ΔΕΙΚΤΕΣ.	ΣΕΛ. 58
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.	ΣΕΛ. 63
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.	ΣΕΛ. 68
6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.	ΣΕΛ. 74
A. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΓΟΝΙΔΙΟΥ – ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ.	ΣΕΛ. 75
B. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΓΙΑ PCR, ΠΕΨΗ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ.	ΣΕΛ. 79

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.

Η υπέρταση και η παχυσαρκία αποτελούν κύριους παράγοντες κινδύνου για τη στεφανιαία νόσο. Γονίδια που συμβάλλουν στα αυξημένα επίπεδα αρτηριακής πίεσης και στον αυξημένο δείκτη μάζας σώματος, μπορεί να εμπλέκονται στην αιτιολογία της ιδιοπαθούς υπέρτασης και στον αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα. Αρκετές μελέτες έχουν συσχετίσει τον πολυμορφισμό C825T του γονιδίου GNβ3, που κωδικοποιεί την β3 υπομονάδα των Gi πρωτεϊνών, με υπέρταση, παχυσαρκία και καρδιαγγειακή δυσλειτουργία.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η εξέταση της συσχέτισης του πολυμορφισμού C825T με τα επίπεδα αρτηριακής πίεσης, το δείκτη μάζας σώματος και με καρδιαγγειακούς δείκτες σε δείγμα 375 ατόμων (205 άντρες και 170 γυναίκες, ηλικίας 18-88 ετών) από την έρευνα "ΑΤΤΙΚΗ". Οι καρδιαγγειακοί δείκτες περιελάμβαναν αμυλοειδή, ομοκυστεΐνη, C αντιδρώσα πρωτεΐνη, ολική χοληστερόλη, γλυκόζη νηστείας, HDL χοληστερόλη, οξειδωμένη LDL χοληστερόλη, λιποπρωτεΐνη α, απολιποπρωτεΐνη B, απολιποπρωτεΐνη A1 και ινωδογόνο.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, η συχνότητα εμφάνισης του 825T αλληλόμορφου ήταν 64,27%. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού με την υπέρταση, αλλά ούτε και με το δείκτη μάζα σώματος. Από τους υπόλοιπους καρδιαγγειακούς δείκτες που ελέγχθηκαν, βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού με τα επίπεδα γλυκόζης, τα επίπεδα ομοκυστεΐνης και τα επίπεδα οξειδωμένης LDL χοληστερόλης. Συγκεκριμένα, βρέθηκε συσχέτιση με χαμηλά επίπεδα γλυκόζης (CC:107,42±42,8 n=36, έναντι CT:99,29±25,8 n=177, έναντι TT:95,06±23,15 n=131, p=0,048). Στατιστικά σημαντική ήταν η συσχέτιση του πολυμορφισμού με αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης (CC:10,58±2,3 n=24, έναντι CT:12,96±6,7 n=128, έναντι TT:10,97±3,9 n=79, p=0,019). Ακόμη, βρέθηκε συσχέτιση με μειωμένα επίπεδα οξειδωμένης LDL χοληστερόλης (CC:111,58±13,9 n=4, έναντι CT:64,9±26,5 n=19, έναντι TT:74,1±28,7 n=21, p=0,012).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεν επιβεβαιώνουν τη συσχέτιση του πολυμορφισμού C825T με την υπέρταση, αλλά ούτε και με τον δείκτη μάζας σώματος. Η συσχέτιση του πολυμορφισμού με τους καρδιαγγειακούς δείκτες θα πρέπει να επαληθευτεί και από άλλες έρευνες και να διευκρινιστεί ο μηχανισμός συμμετοχής του σε αυτούς.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.

1.1 ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟΣ.

Η στεφανιαία νόσος (CHD-coronary heart disease) είναι πρωταρχικό καρδιαγγειακό νόσημα και ένα από τα πιο συχνά χρόνια νοσήματα στις περισσότερες χώρες του ανεπτυγμένου κόσμου. Ενδεικτικά αναφέρεται, ότι στην Αμερική δεκατέσσερα εκατομμύρια άνθρωποι έχουν στεφανιαία νόσο στην οποία οφείλονται 250 χιλιάδες ξαφνικοί θάνατοι. Στην Ευρώπη, η στεφανιαία νόσος ευθύνεται για δύο εκατομμύρια θανάτους ετησίως σε ποσοστό 22% για τις γυναίκες και 21% για τους άντρες. Στην Ελλάδα, οι θάνατοι από στεφανιαία νόσο αποτελούν το 15% των συνολικών θανάτων και το 33% των θανάτων από όλα τα καρδιαγγειακά νοσήματα. (1).

Η στεφανιαία νόσος είναι αποτέλεσμα μειωμένης παροχής αίματος στο μυοκάρδιο, που προκαλείται από σοβαρής μορφής αθηροσκλήρυνση. Οι κλινικές εκδηλώσεις της στεφανιαίας νόσου περιλαμβάνουν το οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου, την ασταθή ή σταθερή στηθάγχη, τη συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια και τον αιφνίδιο θάνατο (2).

1.1.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑΣ ΝΟΣΟΥ.

Η πιθανότητα αναπτύξεως στεφανιαίας νόσου εξαρτάται από την παρουσία παραγόντων κινδύνου. Οι παράγοντες κινδύνου μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με το μηχανισμό δράσης τους, ως προς την ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου, σε τέσσερις κατηγορίες (3).

- (1) Αιτιώδεις παράγοντες κινδύνου (causal).
- (2) Υπό όρους παράγοντες κινδύνου (conditional).
- (3) Προδιαθεσικοί παράγοντες κινδύνου (predisposing).
- (4) Ύπαρξη αθηρωματικής πλάκας.

1. ΑΙΤΙΩΔΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ.

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν παράγοντες κινδύνου που έχουν αποδεδειγμένη αιτιώδη σχέση με την στεφανιαία νόσο και δρουν ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο στην ανάπτυξη της νόσου (3).

➤ ΚΑΠΝΙΣΜΑ.

Συμβάλλει στο σχηματισμό στεφανιαίας αθηρωματικής πλάκας και προδιαθέτει στην πρόωμη ρήξη της, με αποτέλεσμα στεφανιαία θρόμβωση. Το κάπνισμα θεωρείται κύρια αιτία περιφερικής αρτηριακής νόσου και σημαντικός παράγοντας κινδύνου για αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (3,4).

➤ ΥΠΕΡΤΑΣΗ.

Η υπέρταση θεωρείται παράγοντας κινδύνου για τη στεφανιαία νόσο, το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και τη συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια. Ως υπέρταση θεωρούνται τα επίπεδα συστολικής πίεσης μεγαλύτερα από 140 mm Hg και/ή τα επίπεδα διαστολικής πίεσης μεγαλύτερα από 90mm Hg ή η λήψη αντιυπερτασικής φαρμακευτικής αγωγής. Η υπέρταση συμβάλλει στην ανάπτυξη της στεφανιαίας νόσου προκαλώντας καταπόνηση του μυοκαρδίου και αγγειακό τραυματισμό (5).

➤ ΑΥΞΗΜΕΝΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΟΛΙΚΗΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ ΚΑΙ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΧΑΜΗΛΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ (LDL).

Τα αυξημένα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, αλλά και ιδιαίτερα τα αυξημένα επίπεδα LDL χοληστερόλης, αποτελούν κύριο παράγοντα κινδύνου για τη στεφανιαία νόσο, καθώς σχετίζονται με το σχηματισμό και την ανάπτυξη αθηρωματικής πλάκας. Σύμφωνα με τις τελευταίες οδηγίες από το NCEP (National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III) τα επιθυμητά επίπεδα ολικής χοληστερόλης αίματος είναι μικρότερα ή ίσα με 200mg/dl, ενώ για τις λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας τα επιθυμητά επίπεδα είναι μικρότερα ή ίσα με 100mg/dl (6). Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η ταξινόμηση των τιμών ολικής χοληστερόλης και LDL, με βάση τον οποίο συνεκτιμάται ο κίνδυνος για στεφανιαία νόσο με την παρουσία και άλλων παραγόντων κινδύνου και σχεδιάζεται η διατροφική και φαρμακευτική αγωγή.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ LDL-C ΚΑΙ TC (6).

LDL-C (mg/dl)	
<100	ΕΠΙΘΥΜΗΤΑ
100-129	ΛΙΓΟ ΑΝΩ ΤΩΝ ΕΠΙΘΥΜΗΤΩΝ
130-159	ΟΡΙΑΚΑ ΥΨΗΛΑ
160-189	ΥΨΗΛΑ
≥190	ΠΟΛΥ ΥΨΗΛΑ
ΟΛΙΚΗ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ (mg/dl)	
<200	ΕΠΙΘΥΜΗΤΑ
200-239	ΟΡΙΑΚΑ ΥΨΗΛΑ
≥240	ΥΨΗΛΑ

➤ **ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΚΑΙ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑ.**

Η παρουσία διαβήτη 1 ή 2 θεωρείται σημαντικός και ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου. Η τελευταία αναφορά από το NCEP (ATP III) εκτιμά το διαβήτη ως ισοδύναμο της εκδήλωσης στεφανιαίας νόσου (6). Παράλληλα, η επίμονη υπεργλυκαιμία με τιμές γλυκόζης νηστείας μεγαλύτερες από 110 mg/dl θεωρείται παράγοντας κινδύνου.

➤ **ΜΕΙΩΜΕΝΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΥΨΗΛΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ (HDL-C).**

Τα μειωμένα επίπεδα HDL θεωρούνται αθηρογενετικά εξαιτίας της σχέσης τους με το μεταβολικό σύνδρομο, την ινσουλινοαντοχή, την υπερτριγλυκεριδαιμία και την παχυσαρκία (7). Τα επιθυμητά επίπεδα HDL-C είναι μεγαλύτερα από 40 mg/dl (6).

➤ **ΗΛΙΚΙΑ**

Ο κίνδυνος εμφάνισης στεφανιαίας νόσου αυξάνει με την ηλικία και για τα δύο φύλλα ως αποτέλεσμα προοδευτικού σχηματισμού στεφανιαίας αθηροσκλήρυνσης. Η ηλικία άνω των 45 ετών για τους άντρες και άνω των 55 ετών για τις γυναίκες θεωρείται αιτιώδης παράγοντας κινδύνου για τη στεφανιαία νόσο (6).

2. ΥΠΟ ΟΡΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ.

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν παράγοντες που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για στεφανιαία νόσο, χωρίς όμως να έχει διευκρινιστεί αν η σχέση τους με τη νόσο είναι αιτιώδης (3).

➤ **ΑΥΞΗΜΕΝΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΩΝ.**

➤ **ΑΥΞΗΜΕΝΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ α , Lp(a).**

➤ **ΑΥΞΗΜΕΝΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΟΜΟΚΥΣΤΕΪΝΗΣ.**

➤ **ΑΥΞΗΜΕΝΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΜΙΚΡΩΝ ΚΑΙ ΠΥΚΝΩΝ ΜΟΡΙΩΝ LDL.**

➤ **ΑΥΞΗΜΕΝΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΗΞΗΣ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ (ινωδογόνο, πλασμινογόνο).**

3. ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ.

➤ **ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ.**

Η παχυσαρκία ορίζεται ως τιμές δείκτη μάζας σώματος (BMI) μεγαλύτερες από 30 kg/m². Έχει βρεθεί θετική συσχέτιση του δείκτη μάζας σώματος με τη στεφανιαία νόσο, δηλαδή η αύξηση του

Δ.Μ.Σ. πάνω από το φυσιολογικό (25 kg/m^2) συνεπάγεται αύξηση του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου. Η συσχέτιση αυτή πιθανόν να οφείλεται στην αυξημένη αρτηριακή πίεση, στη δυσλιπιδαιμία και στην προδιάθεση για διαβήτη που συνοδεύουν την παχυσαρκία. Η κεντρικού τύπου παχυσαρκία (περιφέρεια μέσης μεγαλύτερη από 102cm για τους άντρες και 88cm για τις γυναίκες) θεωρείται πως επηρεάζει το λιπιδαιμικό προφίλ και την ανοχή στη γλυκόζη και συνεπώς θεωρείται σημαντικός παράγοντας κινδύνου για τη στεφανιαία νόσο (8).

➤ ΜΕΙΩΜΕΝΗ ΦΥΣΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ.

Η καθιστική ζωή και η έλλειψη φυσικής δραστηριότητας θεωρούνται σημαντικοί παράγοντες κινδύνου για τη στεφανιαία νόσο. Η φυσική δραστηριότητα φαίνεται ότι καθυστερεί την αθηρογένεση, αυξάνει την αιμάτωση του μυοκαρδίου και την ινωδογονόλυση, συμβάλλει στην διατήρηση υγιούς σωματικού βάρους, μειώνει την αρτηριακή πίεση και βελτιώνει την ανοχή στη γλυκόζη και την ινσουλινοαντοχή (8).

➤ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΠΡΩΙΜΗΣ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑΣ ΝΟΣΟΥ.

Το οικογενειακό ιστορικό καρδιακής προσβολής ή ξαφνικού θανάτου πριν την ηλικία των 55 ετών πατέρα ή αδερφού, καθώς και μητέρας ή αδερφής πριν την ηλικία των 65 ετών θεωρείται προδιαθεσικός παράγοντας κινδύνου για τη στεφανιαία νόσο.

➤ ΦΥΛΟ.

Οι άντρες έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου από τις γυναίκες, στις οποίες τα φυσικά οιστρογόνα φαίνεται να δρουν προστατευτικά. Μετά την εμμηνόπαυση ο κίνδυνος εμφάνισης στεφανιαίας νόσου αυξάνεται και στις γυναίκες.

➤ ΕΘΝΙΚΑ, ΚΟΙΝΩΝΙΚΟΟΙΚΟΝΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΣ ΖΩΗΣ.

Κάποιοι πληθυσμοί φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη προδιάθεση για την ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου από ότι άλλοι. Για παράδειγμα, παρατηρείται ότι οι Αμερικάνοι αφρικανικής καταγωγής έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο για τη νόσο σε σύγκριση με τους Καυκάσιους. Πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι το άγχος της καθημερινής ζωής μπορεί επίσης να αποτελεί παράγοντα κινδύνου για τη στεφανιαία νόσο. Ακόμη, διατροφικές συνήθειες που περιλαμβάνουν αυξημένη κατανάλωση λίπους (και ειδικότερα κορεσμένου λίπους), μειωμένη κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ εμπλέκονται στη δημιουργία των παραγόντων κινδύνου για τη στεφανιαία νόσο.

➤ **ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ.**

Το μεταβολικό σύνδρομο χαρακτηρίζεται από παχυσαρκία κεντρικού τύπου, αθηρογενετική δυσλιπιδαιμία (με αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων, μικρά και πυκνά μόρια LDL, μειωμένα επίπεδα HDL), αυξημένη αρτηριακή πίεση, ινσουλινοαντοχή και προθρομβωτική κατάσταση. Το μεταβολικό σύνδρομο θεωρείται παράγοντας κινδύνου για τη στεφανιαία νόσο γιατί ενισχύει την εμφάνισή της (6).

4. ΥΠΑΡΞΗ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΗΣ ΠΛΑΚΑΣ ΩΣ ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟ.

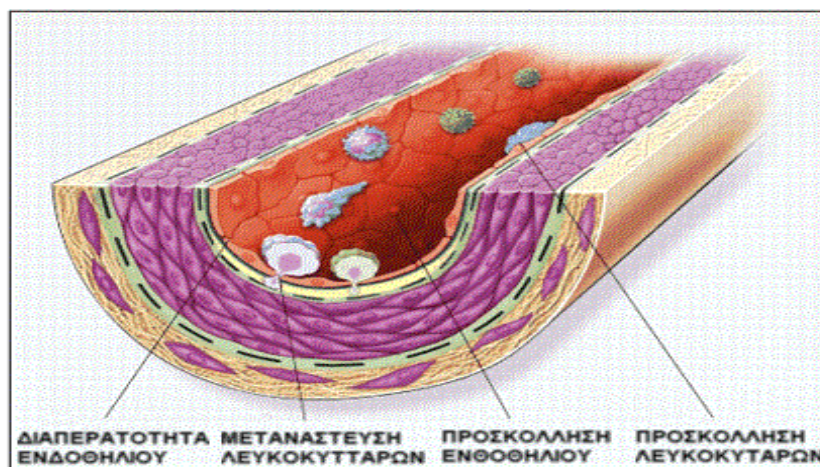
Όπως προαναφέρθηκε, η στεφανιαία νόσος είναι αποτέλεσμα σοβαρής μορφής αθηροσκλήρυνσης. Η εναπόθεση πλάκας στην επιφάνεια του αρτηριακού τοιχώματος και η σταδιακή στένωση στεφανιαίων και/ή περιφερικών αγγείων οδηγεί στην αθηροσκλήρυνση. Κλινικές επιπτώσεις της αθηροσκλήρυνσης είναι η ισχαιμία του μυοκαρδίου και το οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου, η ισχαιμία του εγκεφάλου, η ισχαιμία κάτω άκρων, ο ξαφνικός θάνατος (2).

1.1.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ.

Η αθηρογένεση αρχίζει από πολύ μικρή ηλικία και το πρώτο βήμα στην ανάπτυξη της εντοπίζεται κατά την επικρατέστερη θεωρία σε δυσλειτουργία του ενδοθηλίου ως ανοσολογική απάντηση σε τραυματισμό του. Πιθανά αίτια που προκαλούν τραυματισμό του ενδοθηλίου και δυσλειτουργία του, είναι τα αυξημένα επίπεδα LDL και τα τροποποιημένα μόρια LDL, οι ελεύθερες ρίζες, η υπέρταση, ο διαβήτης, οι γενετικές μεταλλάξεις, τα αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης, μολυσματικοί μικροοργανισμοί (*Chlamydia pneumoniae*) και άλλοι παράγοντες (11,12).

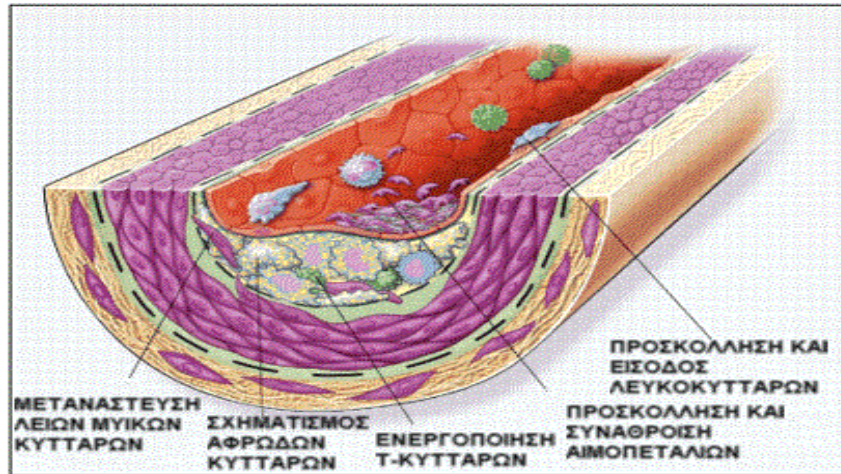
Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, ως αποτέλεσμα σε τραυματισμό, οδηγεί σε αποζημιωτικές αντιδράσεις που μεταβάλλουν τις φυσιολογικές ομοιοστατικές ιδιότητες του ενδοθηλίου. Ουσιαστικά, τίθεται σε λειτουργία μια ανοσολογική αντίδραση από το ενδοθήλιο που μεσολαβείται από T-λεμφοκύτταρα (11,12).

Η πορεία της αθηροσκλήρυνσης αρχίζει με ένα πρώιμο στάδιο στο οποίο παρατηρείται αυξημένη διαπερατότητα του ενδοθηλίου σε λιποπρωτεΐνες και άλλα συστατικά του πλάσματος. Με την παρουσία και διαμεσολάβηση της οξειδωμένης LDL και άλλων παραγόντων πραγματοποιείται προσκόλληση λευκοκυττάρων και μετακίνησή τους στο εσωτερικό του αγγειακού τοιχώματος (11,12), όπως φαίνεται στην εικόνα 1.1.



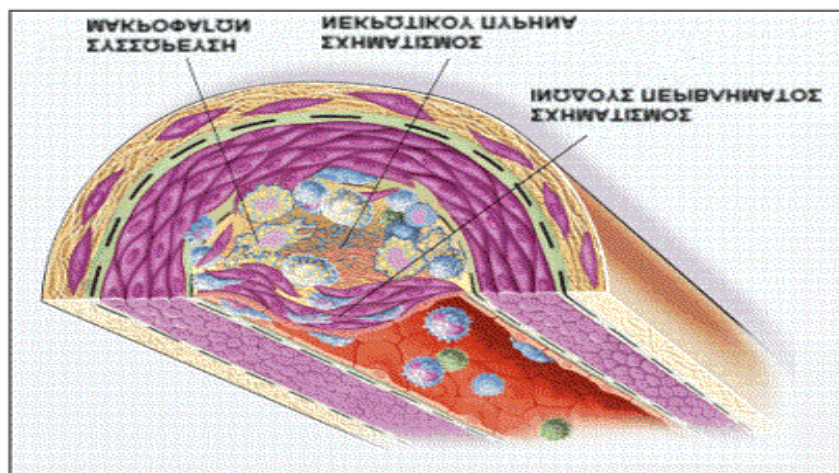
ΕΙΚΟΝΑ 1.1. ΠΡΩΙΜΟ ΣΤΑΔΙΟ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ (11).

Στη συνέχεια, παρατηρείται μετακίνηση λείων μυϊκών κυττάρων μέσα στο αγγειακό τοίχωμα, ενεργοποίηση T-κυττάρων, και σχηματισμό αφρωδών κυττάρων μέσα στο αγγειακό τοίχωμα. Ο σχηματισμός αφρωδών κυττάρων είναι αποτέλεσμα απορρόφησης οξειδωμένης LDL από τα μακροφάγα μέσω του καθαριστή υποδοχέα. Το σύνολο αυτών των διεργασιών, που μεσολαβούνται από αυξητικούς παράγοντες και παράγοντες πήξης του αίματος που εκκρίνονται στην περιοχή, οδηγεί στο σχηματισμό της λιπαρής γράμμωσης. Παράλληλα παρατηρείται συγκέντρωση και προσκόλληση αιμοπεταλίων (11,12). (ΕΙΚΟΝΑ 1.2.)



ΕΙΚΟΝΑ 1.2. ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΛΙΠΑΡΗΣ ΓΡΑΜΜΩΣΗΣ (11).

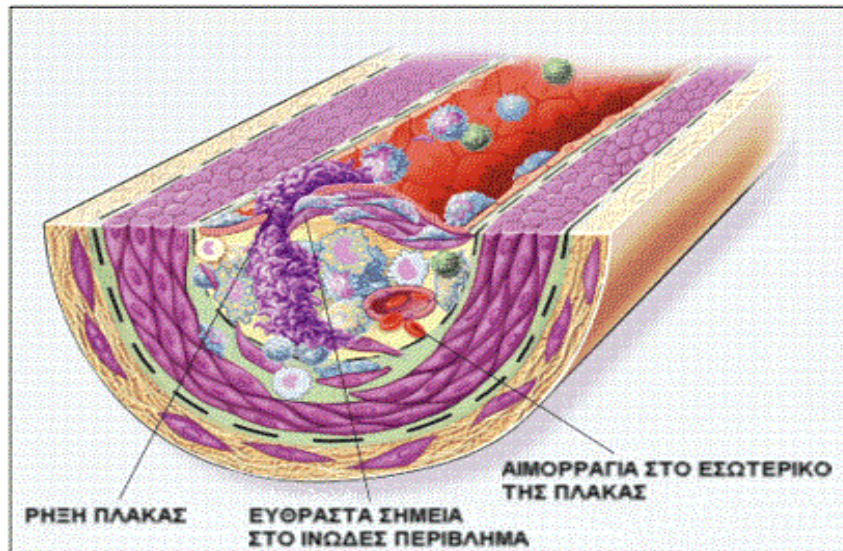
Καθώς εξελίσσεται η λιπαρή γράμμωση σε αθηρωματική πλάκα, σχηματίζεται ένα εξωτερικό ινώδες περίβλημα που αποτελείται από λεία μυϊκά κύτταρα, κολλαγόνο και λιπίδια. Το ινώδες περίβλημα περιέχει το νεκρωτικό πυρήνα, ο οποίος αποτελείται από λευκοκύτταρα, λιπίδια, ασβέστιο και κυτταρικά συντρίμια (11,12). (ΕΙΚΟΝΑ 1.3)



ΕΙΚΟΝΑ 1.3. Η ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΗ ΠΛΑΚΑ ΜΕ ΤΟ ΙΝΩΔΕΣ ΠΕΡΙΒΛΗΜΑ ΕΞΩΤΕΡΙΚΑ ΚΑΙ ΤΟ ΝΕΚΡΩΤΙΚΟ ΠΥΡΗΝΑ ΕΣΩΤΕΡΙΚΑ (11).

Η συνεχής ενεργοποίηση των μακροφάγων και ο σχηματισμός αφρωδών κυττάρων στο εσωτερικό της αθηρωματικής πλάκας έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση μεταλλοπρωτεϊνών και άλλων πρωτεολυτικών ενζύμων που λεπταίνουν το εξωτερικό ινώδες περίβλημα. Η επακόλουθη διάρρηξη του περιβλήματος φέρνει σε επαφή το νεκρωτικό πυρήνα με την κυκλοφορία του αίματος και το κολλαγόνο του αγγειακού τοιχώματος. Η θρομβωτική διεργασία που πυροδοτείται, οδηγεί στο σχηματισμό πύσσματος στον αγγειακό αυλό που μειώνει τη ροή του αίματος. Συχνά, συμβαίνει αιμορραγία και στο εσωτερικό της αθηρωματικής πλάκας που ακολουθείται από ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και σχηματισμό θρόμβου (11,12).

Η ρήξη της αθηρωματικής πλάκας και ο επακόλουθος σχηματισμός θρόμβου ινώδους και αιμοπεταλίων αποτελεί τον κύριο υπεύθυνο μηχανισμό για τα οξέα στεφανιαία σύνδρομα, δηλαδή την ασταθή στηθάγχη και το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Η απόσχιση του πηγματος από το αγγειακό τοίχωμα και η μεταφορά του θρόμβου με τη ροή του αίματος σε μικρότερα αγγεία προκαλεί αποκλεισμό του αγγείου και επεισόδια ισχαιμίας (11,12). (ΕΙΚΟΝΑ 1.4)



ΕΙΚΟΝΑ 1.4. ΡΗΞΗ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΗΣ ΠΛΑΚΑΣ ΚΑΙ ΘΡΟΜΒΟΓΕΝΕΣΗ (11).

1.1.3 Η ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗ LDL ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗ.

Η οξειδωμένη LDL διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία της αθηροσκληρωτικής πλάκας. Η οξείδωση της LDL πραγματοποιείται κυρίως στον υποενδοθηλιακό χώρο παρουσία ελευθέρων ριζών (κυρίως ανιόντων υπεροξειδίου). Η οξείδωση της LDL ευνοείται στον υποενδοθηλιακό χώρο λόγω αυξημένης παρουσίας ελευθέρων ριζών και μειωμένων επιπέδων αντιοξειδωτικών. Ο μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για την οξείδωση του μορίου της LDL περιλαμβάνει τρεις φάσεις (13) :

- **ΠΡΩΤΗ ΦΑΣΗ:** ΦΑΣΗ ΥΣΤΕΡΗΣΗΣ (lag phase), κατά την οποία η οξείδωση της LDL καθυστερεί μέχρι την πλήρη κατανάλωση των ενδογενών αντιοξειδωτικών της (βιταμίνη E και καροτενοειδή).
- **ΔΕΥΤΕΡΗ ΦΑΣΗ:** ΦΑΣΗ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ (propagation phase), κατά την οποία παρατηρείται γρήγορος πολλαπλασιασμός των οξειδωμένων μορίων LDL, μέσω της μετατροπής των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σε υπεροξείδια λιπιδίων στο μόριο της LDL.
- **ΤΡΙΤΗ ΦΑΣΗ:** ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΤΙΚΗ ΦΑΣΗ (decomposition phase), που οδηγεί στο σχηματισμό μονοδιαλδεύδης και άλλων προϊόντων αποικοδόμησης των υδροπεροξειδίων.

Τα βιολογικά αποτελέσματα της οξειδωμένης LDL στον υποενδοθηλιακό χώρο που σχετίζονται άμεσα με την πορεία της αθηροσκλήρυνσης, περιλαμβάνουν (13) :

- ❖ Αυξημένη προσκόλληση μικροκυττάρων.
- ❖ Μετανάστευση μικροκυττάρων από την κυκλοφορία του αίματος στον εσωτερικό χιτώνα.
- ❖ Πολλαπλασιασμό μικροκυττάρων.
- ❖ Μετανάστευση και πολλαπλασιασμό λείων μυϊκών κυττάρων.
- ❖ Αυξημένη προσρόφηση οξειδωμένης LDL από μακροφάγα μέσω καθαριστή υποδοχέα.
- ❖ Μειωμένη προσρόφηση φυσιολογικής LDL από τον υποδοχέα της.
- ❖ Παρεμπόδιση της κινητικότητας των μακροφάγων στον υποενδοθηλιακό χώρο.
- ❖ Αγγειοσυστολή.
- ❖ Προσκόλληση και συσσωμάτωση αιμοπεταλίων.
- ❖ Προβληματική ινωδόλυση και αύξηση στη σύνθεση θρομβίνης και στην πήξη του αίματος.
- ❖ Δημιουργία αφρωδών κυττάρων.
- ❖ Κυτταροτοξικότητα για τα ενδοθηλιακά κύτταρα.
- ❖ Δημιουργία αυτοαντισωμάτων.
- ❖ Ενεργοποίηση T-λεμφοκυττάρων.

Είναι φανερό ότι τα οξειδωμένα μόρια της LDL όχι μόνο προδιαθέτουν, αλλά διαμεσολαβούν σε όλες σχεδόν τις διεργασίες που εμπλέκονται στη δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας και στη θρομβογένεση.

1.1.4 ΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗ.

Οι μελέτες για την αθηροσκλήρυνση έχουν επεκταθεί και σε γονιδιακό επίπεδο με σκοπό την ανίχνευση μεταλλάξεων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της νόσου. Πολλά γονίδια που θεωρούνται υποψήφια για την αθηροσκλήρυνση έχουν μελετηθεί και οι πολυμορφισμοί που έχουν βρεθεί έχουν συσχετιστεί με αυξημένη προδιάθεση για ανάπτυξη της νόσου.

Στο γονίδιο του υποδοχέα της LDL έχουν ταυτοποιηθεί αρκετές σημειακές μεταλλάξεις (D200G, C358R, V502M, G528D, P664L) που φαίνεται ότι σχετίζονται με την διαδικασία της αθηρογένεσης (14). Το γονίδιο της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης συγκεντρώνει επίσης το ερευνητικό ενδιαφέρον. Έχουν βρεθεί σε αυτό δύο τουλάχιστον μεταλλάξεις (Asp9Asn, Asn291Ser) (15) που σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων, μειωμένα επίπεδα HDL-C (16) και αυξημένη εξέλιξη στεφανιαίας αθηροσκλήρυνσης (17). Τελευταίες μελέτες έχουν συσχετίσει δύο μεταλλάξεις (R3500Q, R3480W) στο γονίδιο της απολιποπρωτεΐνης B100, που ευθύνονται για ελαττωματικό μόριο Apo B100, με υπερχοληστερολαιμία και αθηροσκλήρυνση (18). Με τη νόσο της αθηροσκλήρυνσης έχουν συσχετιστεί και σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο του αγγειοτενσινογόνου (Θυμίνη704Κυτοσίνη) (19), καθώς και στο γονίδιο της ενδοθηλιακής συνθετάσης του νιτρικού οξέος (Glu298Asp) (20). Στο γονίδιο της E-σελεκτίνης έχουν ανιχνευθεί τρεις μεταλλάξεις (Serine128Arginine, Leucine554Phenylalanine, Guanine98Thymine) που έχουν σχετιστεί με υψηλό κίνδυνο για δριμεία αθηροσκλήρυνση (21). Πρόσφατα σχετίστηκε μια σημειακή μετάλλαξη (G-69A) στον υποκινητή του γονιδίου της πρωτεΐνης μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης (CETP) με μειωμένα επίπεδα CETP και αυξημένο κίνδυνο για αθηροσκλήρυνση (22). Ανάμεσα στα γονίδια με ανιχνευμένες μεταλλάξεις που θεωρούνται ότι προδιαθέτουν στην ανάπτυξη της νόσου, περιλαμβάνονται και τα γονίδια των απολιποπρωτεϊνών AI, AI, B, CII, E (23).

Οι έρευνες σε γονιδιακό επίπεδο για την αθηροσκλήρυνση είναι αρκετές και συνεχίζονται. Η συσχέτιση μεταλλάξεων και πολυμορφισμών με την εκκίνηση και ανάπτυξη της νόσου είναι σημαντική για την κατανόηση του ακριβούς μηχανισμού της νόσου αλλά και για την αποτελεσματική πρόληψή της.

1.2 ΥΠΕΡΤΑΣΗ.

Η υπέρταση, όπως αναφέρθηκε, αποτελεί κύριο αιτιώδη παράγοντα κινδύνου για τη στεφανιαία νόσο. Ως υπέρταση ορίζεται η επίμονη συστολική αρτηριακή πίεση πάνω από 140mm Hg και/ή διαστολική αρτηριακή πίεση πάνω από 90mm Hg (5). Πρόκειται για αρκετά διαδεδομένο νόσημα που συχνά παραμένει ασυμπτωματικό για πολλά χρόνια. Η υπέρταση έχει ως αποτέλεσμα τη διάταση των αρτηριδίων και την υπερτροφία της αριστερής κοιλίας του μυοκαρδίου. Εάν δεν αντιμετωπιστεί, μπορεί να οδηγήσει σε περιφερική αρτηριακή νόσο, καρδιακή ανεπάρκεια, έμφραγμα μυοκαρδίου, συμφόρηση πνευμονικών φλεβών και νεφροπάθεια (5).

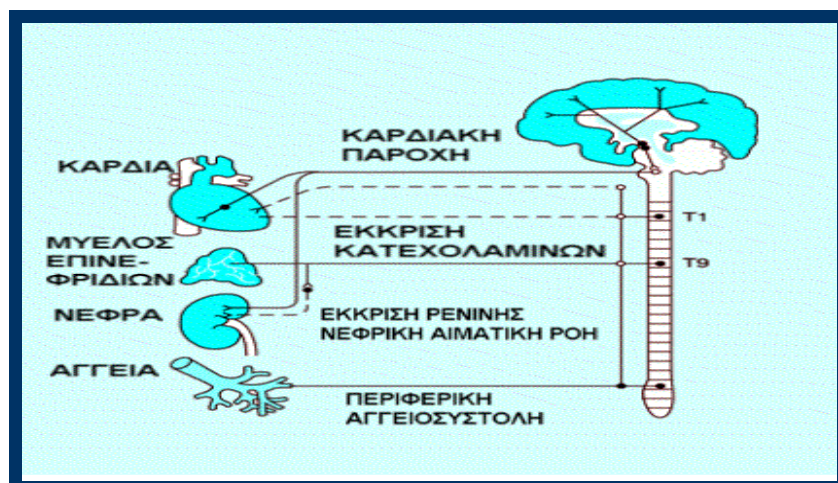
1.2.1 ΡΥΘΜΙΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗΣ ΠΙΕΣΗΣ.

Βασικοί ρυθμιστές της αρτηριακής πίεσης είναι:

1. Το συμπαθητικό νευρικό σύστημα.
2. Το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης.
3. Τα νεφρά.

1. ΤΟ ΣΥΜΠΑΘΗΤΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.

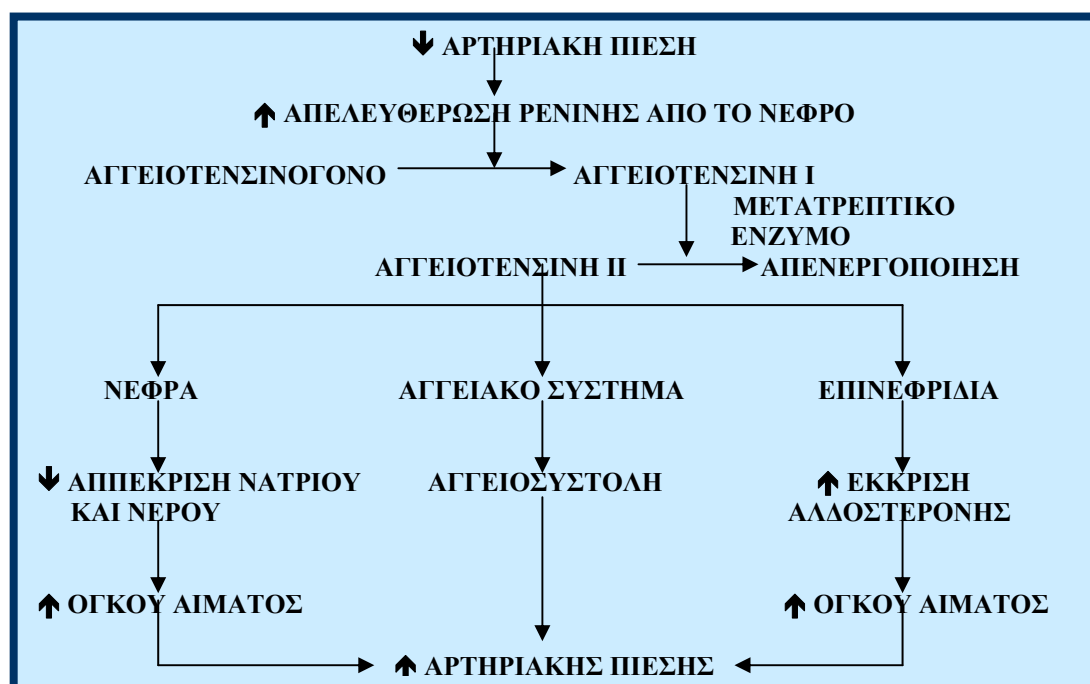
Το συμπαθητικό νευρικό σύστημα αποτελεί βραχυπρόθεσμο ρυθμιστή της αρτηριακής πίεσης. Ο ρόλος του φαίνεται σχηματικά στην *εικόνα 1.5*. Η πτώση της αρτηριακής πίεσης γίνεται αντιληπτή από ειδικούς υποδοχείς στο σώμα που διεγείρουν το αγγειοκινητικό κέντρο στο μυελό του εγκεφάλου, το οποίο πυροδοτεί ρυθμιστικές δράσεις σε διάφορους ιστούς του σώματος. Οι δράσεις αυτές περιλαμβάνουν την έκκριση κατεχολαμινών (επινεφρίνη, νορ-επινεφρίνη) κυρίως από το μυελό των επινεφριδίων, έκκριση ρενίνης από τα νεφρά και περιφερική αγγειοσυστολή. Αποτέλεσμα είναι η αύξηση της αρτηριακής πίεσης (24).



ΕΙΚΟΝΑ 1.5. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΑΘΗΤΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗΣ ΠΙΕΣΗΣ (24).

2. ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΡΕΝΙΝΗΣ-ΑΓΓΕΙΟΤΕΝΣΙΝΗΣ.

Το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης αποτελεί μακροπρόθεσμο ρυθμιστή της αρτηριακής πίεσης. Η μείωση της αρτηριακής πίεσης προκαλεί απελευθέρωση ρενίνης από τα νεφρά. Η ρενίνη μετατρέπει το ανενεργό αγγειοτενσινογόνο που υπάρχει στην κυκλοφορία του αίματος σε αγγειοτενσίνη I. Με τη βοήθεια του μετατρεπτικού ενζύμου, η αγγειοτενσίνη I μετατρέπεται σε αγγειοτενσίνη II. Η αγγειοτενσίνη II επιδρά: α). Στα νεφρά, προκαλώντας κατακράτηση νερού και νατρίου, με αποτέλεσμα την αύξηση του όγκου του αίματος. β). Στο αγγειακό σύστημα, προκαλώντας αγγειοσυστολή. γ). Στα επινεφρίδια, προκαλώντας έκκριση αλδοστερόνης, η οποία αυξάνει τη νεφρική επαναρρόφηση νατρίου και την απέκκριση καλίου. Αποτέλεσμα της δράσης της αγγειοτενσίνης II είναι η αύξηση της αρτηριακής πίεσης (25). Το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης φαίνεται σχηματικά στην *εικόνα 1.6*.



ΕΙΚΟΝΑ 1.6. ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΡΕΝΙΝΗΣ- ΑΓΓΕΙΟΤΕΝΣΙΝΗΣ (25).

3. ΤΑ ΝΕΦΡΑ.

Τα νεφρά ρυθμίζουν την αρτηριακή πίεση μέσω της αντιδιουρητικής ορμόνης, η οποία εκκρίνεται από τον οπίσθιο λοβό της υπόφυσης. Η αντιδιουρητική ορμόνη προκαλεί αυξημένη νεφρική επαναρρόφηση νερού και νατρίου με αποτέλεσμα την αύξηση της αρτηριακής πίεσης (25).

1.2.2 ΕΙΔΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ.

Το 90%-95% των περιπτώσεων υπέρτασης είναι αδιευκρίνιστης αιτιολογίας και ονομάζεται ιδιοπαθής υπέρταση (essential hypertension). Οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που φαίνεται ότι εμπλέκονται στην ανάπτυξη ιδιοπαθούς υπέρτασης περιλαμβάνουν: αυξημένη περιφερική αγγειακή αντίσταση, μη φυσιολογικό σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης, υπερδραστηριότητα του συμπαθητικού νευρικού συστήματος και παράγοντες, όπως βραδυκίνηνη, ενδοθηλίνη, προσταγλαδίνη. Το υπόλοιπο 5%-10% των περιπτώσεων υπέρτασης οφείλεται κυρίως σε νεφρικά και ενδοκρινολογικά νοσήματα, σε φαρμακευτικές παρενέργειες, σε εγκεφαλικές διαταραχές και ονομάζεται δευτεροπαθής υπέρταση (secondary hypertension) (24).

Ανάλογα με τις τιμές συστολικής και διαστολικής αρτηριακής πίεσης, διακρίνονται επτά κατηγορίες αρτηριακής πίεσης για τους ενήλικες (5). Οι κατηγορίες αυτές φαίνονται στον πίνακα 2.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.2. ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΣΕ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗΣ ΠΙΕΣΗΣ (5).

	ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΠΙΕΣΗ (mm Hg)		
ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	ΣΥΣΤΟΛΙΚΗ		ΔΙΑΣΤΟΛΙΚΗ
ΕΠΙΘΥΜΗΤΗ	<120	ΚΑΙ	<80
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ	<130	ΚΑΙ	<85
ΟΡΙΑΚΑ ΥΨΗΛΗ	130-139	Ή	85-89
ΥΠΕΡΤΑΣΗ			
ΣΤΑΔΙΟ 1	140-159	Ή	90-99
ΣΤΑΔΙΟ 2	160-179	Ή	100-109
ΣΤΑΔΙΟ 3	≥180	Ή	≥110

1.2.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ.

Οι κύριοι προδιαθεσικοί παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη υπέρτασης είναι το αυξημένο σωματικό βάρος, η αυξημένη πρόσληψη αλκοόλ, η αυξημένη διαιτητική πρόσληψη νατρίου, η μειωμένη διαιτητική πρόσληψη καλίου, μαγνησίου και ασβεστίου, η μειωμένη φυσική δραστηριότητα και η αυξημένη πρόσληψη λίπους (5,8).

➤ ΑΥΞΗΜΕΝΟ ΣΩΜΑΤΙΚΟ ΒΑΡΟΣ.

Η αυξημένη αρτηριακή πίεση σχετίζεται με Δείκτη Μάζας Σώματος μεγαλύτερο από 27 kg/m^2 . Κυρίως η παχυσαρκία ($\Delta.Μ.Σ. > 30 \text{ kg/m}^2$) είναι σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την υπέρταση αλλά και τη στεφανιαία νόσο. Στους μηχανισμούς που αποδίδεται η σχέση παχυσαρκίας και υπέρτασης περιλαμβάνονται, η ινσουλινοαντοχή και υπερινσουλιναμία, η υπερδιέγερση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος και του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης, καθώς και αλλαγές στη νεφρική λειτουργία (26).

➤ ΑΥΞΗΜΕΝΗ ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΑΛΚΟΟΛ.

Αυξημένη κατανάλωση αλκοολούχων ροφημάτων σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης υπέρτασης. Κατανάλωση αλκοόλ σε ποσότητα μεγαλύτερη από 210γρ. αιθανόλης την εβδομάδα είναι ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την υπέρταση (27). Η κατανάλωση αλκοόλ δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα δύο ποτά την ημέρα (12γρ. αιθανόλη) για τους άντρες, ενώ για τις γυναίκες ισχύουν συστάσεις για τη μισή ποσότητα (5).

➤ ΑΥΞΗΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΗΤΙΚΗ ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΧΛΩΡΙΟΥΧΟΥ ΝΑΤΡΙΟΥ.

Η αυξημένη πρόσληψη νατρίου (κυρίως με τη μορφή χλωριούχου νατρίου, δηλαδή αλατιού) σχετίζεται σημαντικά με την εμφάνιση και εξέλιξη της υπέρτασης σε πολλά άτομα. Η επίδραση αυτή του νατρίου παρατηρείται στους υπερτασικούς που είναι "ευαίσθητοι στο αλάτι". Αντίθετα, στην κατηγορία των υπερτασικών που είναι "ανθεκτικοί στο αλάτι" δεν έχει καμία επίδραση η πρόσληψη νατρίου. Η κατάταξη των υπερτασικών σε μια από τις παραπάνω κατηγορίες προϋποθέτει τη δοκιμασία ευαισθησίας στο αλάτι (Salt Step Test) (8).

➤ ΜΕΙΩΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΗΤΙΚΗ ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΚΑΛΙΟΥ, ΜΑΓΝΗΣΙΟΥ ΚΑΙ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ.

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει χαμηλές προσλήψεις καλίου, μαγνησίου και ασβεστίου με μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης υπέρτασης (8).

➤ ΜΕΙΩΜΕΝΗ ΦΥΣΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ.

Η μειωμένη φυσική δραστηριότητα που συχνά συνοδεύεται με αυξημένο σωματικό βάρος, αποτελεί προδιαθεσικό παράγοντα για την εμφάνιση υπέρτασης. Μελέτες έχουν δείξει ότι μέτρια αεροβική άσκηση (30-45 λεπτά την ημέρα) συμβάλλει στην μείωση της αρτηριακής πίεσης και στη μείωση του σωματικού βάρους (5,8).

➤ ΑΥΞΗΜΕΝΗ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΛΙΠΟΥΣ.

Η αυξημένη κατανάλωση λίπους και κυρίως κορεσμένου λίπους συμβάλλει στην ανάπτυξη υπέρτασης. Φαίνεται πως η αυξημένη συγκέντρωση λιπαρών οξέων στο αίμα προκαλεί αλλαγές στην κινητική των διαύλων ασβεστίου των λείων μυϊκών κυττάρων του μυοκαρδίου. Η αλλαγή αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη δραστηριότητα των διαύλων και αυξημένο ρεύμα ιόντων ασβεστίου, που οδηγεί σε αυξημένο μυοκαρδιακό τόνο και αυξημένη αρτηριακή πίεση (28).

Ωστόσο, τα ω-3 λιπαρά οξέα έχει βρεθεί ότι μειώνουν την αρτηριακή πίεση μέσω της αυξημένης σύνθεσης προστακυκλίνης (αγγειοδιασταλτικό) και μειωμένης σύνθεσης θρομβοξανής (αγγειοδιασταλτικό).

1.2.4 ΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΥΠΕΡΤΑΣΗ.

Οι μελέτες των παθοφυσιολογικών μηχανισμών της ιδιοπαθούς υπέρτασης σε γονιδιακό επίπεδο έχουν φέρει στο επίκεντρο του επιστημονικού ενδιαφέροντος μεταλλάξεις που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και εξέλιξη της νόσου. Οι πορείες των ερευνών στρέφονται τόσο στην πλήρη κατανόηση των μηχανισμών της νόσου, όσο και στην γονιδιακή θεραπεία της.

Ένα από τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα υπέρτασης με γονιδιακό υπόβαθρο είναι το σύνδρομο Liddle. Η νόσος χαρακτηρίζεται από αυξημένη νεφρική επαναρρόφηση νατρίου, υποκαλιαμία και χαμηλά επίπεδα ρενίνης και αλδοστερόνης στο πλάσμα. Έχει βρεθεί ότι η υπέρταση στο σύνδρομο Liddle οφείλεται σε μεταλλάξεις στα γονίδια SCNNIB (T594M) (29) και SCNNIG που κωδικοποιούν τις β και γ υπομονάδες αντίστοιχα των επιθηλιακών διαύλων νατρίου (30).

Τα γονίδια του αγγειοτενσινογόνου και του υποδοχέα I της αγγειοτενσίνης II έχουν μελετηθεί αρκετά για πολυμορφισμούς που σχετίζονται με την υπέρταση. Στο γονίδιο του αγγειοτενσινογόνου έχουν εντοπιστεί τουλάχιστον δύο μεταλλάξεις (Met235Thr, Thr174Met) (31) και ένας πολυμορφισμός (T+31C) (32) που σχετίζονται με αυξημένη αρτηριακή πίεση. Το γονίδιο του υποδοχέα I της αγγειοτενσίνης II φέρει τουλάχιστον έναν πολυμορφισμό (A1166C) που φαίνεται να επηρεάζει την ευαισθησία της αγγειοτενσίνης II και ίσως να εμπλέκεται στην ανάπτυξη της υπέρτασης (33).

Επίσης, στους πολυμορφισμούς που σχετίζονται με την υπέρταση περιλαμβάνονται: ο πολυμορφισμός A-48G στο γονίδιο του υποδοχέα I της ντοπαμίνης (34), ο πολυμορφισμός L554F στο γονίδιο της E-σελεκτίνης (35), πολυμορφισμοί στον υποκινητή του γονιδίου της καταλάσης (36) και ο πολυμορφισμός G460W στο γονίδιο της α-αντουσίνης (37).

1.2.5 ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ.

❖ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΥΓΙΟΥΣ ΣΩΜΑΤΙΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ.

Η απώλεια σωματικού βάρους σε άτομα υπέρβαρα και παχύσαρκα έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα ωφέλιμη στην μείωση της αρτηριακής πίεσης τους. Ακόμη και μικρή μείωση του βάρους επιφέρει σημαντικά αποτελέσματα στα επίπεδα αρτηριακής πίεσης. Όταν η απώλεια βάρους συνδυάζεται με αύξηση της φυσικής δραστηριότητας, τότε τα αποτελέσματα είναι ακόμη πιο ευεργετικά στη μείωση της αρτηριακής πίεσης (8).

❖ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΗΝ ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΝΑΤΡΙΟΥ.

Ελάττωση στην πρόσληψη νατρίου σε 2400mg/ημέρα (6gr αλάτι) είναι απαραίτητη για την διαιτητική αντιμετώπιση της υπέρτασης σταδίου I, ενώ στην υπέρταση σταδίου II και III επιβάλλεται αυστηρότερος περιορισμός νατρίου, ως 1500mg/ημέρα (5,8).

❖ ΕΠΑΡΚΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΚΑΛΙΟΥ, ΜΑΓΝΗΣΙΟΥ ΚΑΙ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ.

Η κάλυψη των ημερήσιων συνιστώμενων προσλήψεων σε κάλιο (3,5-4,6gr), μαγνήσιο (0,28-0,35gr) και ασβέστιο (0,8-1gr) φαίνεται πως επιφέρει μέτρια μείωση στην αρτηριακή πίεση (5,8).

❖ Η ΔΙΑΙΤΑ DASH (Dietary Approach to Stop Hypertension).

Η έρευνα DASH έδειξε ότι δίαιτα πλούσια σε φρούτα, λαχανικά και άπαχα γαλακτοκομικά και χαμηλή σε ολικό και κορεσμένο λίπος επιφέρει μείωση στην αρτηριακή πίεση σε όλη τη διάρκεια του εικοσιτετραώρου κατά 6-11 mmHg (38). Επίσης έχει ερευνηθεί η επίδραση της δίαιτας DASH στο λιπιδαιμικό προφίλ και βρέθηκε ότι μειώνει σημαντικά τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης και τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης, ενώ προκαλεί και μικρή μείωση των επιπέδων της HDL χοληστερόλης (39).

Η δίαιτα DASH είναι σχεδιασμένη για δύο επίπεδα πρόσληψης νατρίου (2400 mg και 1500 mg). Η μεγαλύτερη μείωση της αρτηριακής πίεσης παρατηρείται στο δεύτερο επίπεδο, δηλαδή στα 1500 mg (40). Η προτεινόμενη κατανάλωση φρούτων, λαχανικών και γαλακτοκομικών από τη δίαιτα

DASH εξασφαλίζει αυξημένη πρόσληψη καλίου, μαγνησίου και ασβεστίου που έχουν αντιυπερτασική επίδραση. Το διατροφικό σχήμα της διαίτας DASH φαίνεται στον πίνακα 1.3 (40).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.3. ΤΟ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΟ ΣΧΗΜΑ ΤΗΣ ΔΙΑΙΤΑΣ DASH ΓΙΑ 2000 ΘΕΡΜΙΔΕΣ (40).

Η ΔΙΑΙΤΑ DASH Ο ΠΑΡΑΚΑΤΩ ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΝΑΙ ΣΧΕΔΙΑΣΜΕΝΟΣ ΓΙΑ 2000 ΘΕΡΜΙΔΕΣ.				
FOOD GROUP	DAILY SERVINGS (except as noted)	SERVING SIZES	EXAMPLES AND NOTES	SIGNIFICANCE OF EACH FOOD GROUP TO THE DASH EATING PLAN
Grains & grain products	7-8	1 slice bread 1 oz dry cereal* ½ cup cooked rice, pasta, or cereal	whole wheat bread, English muffin, pita bread, bagel, cereals, grits, oatmeal, crackers, unsalted pretzels and popcorn	major sources of energy and fiber
Vegetables	4-5	1 cup raw leafy vegetable ½ cup cooked vegetable 6 oz vegetable juice	tomatoes, potatoes, carrots, green peas, squash, broccoli, turnip greens, collards, kale, spinach, artichokes, green beans, lima beans, sweet potatoes	rich sources of potassium, magnesium, and fiber
Fruits	4-5	6 oz fruit juice 1 medium fruit ¼ cup dried fruit ½ cup fresh, frozen, or canned fruit	apricots, bananas, dates, grapes, oranges, orange juice, grapefruit, grapefruit juice, mangoes, melons, peaches, pineapples, prunes, raisins, strawberries, tangerines	important sources of potassium, magnesium, and fiber
Lowfat or fat free dairy foods	2-3	8 oz milk 1 cup yogurt 1½ oz cheese	fat free (skim) or lowfat (1%) milk, fat free or lowfat buttermilk, fat free or lowfat regular or frozen yogurt, lowfat and fat free cheese	major sources of calcium and protein
Meats, poultry, and fish	2 or less	3 oz cooked meats, poultry, or fish	select only lean; trim away visible fats; broil, roast, or boil, instead of frying; remove skin from poultry	rich sources of protein and magnesium
Nuts, seeds, and dry beans	4-5 per week	½ cup or 1½ oz nuts 2 Tbsp or ½ oz seeds ½ cup cooked dry beans	almonds, filberts, mixed nuts, peanuts, walnuts, sunflower seeds, kidney beans, lentils, peas	rich sources of energy, magnesium, potassium, protein, and fiber
Fats & oils**	2-3	1 tsp soft margarine 1 Tbsp lowfat mayonnaise 2 Tbsp light salad dressing 1 tsp vegetable oil	soft margarine, lowfat mayonnaise, light salad dressing, vegetable oil (such as olive, corn, canola, or safflower)	DASH has 27 percent of calories as fat, including that in or added to foods
Sweets	5 per week	1 Tbsp sugar 1 Tbsp jelly or jam ½ oz jelly beans 8 oz lemonade	maple syrup, sugar, jelly, jam, fruit-flavored gelatin, jelly beans, hard candy, fruit punch, sorbet, ices	sweets should be low in fat

1.2.6. ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ.

Συχνά, για την αντιμετώπιση της υπέρτασης, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για στάδιο II ή III, απαιτείται ο συνδυασμός δίαιτας και φαρμάκων. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της υπέρτασης μπορούν να χωριστούν σε εννιά κατηγορίες(41).

1. ΔΙΟΥΡΗΤΙΚΑ.

Τα διουρητικά αυξάνουν τη νεφρική απέκκριση νατρίου ή αποβαλλόμενα τα ίδια συμπαρασύρουν νερό αυξάνοντας τη διούρηση. Τα διουρητικά χρησιμοποιούνται ως φαρμακευτική αγωγή πρώτης γραμμής για την υπέρταση (41). Ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους διακρίνονται τα στις παρακάτω ομάδες:

➤ ΘΕΙΑΖΙΔΙΚΑ ΔΙΟΥΡΗΤΙΚΑ.

Τα θειαζιδικά διουρητικά δρουν στην αρχή του κατιόντος σκέλους της αγκύλης του Henle στα νεφρά και προκαλούν αυξημένη απέκκριση νατρίου και νερού, μειώνοντας την αρτηριακή πίεση. Είναι διουρητικά μέτριας ισχύς, ενώ η υποκαλιαιμία είναι συχνή σε χρόνια χορήγησή τους (41).

➤ ΔΙΟΥΡΗΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΓΚΥΛΗΣ.

Πρόκειται για ισχυρά διουρητικά που εμποδίζουν την επαναρρόφηση χλωριούχου νατρίου και νερού στο ανιόν σκέλος της αγκύλης του Henle. Οι συνηθέστερες ανεπιθύμητες ενέργειες των διουρητικών της αγκύλης είναι υποκαλιαιμία, υπονατρίαζαίμια, υπερουριχαιμία και υπεργλυκαιμία (41).

➤ ΔΙΟΥΡΗΤΙΚΑ ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΠΩΛΕΙΑΣ ΚΑΛΙΟΥ.

Πρόκειται για φάρμακα με ασθενή αντιδιουρητική δράση. Χαρακτηρίζονται από κατακράτηση καλίου. Χρησιμοποιούνται σχεδόν αποκλειστικά σε συνδυασμό με άλλα διουρητικά για να ενισχύεται η διουρητική δράση και να αποφεύγεται η υποκαλιαιμία (41).

➤ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΑΛΔΟΣΤΕΡΟΝΗΣ.

Δρουν ανταγωνιστικά προς την αλδοστερόνη, έχουν ασθενή διουρητική δράση και προκαλούν κατακράτηση καλίου (41).

➤ ΩΣΜΩΤΙΚΩΣ ΔΡΩΝΤΑ ΔΙΟΥΡΗΤΙΚΑ.

Αποβαλλόμενα ταχέως από τα νεφρά συμπαρασύρουν νερό και νάτριο (41).

2. β-ΑΔΡΕΝΕΡΓΙΚΟΙ ΑΠΟΚΛΕΙΣΤΕΣ.

Οι β-ανταγωνιστές μειώνουν την αρτηριακή πίεση ελαττώνοντας την καρδιακή παροχή. Επίσης, ελαττώνουν τις συμπαθητικές ώσεις από το κεντρικό νευρικό σύστημα και εμποδίζουν την απελευθέρωση ρενίνης από τους νεφρούς, μειώνοντας έτσι τη σύνθεση αγγειοτενσίνης II και την έκκριση αλδοστερόνης. Θεωρούνται ως φαρμακευτική αγωγή πρώτης γραμμής για την υπέρταση (41).

3. ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ.

Οι ανταγωνιστές ασβεστίου παρεμποδίζουν την είσοδο ιόντων ασβεστίου από τους διαύλους των κυτταρικών μεμβρανών στον καρδιακό μυ και στις λείες μυϊκές ίνες των αγγείων. Το αποτέλεσμα

είναι μείωση της συσπαστικότητας του καρδιακού μυ και αγγειοδιαστολή των περιφερικών και στεφανιαίων αγγείων. Εμφανίζουν επίσης και νατριουρητική δράση (41).

4. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΤΡΕΠΤΙΚΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΤΕΝΣΙΝΗΣ (ΜΕΑ).

Οι αναστολείς ΜΕΑ αναστέλλουν την μετατροπή της αγγειοτενσίνης Ι σε αγγειοτενσίνη ΙΙ. Αυτό οδηγεί σε μειωμένες περιφερικές αγγειακές αντιστάσεις, αυξημένη αγγειοδιαστολή και αυξημένα επίπεδα βραδυκινίνης που είναι ισχυρό αγγειοδιασταλτικό. Παράλληλα, προκαλείται μειωμένη παραγωγή αλδοστερόνης και επομένως μειωμένη κατακράτηση νερού και νατρίου. Το αποτέλεσμα είναι η μείωση της αρτηριακής πίεσης (41).

5. ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΑΓΓΕΙΟΤΕΝΣΙΝΗΣ ΙΙ.

Έχουν ιδιότητες παρόμοιες με τους αναστολείς ΜΕΑ. Ο ρόλος τους στην θεραπεία της υπέρτασης δεν έχει διευκρινιστεί (41).

6. α-ΑΔΡΕΝΕΡΓΙΚΟΙ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ.

Προκαλούν αποκλεισμό των α_1 αδρενεργικών υποδοχέων. Μειώνουν τις περιφερικές αγγειακές αντιστάσεις και ελαττώνουν την αρτηριακή πίεση, προκαλώντας χάλαση των λείων μυϊκών ινών (41).

7. ΚΕΝΤΡΙΚΩΣ ΔΡΩΝΤΑ ΑΔΡΕΝΕΡΓΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ.

Δρουν στους κεντρικούς α-αδρενεργικούς υποδοχείς, στο αγγειοκινητικό κέντρο στο στέλεχος του εγκεφάλου και στον υποθάλαμο. Αναστέλλουν τις συμπαθητικές ώσεις προς τους περιφερικούς νευρώνες και την απελευθέρωση νοραδρεναλίνης και μειώνουν έτσι την αρτηριακή πίεση, την καρδιακή συχνότητα, την καρδιακή παροχή και τις περιφερικές αγγειακές αντιστάσεις (41).

8. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΗΣ ΣΕΡΟΤΟΝΙΝΗΣ.

Αναστέλλουν τους υποδοχείς τύπου 2 της σεροτονίνης. Οι υποδοχείς αυτοί βρίσκονται στις λείες μυϊκές ίνες των αγγείων προκαλώντας αγγειοσύσπαση και στα αιμοπετάλια όπου αυξάνουν τη συγκολλητικότητά τους (41).

9. ΑΓΓΕΙΟΔΙΑΣΤΑΛΤΙΚΑ.

Προκαλούν αγγειοδιαστολή δρώντας απευθείας στις λείες μυϊκές ίνες των αρτηριών. Χρησιμοποιούνται σε περιστατικά υπερτασικής κρίσης (41).

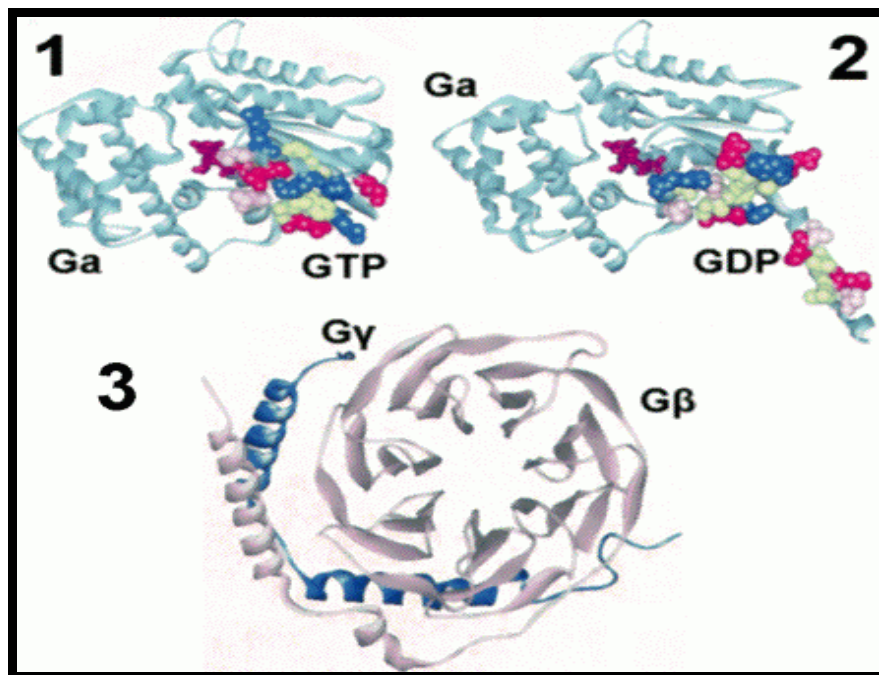
Η ήπια υπέρταση συνήθως αντιμετωπίζεται με ένα φάρμακο και δίαιτα. Η μέτρια και η βαριά υπέρταση, πέρα από τη δίαιτα, απαιτούν το συνδυασμό δύο ή περισσότερων αντιυπερτασικών φαρμάκων.

1.3 G-ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ.

Ένας σημαντικός μηχανισμός που ελέγχει τη διακυτταρική μεταβίβαση μηνυμάτων είναι το σύστημα μεταβίβασης σήματος των G-πρωτεϊνών. Οι G ετεροτριμερείς πρωτεΐνες βρίσκονται σε όλα σχεδόν τα κύτταρα του οργανισμού και ανήκουν στην οικογένεια των GTPασών. Είναι γνωστές τέσσερις τάξεις G-πρωτεϊνών: η τάξη Gs που ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση, η τάξη Gi που απενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση, η τάξη Gq που ενεργοποιεί τη φωσφολιπάση C και οι τάξεις G₁₂ και G₁₃ με άγνωστη λειτουργία (42).

1.3.1 ΜΟΡΦΗ G ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.

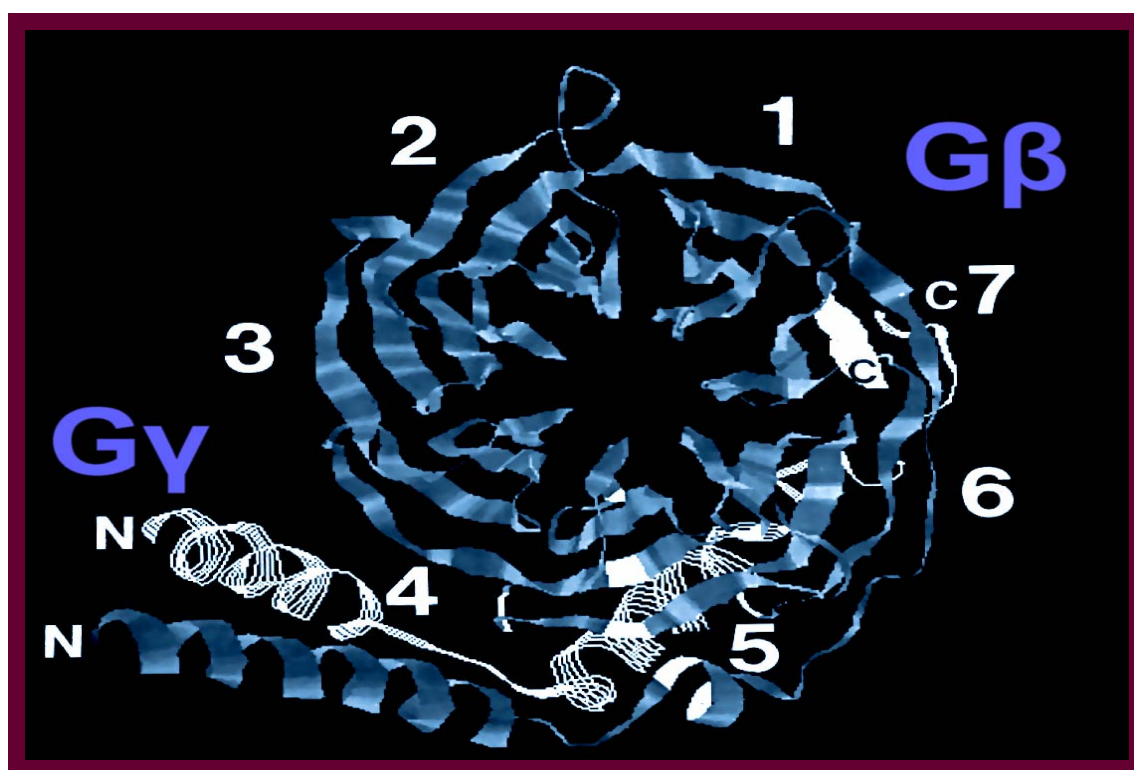
Οι G πρωτεΐνες βρίσκονται στον κυτταροπλασματικό χώρο και συνδέονται με την πλασματική μεμβράνη ομοιοπολικά μέσω λιπιδικών αλυσίδων. Οι G πρωτεΐνες αποτελούνται από υπομονάδες τις α, β και γ. Οι υπομονάδες β και γ αποτελούν ένα λειτουργικό μονομερές στο οποίο είναι ασθενώς δεσμευμένη η α υπομονάδα. Η α υπομονάδα αποτελείται από δύο περιοχές, μια περιοχή που εμπλέκεται στη σύνδεση και υδρόλυση του GTP και η οποία είναι ίδια σε όλες τις GTPάσες, και μια ελκώδη περιοχή που μεταφέρει το GTP στον πυρήνα της πρωτεΐνης. Η β υπομονάδα σχηματίζει δομή προπέλας με επτά λάμες και υδαρή πόρο στο κέντρο της. Η γ υπομονάδα σχηματίζει α-ελικοειδή δομή και συνδέεται με τη β υπομονάδα στην έβδομη λάμα της προπέλας (42,43,44). Η απεικόνιση των υπομονάδων φαίνεται στην εικόνα 1.7.



ΕΙΚΟΝΑ 1.7. ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΜΟΝΑΔΩΝ α, β, γ ΤΗΣ G ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (43).

1.3.2 G β ΥΠΟΜΟΝΑΔΑ.

Υπάρχουν έξι τύποι β υπομονάδων: G β 1, G β 2, G β 3, G β 4, G β 5 και G β 5s. Η G β υπομονάδα αποτελείται από δύο δομικά διακριτές περιοχές. Η μία περιοχή είναι το αμινοτελικό άκρο, το οποίο αποτελείται από είκοσι αμινοξέα και σχηματίζει α -έλικα. Η δεύτερη περιοχή περιλαμβάνει όλο το υπόλοιπο μόριο και αποτελείται από μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία σαράντα αμινοξέων. Η αλληλουχία ονομάζεται WD αλληλουχία και επαναλαμβάνεται επτά φορές στο μόριο της G β πρωτεΐνης. Η WD αλληλουχία σχηματίζει β -νήματα που τοποθετούνται σε μορφή προπέλας. Στο μόριο της G β υπομονάδας διακρίνονται επτά λάμες, καθεμιά από τις οποίες αποτελείται από τέσσερα β -νήματα (42,44). Η προπέλα της G β πρωτεΐνης φαίνεται στην εικόνα 1.8.



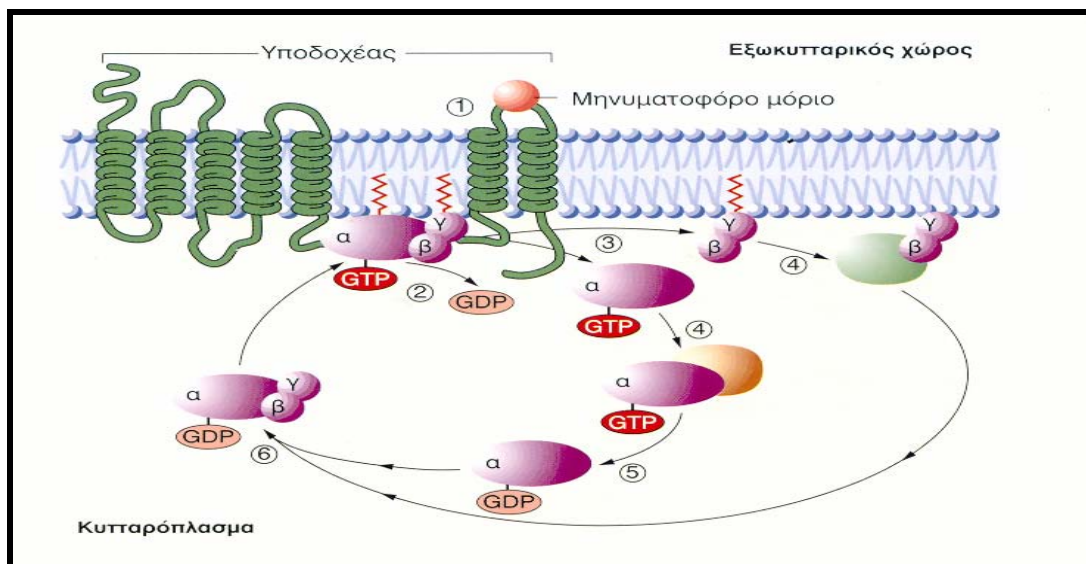
ΕΙΚΟΝΑ 1.8. ΟΙ ΥΠΟΜΟΝΑΔΕΣ β ΚΑΙ γ ΤΗΣ G ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (44).

1.3.3 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ G ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.

Οι G πρωτεΐνες δεσμεύονται ενδοκυτταρικά από υποδοχείς. Οι υποδοχείς των G πρωτεϊνών είναι η πολυπληθέστερη οικογένεια υποδοχέων. Πρόκειται για διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που διαπερνούν επτά φορές την πλασματική μεμβράνη. Χαρακτηριστικό αυτών των υποδοχέων είναι ότι δεσμεύουν διαφόρων τύπων μηνυματοφόρα μόρια, όπως πρωτεΐνες, πεπτίδια, παράγωγα αμινοξέων και λιπαρών οξέων (π.χ. ορμόνες, νευροδιαβιβαστές, φως, οσμή) (45).

1.3.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ-ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ G ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.

Όταν ένα μηνυματοφόρο μόριο συνδεθεί με τον υποδοχέα της G πρωτεΐνης, υφίσταται μια αλλαγή στη διαμόρφωσή του, με αποτέλεσμα την αλληλεπίδρασή του ενδοκυτταρικά με την G πρωτεΐνη. Η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί σε απελευθέρωση GDP από την α υπομονάδα της G πρωτεΐνης, και σύνδεσή της με GTP. Η αλλαγή αυτή οδηγεί στη μερική διάσπαση του συμπλόκου $G\alpha$ -GTP από το διμερές $G\beta\gamma$. Οι δύο ενεργοποιημένες υπομονάδες της πρωτεΐνης δρουν στους στόχους τους μεταφέροντας το μήνυμα. Στη συνέχεια η υδρόλυση του GTP σε GDP επαναφέρει την πρωτεΐνη στην αρχική ανενεργή της μορφή (43,45). Η λειτουργία των G πρωτεϊνών στη μεταβίβαση μηνυμάτων απεικονίζεται στην εικόνα 1.9.



ΕΙΚΟΝΑ 1.9. ΔΙΑΒΙΒΑΣΗ ΜΗΝΥΜΑΤΩΝ ΜΕΣΩ ΤΩΝ G ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (45).

Το σύστημα υποδοχέας-G πρωτεΐνη δεν είναι ταυτόσημο για όλα τα κύτταρα. Οι υποδοχείς και οι G πρωτεΐνες απαντούν σε διάφορες ισομορφές (G_s , G_i , G_q , G_{12} , G_{13}) με διαφορετική συγγένεια για τα μηνυματοφόρα μόρια, αλλά και για τους στόχους (45).

Οι στόχοι των G πρωτεϊνών είναι ένζυμα και διάλυτοι. Οι πιο χαρακτηριστικοί στόχοι που ανήκουν στην κατηγορία των ενζύμων είναι:

- Η αδενυλική κυκλάση που είναι υπεύθυνη για την παραγωγή cAMP.
- Η φωσφολιπάση C που είναι υπεύθυνη για την παραγωγή τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP3) και διακυλογλυκερόλης (DAG).
- Οι cGMP φωσφοδιεστεράσες (PDE) που διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στο μηχανισμό της όρασης.
- Η φωσφολιπάση A_2 που καταλύει την απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος από τα λιπίδια της μεμβράνης.

Οι πιο χαρακτηριστικοί στόχοι που ανήκουν στην κατηγορία των ιοντικών διαύλων είναι:

- Οι διάλυλοι των ιόντων καλίου της μεμβράνης των κυττάρων του μυοκαρδίου όταν στον υποδοχέα δεσμευτεί ακετυλοχολίνη.
- Οι διάλυλοι των ιόντων ασβεστίου της μεμβράνης των κυττάρων του μυοκαρδίου.
- Οι διάλυλοι των ιόντων νατρίου.
- Οι διάλυλοι ανταλλαγής Na^+/H^+ .
- Οι διάλυλοι των ιόντων χλωρίου στα καρδιακά και επιθηλιακά κύτταρα.

(42,44,45)

1.3.5 Gi ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ, ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ Na^+/H^+ ΚΑΙ ΥΠΕΡΤΑΣΗ.

Στα κύτταρα των θηλαστικών υπάρχει σύστημα ανταλλαγής Na^+/H^+ τόσο στην κυτταρική μεμβράνη, όσο και στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Έχουν βρεθεί έξι ισομορφές της πρωτεΐνης ανταλλαγής Na^+/H^+ (NHE1 – NHE6). Η ιοντοανταλλακτική πρωτεΐνη NHE απομακρύνει ενδοκυτταρικό H^+ σε ανταλλαγή με πρόσληψη εξωκυττάριου Na^+ . Η ανταλλαγή Na^+/H^+ είναι από τους πιο αποτελεσματικούς τρόπους εξουδετέρωσης της περίσσειας οξέος στα κύτταρα και είναι κρίσιμη για την ρύθμιση του κυτταρικού όγκου, την διατήρηση του κυττοπλασματικού pH και την επαναρρόφηση NaCl στο νεφρικό και εντερικό επιθήλιο (46).

Από τις ισομορφές (NHE1 – NHE6) της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης ανταλλαγής Na^+/H^+ , η NHE-1 εντοπίζεται σχεδόν σε όλα τα κύτταρα όλων των ιστών, ρυθμίζοντας το κυττοπλασματικό pH και τον κυτταρικό όγκο. Οι ισομορφές NHE-2, NHE-3 και NHE-4 εντοπίζονται κυρίως σε επιθηλιακά κύτταρα του γαστρεντερικού σωλήνα και των νεφρών. Αντίθετα, η ισομορφή NHE-5 εντοπίζεται σε μη επιθηλιακούς ιστούς, όπως στον εγκέφαλο, στον σπλήνα και στους σκελετικούς μύες. Η ισομορφή NHE-6 εντοπίζεται σε αρκετούς ιστούς, με μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στον εγκέφαλο και στους σκελετικούς μύες (46).

Σε αρκετές έρευνες έχει επιβεβαιωθεί αυξημένη ανταλλαγή Na^+/H^+ σε κύτταρα ασθενών με υπέρταση, που οφείλεται σε αυξημένη δραστηριότητα της NHE-1 ισομορφής σε πολλά κύτταρα και ιστούς, συμπεριλαμβανομένων ερυθροκυττάρων, λευκοκυττάρων, αιμοπεταλίων και σκελετικού μυός (47,48). Το εύρημα αυτό οδήγησε σε δύο εναλλακτικές υποθέσεις συσχέτισης της αυξημένης δραστηριότητας NHE με την παθογενετική διαδικασία που μπορεί να συμμετέχει στην υπέρταση. Η μία υπόθεση προτείνει πως η αυξημένη ανταλλαγή Na^+/H^+ στα νεφρά μπορεί να οδηγεί σε αυξημένη επαναρρόφηση Na^+ και να προκαλεί αύξηση του κυτταρικού όγκου και μειωμένη συγκέντρωση ρενίνης. Η εναλλακτική υπόθεση προτείνει ότι η αυξημένη δραστηριότητα της NHE αποτρέπει τα

κύτταρα από οξέωση κατά τη διαδικασία του πολλαπλασιασμού και πιθανόν να συμβάλλει στο σχηματισμό ανθεκτικών κυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα και εμφάνιση αριστερής κοιλιακής υπερτροφίας. Παρά τις μελέτες που επιβεβαιώνουν τις παραπάνω υποθέσεις, ο ακριβής μοριακός μηχανισμός της αυξημένης δραστηριότητας της NHE στην υπέρταση παραμένει αδιευκρίνιστος (49).

Η ρύθμιση της δραστηριότητας της NHE-1 ισομορφής γίνεται ενδοκυτταρικά και συστηματικά. Ενδοκυτταρικά, η ενεργοποίηση της NHE-1 γίνεται με φωσφορυλίωση από την πρωτεϊνική κινάση C και από ιόντα ασβεστίου μέσω καλμοδουλίνης. Επίσης, η NHE-1 πρωτεΐνη ενεργοποιείται και απενεργοποιείται απευθείας από G πρωτεΐνες. Συστηματικά, η NHE-1 πρωτεΐνη των ερυθροκυττάρων ενεργοποιείται από την ινσουλίνη, ενώ η μεταβολική οξέωση ενεργοποιεί το σύστημα NHE στα νεφρικά κύτταρα και στα λεμφοκύτταρα. Η NHE-1 πρωτεΐνη των κυττάρων αυξάνει τη δραστηριότητά της ύστερα από αυξημένη διατροφική πρόσληψη NaCl (48).

Μελέτες σε καλλιέργειες λεμφοβλαστών από υπερτασικά άτομα με αυξημένη δραστηριότητα της NHE-1 πρωτεΐνης, οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η αυξημένη ιοντοανταλλακτική δραστηριότητα δεν οφείλεται σε αυξημένη έκφραση της NHE-1, ούτε σε μετάλλαξη, ενώ αποκλείστηκε και η επίδραση των συστηματικών ρυθμιστών της λειτουργίας της (48). Περαιτέρω έρευνες από τον Siffert et.al. (50) απέδειξαν ότι η αυξημένη δραστηριότητα της NHE-1 σε λεμφοβλάστες υπερτασικών ατόμων οφείλεται σε αυξημένη ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών. Η ίδια έρευνα πιστοποίησε ότι πρόκειται για τις Gi πρωτεΐνες.

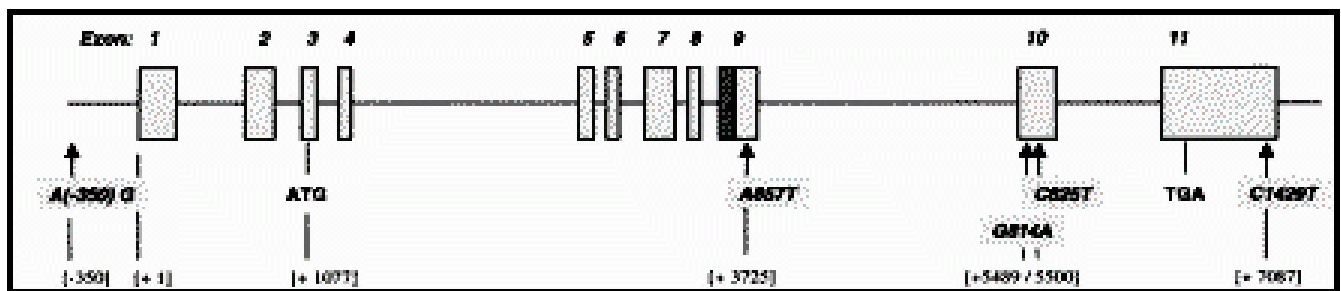
Μετάπειτα προσπάθειες για τη διευκρίνιση του αιτίου της αυξημένης ενεργοποίησης των Gi πρωτεϊνών οδήγησαν σε μελέτες σε γενετικό επίπεδο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτών των μελετών (51) δεν βρέθηκαν μεταλλάξεις στις υπομονάδες Gai2, Gai3, Gβ2 και Gβ4 των Gi πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, το ενδιαφέρον για την αυξημένη ενεργοποίηση των Gi πρωτεϊνών, με επακόλουθη αυξημένη δραστηριότητα της NHE-1 πρωτεΐνης σε υπερτασικά άτομα, στράφηκε στην υπομονάδα Gβ3 και το γονίδιο που την κωδικοποιεί (GNβ3).

1.4 ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ GNβ3.

1.4.1 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ.

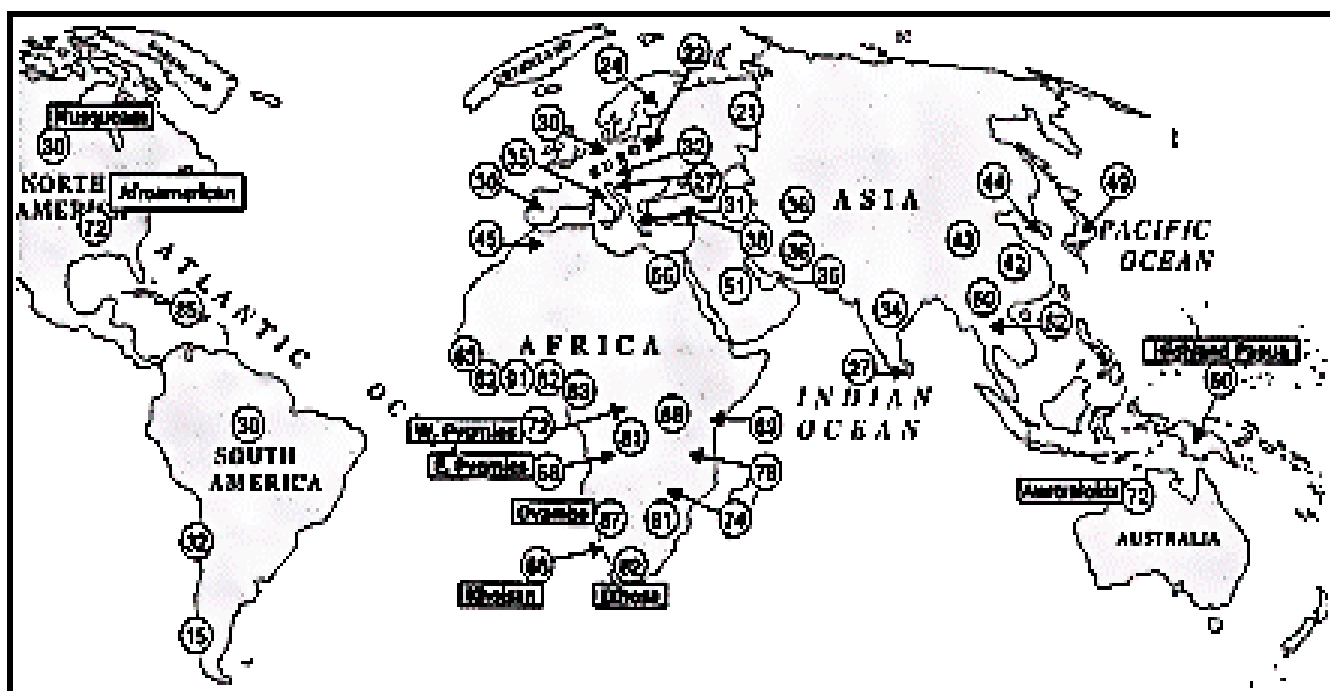
Το γονίδιο GNβ3 κωδικοποιεί την β3 υπομονάδα των Gi πρωτεϊνών. Εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12 στη θέση 12p13. Έχει μήκος 7,5kb και αποτελείται από 11 εξόνια και 10 εσόνια. Ο υποκινητής του γονιδίου ανήκει στην κατηγορία των υποκινητών που δεν έχουν την αλληλουχία TATA (TATA box), αλλά διαθέτει περιοχές πλούσιες σε κυτοσίνη και γουανίνη (52).

Στο γονίδιο GNβ3 έχουν βρεθεί πέντε πολυμορφισμοί. Στην εικόνα 1.10 απεικονίζεται το γονίδιο με τους πολυμορφισμούς του (52).



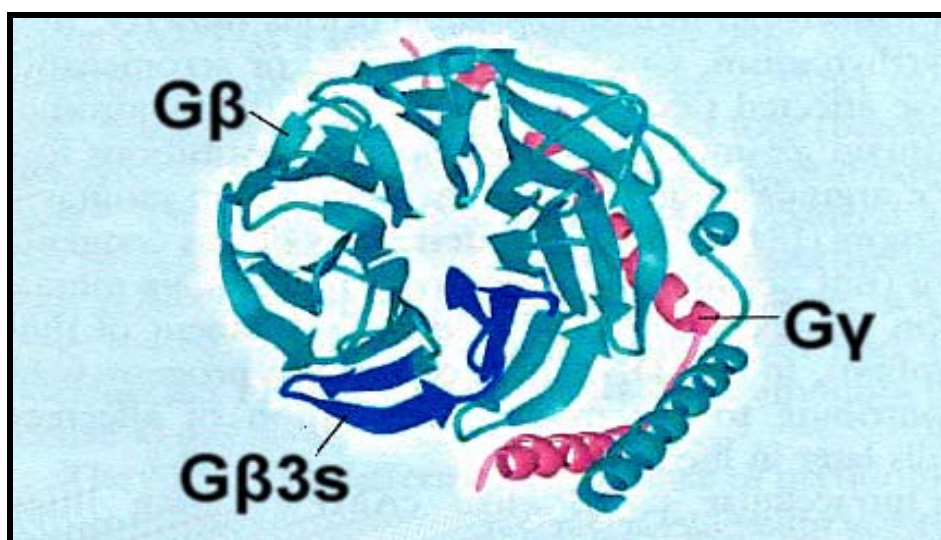
ΕΙΚΟΝΑ 1.10. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ GNβ3 (52).

- Ο πολυμορφισμός A(-350)G στην περιοχή του υποκινητή με άγνωστη λειτουργική σημασία. Το αλληλόμορφο G εμφανίζεται σε συχνότητα 76% στους Αφρικανούς, 97% στους Κινέζους και 61% στους Γερμανούς.
- Ο πολυμορφισμός A657T. Δεν φαίνεται να προκαλεί αλλαγή στην αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης. Το αλληλόμορφο T εμφανίζεται σε συχνότητα 0,5% στους Αφρικανούς και 2,4% στους Κινέζους.
- Ο πολυμορφισμός G814A. Προκαλεί αντικατάσταση του αμινοξέος γλυκίνη από σερίνη στη θέση 272 της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης. Η αντικατάσταση αυτή δεν έχει βρεθεί να έχει βιοχημική σημασία και δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι μεταβάλλει τη λειτουργία της πρωτεΐνης. Το αλληλόμορφο A εμφανίζεται σε συχνότητα 10% στους Γερμανούς, 2% στους Αφρικανούς και 0,5% στους Κινέζους.
- Ο πολυμορφισμός C1429T στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου. Το αλληλόμορφο T εμφανίζεται σε ποσοστό 38% στους Αφρικανούς, 17% στους Κινέζους και 30% στους Γερμανούς.
- Ο πολυμορφισμός C825T. Το αλληλόμορφο T εμφανίζεται σε ποσοστό 80% στους Αφρικανούς, 45% στους Ασιάτες και 30% στους λευκούς. Στην εικόνα 1.12 φαίνεται η παγκόσμια κατανομή του T αλληλομόρφου.



ΕΙΚΟΝΑ 1.12. ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΟΥ Τ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΥ (84).

Ο πολυμορφισμός C825T προκαλεί έλλειψη 41 αμινοξέων από την αλληλουχία της πρωτεΐνης. Η έλλειψη αυτή αντιστοιχεί σε μια ολόκληρη WD αλληλουχία. Η παραγόμενη πρωτεΐνη ονομάζεται Gβ3s και απεικονίζεται στην εικόνα 1.13, όπου τα μπλε βέλη δείχνουν την έλλειψη των 41 αμινοξέων (53).



ΕΙΚΟΝΑ 1.13. ΕΛΛΕΙΨΗ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΙΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟ C825T (53).

Ο πολυμορφισμός έχει συσχετιστεί με την ιδιοπαθή υπέρταση και την παχυσαρκία (52). Η αλληλουχία του γονιδίου GNβ3, καθώς και αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης Gβ3, φαίνονται στο παράρτημα Α.

1.4.2 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ C825T ΚΑΙ ΝΟΣΗΜΑΤΑ.

◆ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ C825T ΚΑΙ ΥΠΕΡΤΑΣΗ.

Ύστερα από την συσχέτιση της αυξημένης ιοντοανταλλακτικής δραστηριότητας Na^+/H^+ με την αυξημένη ενεργοποίηση των Gi πρωτεϊνών σε ασθενείς με ιδιοπαθή υπέρταση, το ενδιαφέρον των μελετών στράφηκε στον πολυμορφισμό C825T του γονιδίου GNB3. Ο πολυμορφισμός αυτός, που οδηγεί σε έλλειψη 41 αμινοξέων από την πρωτεΐνη Gβ3, βρέθηκε ότι σχετίζεται με αυξημένη δραστηριότητα των Gi πρωτεϊνών (54). Η υπόθεση ότι ο πολυμορφισμός C825T μπορεί να σχετίζεται με την υπέρταση εξετάστηκε από πολλούς ερευνητές, με αντικρουόμενα όμως αποτελέσματα.

Τρεις τουλάχιστον μελέτες “ασθενών-μαρτύρων”, δύο σε Καυκάσιους πληθυσμούς (55,56) και μία σε Ιάπωνες (57), επιβεβαίωσαν τη συσχέτιση του πολυμορφισμού με την υπέρταση. Σε πληθυσμιακή μελέτη Αφρικανών ατόμων που ζουν στην Αγγλία (n=428), βρέθηκε επίσης ισχυρή συσχέτιση του πολυμορφισμού C825T με την υπέρταση (58). Σε μια άλλη πληθυσμιακή έρευνα βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού με αυξημένα επίπεδα διαστολικής αρτηριακής πίεσης και μειωμένα επίπεδα ρενίνης πλάσματος (59). Σε συμφωνία με το παραπάνω εύρημα είναι και τα αποτελέσματα μελέτης σε υπερτασικά άτομα, όπου φάνηκε στατιστικά μεγαλύτερη απόκριση των φορέων του T αλληλόμορφου σε θειαζιδικά διουρητικά. Η μέση μείωση της διαστολικής και συστολικής αρτηριακής πίεσης ήταν μεγαλύτερη κατά 5 και 6 mm Hg, αντίστοιχα, στους TT από τους CC ομοζυγώτες (60).

Αντίθετα, σε μελέτη “ασθενών-μαρτύρων” στην Ιαπωνία (n=1233) δεν βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού C825T με την αρτηριακή πίεση (61). Το εύρημα αυτό επιβεβαιώθηκε και από πληθυσμιακή έρευνα στην Ιαπωνία, στην οποία όμως βρέθηκε συσχέτιση του T αλληλόμορφου με αυξημένα επίπεδα καλίου πλάσματος και ολικής χοληστερόλης (62). Σε έρευνα με δείγμα γαλλικού πληθυσμού από τις έρευνες ECTIM και PEGASE δεν βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού με την υπέρταση (63). Ωστόσο για την συγκεκριμένη μελέτη υπάρχουν ενστάσεις όσον αφορά στην ταξινόμηση του δείγματος, αφού υπερτασικοί θεωρήθηκαν μόνο όσοι είχαν διαστολική αρτηριακή πίεση ≥ 95 mm Hg ή λάμβαναν αντιυπερτασική αγωγή (64). Σε ακόμη μία έρευνα με δείγμα Αφρικανοαμερικάνων (n=904) δεν συσχετίστηκε ο πολυμορφισμός C825T με την υπέρταση (65). Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξε και πληθυσμιακή προοπτική μελέτη με δείγμα (n=903) Φιλανδών αντρών (66). Μελέτη σε 174 ασθενείς με υπερτασική κρίση σε κλινική της Αυστρίας δεν έδειξε συσχέτιση του πολυμορφισμού με την ιδιοπαθή υπέρταση ή την υπερτασική κρίση (67).

Σε έρευνα με δείγμα νεαρών ενήλικων ατόμων του πληθυσμού Oji-Cree στον Καναδά με φυσιολογικά επίπεδα αρτηριακής πίεσης, βρέθηκε συσχέτιση του TT γονότυπου με χαμηλότερα επίπεδα συστολικής αρτηριακής πίεσης σε σχέση με τους άλλους γονότυπους (CT,CC) (68). Σε νεαρά

ενήλικα άτομα με φυσιολογική αρτηριακή πίεση στο Βερολίνο πραγματοποιήθηκε έρευνα παρέμβασης με διαιτητικό πρωτόκολλο υψηλής και χαμηλής πρόσληψης σε αλάτι. Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής δεν επιβεβαίωσαν συσχέτιση του πολυμορφισμού C825T με την ανταπόκριση του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης και με την αρτηριακή πίεση σε διαφορετικές προσλήψεις αλατιού (69).

◆ **ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ C825T ΚΑΙ ΑΛΛΕΣ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ.**

Η σχέση του πολυμορφισμού C825T με τη δομή και λειτουργία της αριστερής κοιλίας διερευνήθηκε σε τρεις τουλάχιστον μελέτες. Στην πρώτη έρευνα, με δείγμα 86 άτομα με ιδιοπαθή υπέρταση στην Ισπανία, βρέθηκε συσχέτιση του T αλληλόμορφου με υπερτροφία της αριστερής κοιλίας (70). Στη δεύτερη έρευνα, με δείγμα 207 νεαρά ενήλικα άτομα με μέτρια υπέρταση στην Ιταλία, βρέθηκε συσχέτιση του T αλληλόμορφου με αυξημένο δείκτη μάζας της αριστερής κοιλίας (71). Αντίθετα, στην τρίτη έρευνα με δείγμα 1720 άτομα στη Γερμανία, δεν βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού C825T με τη δομή και λειτουργία της αριστερής κοιλίας (72).

Σε έρευνα παρέμβασης στην Γερμανία, βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού με αυξημένη στεφανιαία αγγειοσυστολή λόγω αυξημένης ενεργοποίησης των α_2 -αδρενεργικών υποδοχέων (73). Ακόμη, έχει αποδειχτεί συσχέτιση του αλληλόμορφου 825T με αυξημένη ενεργοποίηση των διαύλων καλίου, που οδηγεί σε αυξημένη διαπερατότητα των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων σε ιόντα καλίου (74).

Ο πολυμορφισμός C825T έχει συσχετιστεί με ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο σε μεσήλικες Αμερικανούς ανεξάρτητα από τους παράγοντες κινδύνου για τη νόσο (75). Σε σχέση με το οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου, δεν βρέθηκε συσχέτιση του αλληλόμορφου T με τη νόσο. Όταν όμως εξετάστηκε το αλληλόμορφο T σε συνδυασμό με το αλληλόμορφο D (του γονιδίου που κωδικοποιεί το ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης) για το οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου, τα αποτελέσματα ήταν στατιστικά σημαντικά (76).

◆ **ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ C825T ΚΑΙ ΝΕΦΡΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ.**

Σε έρευνα με δείγμα Καυκάσιων φοιτητών στη Γερμανία, με φυσιολογική αρτηριακή πίεση ή μέτρια υπέρταση, ελέγχθηκε η συσχέτιση του πολυμορφισμού C825T με τη νεφρική λειτουργία. Τα αποτελέσματα έδειξαν συσχέτιση του T αλληλόμορφου με αυξημένη νεφρική ροή πλάσματος (77). Στην ίδια έρευνα επισημαίνεται ο ρόλος των νεφρικών αιμοδυναμικών αλλαγών στην εξέλιξη της υπέρτασης.

Σε σχέση με τα νεφρικά μοσχεύματα, έχει βρεθεί συσχέτιση του πολυμορφισμού με μειωμένη επιβίωση νεφρικού μοσχεύματος όταν ο δότης είναι ομόζυγος για το αλληλόμορφο T (78). Αντίθετα,

η παρουσία του πολυμορφισμού στον δέκτη νεφρικού μοσχεύματος δεν έχει βρεθεί να επηρεάζει την αρτηριακή πίεση ή την πρώιμη δυσλειτουργία του μοσχεύματος (79). Ωστόσο, στην ίδια έρευνα φάνηκε να σχετίζεται το T αλληλόμορφο με την χρόνια σπειραματονεφρίτιδα.

◆ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ C825T ΚΑΙ ΔΙΑΒΗΤΙΚΗ ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑ.

Μελέτες έδειξαν αυξημένη δραστηριότητα της πρωτεΐνης ανταλλαγής Na^+/H^+ (NHE) λόγω αυξημένης ενεργοποίησης Gi πρωτεϊνών, σε καλλιέργειες κυττάρων από ασθενείς με διαβήτη τύπου 1 και νεφροπάθεια και από ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 (49). Το εύρημα αυτό οδήγησε στην υπόθεση ότι το T αλληλόμορφο μπορεί να αποτελεί γενετικό δείκτη για την πρόβλεψη του χρόνου έναρξης διαβητικής νεφροπάθειας. Ο έλεγχος αυτής της υπόθεσης οδήγησε σε αντικρουόμενα αποτελέσματα.

Σε έρευνα με Αμερικανούς διαβητικούς τύπου 1 παρουσία και απουσία νεφροπάθειας, δεν βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού C825T με τη διαβητική νεφροπάθεια στο διαβήτη τύπου 1 (80). Αντίθετα, σε έρευνα με Γερμανούς νεφροπαθείς διαβητικής ή όχι αιτίας, βρέθηκε αυξημένη συχνότητα του T αλληλόμορφου στους ασθενείς με νεφροπάθεια και διαβήτη τύπου 2 (81). Τέλος, σε μια έρευνα "ασθενών-μαρτύρων" που περιελάμβανε Καυκάσιους ασθενείς με διαβήτη τύπου 1 και νεφροπάθεια, ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 και νεφροπάθεια και υγιή άτομα, δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση του πολυμορφισμού με την εξέλιξη του διαβήτη ή τις νεφρικές επιπλοκές του (82).

◆ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ C825T ΚΑΙ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ.

Ο πολυμορφισμός C825T έχει συσχετιστεί με αυξημένη αποθήκευση λίπους σε δείγμα 213 υγιών ατόμων του πληθυσμού Inuit του Καναδά (83). Η συσχέτιση του αλληλομόρφου T με την παχυσαρκία ($\Delta\text{M.S.} > 27 \text{ kg/m}^2$) διερευνήθηκε σε δείγμα Γερμανών, Κινέζων και Νοτιοαφρικανών αντρών ηλικίας 18-30 ετών. Η συσχέτιση βρέθηκε και στους τρεις πληθυσμούς, παρά τις διαφορετικές διατροφικές συνήθειες (84). Σε μια πρόσφατη έρευνα σε παχύσαρκα άτομα βρέθηκε πως το T αλληλόμορφο μειώνει το ποσό της παραγόμενης Gβ3 υπομονάδας των Gi πρωτεϊνών στα λιπώδη κύτταρα. Αυτό φάνηκε να παρεμποδίζει τη μεταβίβαση του σήματος για λιπόλυση προς τους β_1 , β_2 και α_2 αδρενεργικούς υποδοχείς. Στην ίδια έρευνα επισημαίνεται πως το εύρημα αυτό ίσως να είναι χαρακτηριστικό του γονιδίου GNβ3 για το λιπώδη ιστό, αφού το αλληλόμορφο T φαίνεται να αυξάνει τη λειτουργία των Gi πρωτεϊνών στα κύτταρα άλλων ιστών (85).

Αντίθετα, στην πληθυσμιακή προοπτική μελέτη με δείγμα ($n=903$) Φιλανδών αντρών δεν βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού με το δείκτη μάζας σώματος (66).

1.5 Η ΕΡΕΥΝΑ “ΑΤΤΙΚΗ”.

Η έρευνα “ΑΤΤΙΚΗ” αποτελεί μια προοπτική μελέτη παρακολούθησης δείγματος του γενικού πληθυσμού που διεξάγεται από την καρδιολογική κλινική της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών σε συνεργασία με το Ιπποκράτειο νοσοκομείο Αθηνών. Στόχος της μελέτης είναι η καταγραφή των τιμών διαφόρων δημογραφικών, βιοχημικών, κλινικών, γενετικών, διατροφικών και ψυχολογικών παραμέτρων σε αντιπροσωπευτικό και τυχαία επιλεγμένο δείγμα του νομού Αττικής. Παράλληλα, στόχος είναι η προοπτική παρακολούθηση των ατόμων της μελέτης κάθε πέντε χρόνια και για συνολικό χρόνο παρακολούθησης εικοσιπέντε ετών, έτσι ώστε να αποτιμηθεί ο ρόλος που έχουν οι διερευνούμενοι παράγοντες στον κίνδυνο, θανατηφόρας ή μη, εκδήλωσης καρδιαγγειακής νόσου (στεφανιαία νόσος και εγκεφαλικά επεισόδια) και καρκίνου στον Ελληνικό πληθυσμό.

Το δείγμα της μελέτης αποτελείται από 3073 ενήλικα άτομα (48% άντρες και 52% γυναίκες) του νομού Αττικής. Σύμφωνα με επιδημιολογικά στοιχεία, ο νομός Αττικής καταγράφει ένα γενικό τύπο του σύγχρονου Έλληνα, καθώς αποτελείται από άτομα αστικών, ημιαστικών και αγροτικών περιοχών. Παράλληλα αποτελεί το 40% του γενικού πληθυσμού της χώρας. Το τυχαίο δείγμα της μελέτης είναι αντιπροσωπευτικό γιατί έχει σχεδιαστεί με βάση τις αρχές της πολυδιάστατης δειγματοληψίας και αφορά ολόκληρο τον πληθυσμό της γεωγραφικής περιφέρειας του νομού Αττικής.

Οι κυριότεροι παράγοντες που μελετώνται είναι:

- ❖ Δημογραφικά στοιχεία (φύλο, ηλικία, διαμονή, επάγγελμα).
- ❖ Σωματομετρικά στοιχεία (βάρος, ύψος, περιφέρεια μέσης και γοφών).
- ❖ Καθημερινές ατομικές συνήθειες (φυσική άσκηση, κατανάλωση αλκοόλ, κάπνισμα).
- ❖ Διατροφικές συνήθειες (με βάση πλήρες διατροφικό προφίλ, όπως διερευνάται από το ερωτηματολόγιο της Ευρωπαϊκής μελέτης ΕΠΙΚ που συντονίζεται από το εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών).
- ❖ Ιατρικό οικογενειακό ιστορικό (αναφορικά με την καρδιαγγειακή νόσο και τους άλλους παράγοντες κινδύνου).
- ❖ Πιθανές φαρμακευτικές αγωγές.
- ❖ Νοσηρότητα.
- ❖ Γενετικοί δείκτες.
- ❖ Ψυχολογική εκτίμηση.
- ❖ Εργαστηριακά ευρήματα, όπως αυτά προκύπτουν από πλήρεις αιματολογικές εξετάσεις και ηλεκτροκαρδιογράφημα.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.

2.1 ΣΚΟΠΟΣ.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανίχνευση του πολυμορφισμού C825T στο εξόνιο 10 του γονιδίου GNβ3 στη θέση 12ρ13 του γονιδιώματος σε άτομα του δείγματος της έρευνας ‘‘ΑΤΤΙΚΗ’’ και η συσχέτιση του πολυμορφισμού με εργαστηριακές παραμέτρους (αμυλοειδή, ομοκυστεΐνη, C αντιδρώσα πρωτεΐνη, ολική χοληστερόλη, γλυκόζη νηστείας, HDL χοληστερόλη, λιποπρωτεΐνη α, απολιποπρωτεΐνη Β, απολιποπρωτεΐνη Α1, ινωδογόνο και οξειδωμένη LDL χοληστερόλη), με τα επίπεδα συστολικής και διαστολικής αρτηριακής πίεσης και με το δείκτη μάζας σώματος. Επίσης, σκοπός της μελέτης είναι και η εύρεση της συχνότητας εμφάνισης του πολυμορφισμού στον Ελληνικό πληθυσμό.

2.2 ΔΕΙΓΜΑ.

Το δείγμα αποτελούσαν 400 άτομα από τον πληθυσμό της μελέτης ‘‘ΑΤΤΙΚΗ’’. Το δείγμα της μελέτης ‘‘ΑΤΤΙΚΗ’’ περιλαμβάνει 3073 άτομα ηλικίας 18-88 ετών. Εξ αυτών 1475 είναι άνδρες (48%) και οι 1598 γυναίκες (52%). Το δείγμα είναι τυχαίο και αντιπροσωπευτικό του πληθυσμού της γεωγραφικής περιφέρειας του νομού Αττικής. Με βάση την πληθυσμιακή στρωματοποίηση της Εθνικής Στατιστικής Υπηρεσίας της Ελλάδος (ΕΣΥΕ, 1991) δημιουργήθηκαν «χάρτες» ανά περιοχή μελέτης έτσι ώστε να προσδιορίζεται επακριβώς ο πληθυσμός στόχος. Η συνεισφορά των περιοχών της Αττικής στην μελέτη είναι η ακόλουθη: Δήμος Αθηναίων (20%), Δήμος Πειραιώς (8%), ευρύτερη περιφέρεια πρωτευούσης (41%), Υπόλοιπο Αττικής (29%) και νήσοι (2%). Η επιλογή των ατόμων έγινε κατά τρόπο ώστε να επιλέγεται (τυχαία) ένα άτομο ανά οικογένεια, οικοδομικό συγκρότημα και τετράγωνο.

2.3 ΣΥΛΛΟΓΗ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ.

Τα στοιχεία συγκεντρώθηκαν σε ειδικό ερωτηματολόγιο και έπειτα κωδικοποιήθηκαν σε στατιστική βάση δεδομένων που σχεδιάστηκε για το σκοπό αυτό. Τα ερωτηματολόγια της μελέτης είναι εμπιστευτικά, απλά και γρήγορα προσπελάσιμα.

➤ **Ανθρωπομετρικές παράμετροι:** Το ύψος των ατόμων μετρήθηκε μια φορά. Τα άτομα του δείγματος ήταν χωρίς παπούτσια, με την πλάτη ίσια και ακουμπισμένη σε μεζούρα του τοίχου και τα μάτια να κοιτάζουν ίσια εμπρός. Χρησιμοποιήθηκε ορθογώνιο τρίγωνο με τη μια κάθετη πλευρά του να εφάπτεται στο τριχωτό της κεφαλής του ατόμου και την άλλη στον τοίχο. Εξασφαλίστηκε έτσι ο

οπτικός άξονας να είναι οριζόντιος αφού η άνω πλευρά του έξω ακουστικού πόρου βρίσκεται στο ίδιο επίπεδο με τη κάτω πλευρά του οφθαλμικού κόγχου. Οι μετρήσεις στρογγυλοποιήθηκαν στο πλησιέστερο 0,5 cm του μέτρου. Το βάρος των ατόμων επίσης μετρήθηκε μια φορά. Τα άτομα ήταν χωρίς παπούτσια και με ελαφρά εσωτερική ένδυση. Η ζυγαριά ρυθμιζόταν και ελεγχόταν πριν και μετά από κάθε ζύγιση. Οι μετρήσεις στρογγυλοποιήθηκαν στη πλησιέστερη εκατοντάδα γραμμαρίων. Ο δείκτης μάζας σώματος υπολογίστηκε σαν βάρος (Kg) / ύψος² (m²).

➤ **Βιοχημικές παράμετροι:** Μετά από 12ώρη νηστεία των εξεταζομένων ατόμων, λήφθηκε αίμα για: (α) γενική εξέταση αίματος με χρήση αυτόματου αιματολογικού αναλυτή H1 ή H2 της Medicon, (β) βιοχημικό έλεγχο που περιελάμβανε ουρία, κρεατινίνη, ολική χοληστερόλη (TC), HDL-C, LDL-C, τριγλυκερίδια (TG), με τη χρήση αυτόματου βιοχημικού αναλυτή RA 1000 της Techikon (χρωματομετρική ενζυματική μέθοδος), (γ) προσδιορισμό ApoA1 και ApoB, Lp(a), C αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), ινωδογόνου, με αυτόματο νεφελόμετρο BNII της Dade Behring και (δ) προσδιορισμό ομοκυστεΐνης (Hcy) με αυτόματο ανοσολογικό αναλυτή Axsym της Abbott (τεχνολογία του πολωμένου ανοσοφθορισμού, FPIA). Παράλληλα έγινε φύλαξη δείγματος στους -80° C για μελλοντική χρήση και γενετικό έλεγχο.

➤ **Κλινικές παράμετροι:** Η αρτηριακή πίεση μετρήθηκε στο αριστερό χέρι έχοντας τα άτομα σε καθιστή θέση και σε ήρεμη κατάσταση. Έγιναν τρεις μετρήσεις και υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους. Αν για κάποιο λόγο η μέτρηση έγινε στο δεξί χέρι αυτό σημειώθηκε στο ερωτηματολόγιο του ατόμου. Επίσης σημειώθηκε, αν ψηλαφώντας τις κερκιδικές αρτηρίες άμφω, διαπιστώθηκε διαφορά στο σφυγμό στα δυο χέρια, οπότε μετρήθηκε η αρτηριακή πίεση και στο δεξί χέρι. Η τιμή της συστολικής πίεσης αντιστοιχεί στη τιμή που δείχνει το πιεσόμετρο όταν ακουστεί ο πρώτος ήχος. Η τιμή της διαστολικής πίεσης καθορίστηκε όταν ο ήχος σταμάτησε να ακούγεται ρυθμικός και ακούστηκε συνεχόμενος. Ο χρόνος μεταξύ των μετρήσεων ήταν ακριβώς όσος χρειαζόταν για να καταγραφεί η προηγούμενη μέτρηση και αφού η περιχειρίδα του πιεσόμετρου ξεφουσκωνόταν εντελώς. Το σφυγμομανόμετρο που χρησιμοποιήθηκε είχε ελεγχθεί πρόσφατα και η στήλη του υδραργύρου ήταν στο 0 mmHg της κλίμακας, όταν η περιχειρίδα ήταν εντελώς ξεφουσκωμένη. Ως υπερτασικά χαρακτηρίστηκαν τα άτομα που είχαν συστολική αρτηριακή πίεση ≥ 140 mm Hg, ή/και διαστολική αρτηριακή πίεση ≥ 90 mm Hg ή λάμβαναν κάποια αντιυπερτασική φαρμακευτική αγωγή.

➤ **Αποτίμηση του τρόπου ζωής:** Τα άτομα ομαδοποιήθηκαν με βάση την σωματική τους δραστηριότητα σε τρεις κατηγορίες. Στην κατηγορία I συμπεριλήφθηκαν τα άτομα που δεν ασκούνταν καθόλου, στην κατηγορία II αυτά που ασκούνταν λίγο και στην κατηγορία III αυτά που ασκούνταν συστηματικά. Η κατάταξη έγινε με βάση τις απαντήσεις των ατόμων σε ανάλογες ερωτήσεις σχετικές για οποιαδήποτε μορφή σωματικής άσκησης που δεν σχετιζόταν με το κύριο επάγγελμα. Οι σχετικές πληροφορίες σχετικά με τις καπνιστικές συνήθειες συλλέχθηκαν με βάση τυποποιημένο

ερωτηματολόγιο που σχεδιάστηκε για τη μελέτη και το οποίο διερευνούσε τα έτη καπνίσματος, τον ημερήσιο αριθμό τσιγάρων, τα αίτια διακοπής καθώς επίσης και την έκθεση σε παθητικό κάπνισμα.

2.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA.

Η απομόνωση DNA έγινε από λευκοκύτταρα ολικού αίματος (5-6ml) με τη μέθοδο NaCl. Τα βήματα της μεθόδου περιγράφονται παρακάτω:

ΗΜΕΡΑ 1^η.

1. Απομάκρυνση πλάσματος με πλαστική πιπέτα Pasteur μετά από φυγοκέντριση (10min, 3000rpm).
2. Μεταφορά 3ml κυττάρων αίματος σε σωλήνα Falcon 50ml.
3. Προσθήκη διαλύματος Lysis I (αραιωμένο 1x) μέχρι τελικό όγκο 50ml.
4. Ισχυρή ανακίνηση και επώαση σε πάγο για 20min (ανακίνηση και κατά τη διάρκεια των 20min).
5. Φυγοκέντριση (10min, 2000rpm).
6. Απομάκρυνση υπερκείμενου.
7. Προσθήκη 25ml Lysis I (αραιωμένο 1x) και ισχυρή ανακίνηση για διάλυση ιζήματος.
8. Φυγοκέντριση (10min, 2500rpm).
9. Απομάκρυνση υπερκείμενου.
10. Προσθήκη 3ml διαλύματος LysisII και ισχυρή ανακίνηση.
11. Προσθήκη 50μl πρωτεΐνης K (20mg/ml).
12. Προσθήκη 150μl SDS 20% και ήπια ανάδευση.
13. Επώαση στους 56°C σε υδατόλουτρο.

ΗΜΕΡΑ 2^η.

1. Μεταφορά διαλύματος σε σωλήνα Falcon 15ml.
2. Προσθήκη 1ml NaCl 6M και ισχυρή ανακίνηση για 15-20sec.
3. Φυγοκέντριση (10min, 3000rpm). Με την φυγοκέντριση παρουσία της μεγάλης συγκέντρωσης άλατος που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες, γίνεται κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Το DNA είναι διαλυτό σε διαλύματα αλάτων.
4. Ισχυρή ανακίνηση για διάλυση του ιζήματος και φυγοκέντριση (10min, 3000rpm).
5. Μεταφορά υπερκείμενου σε σωλήνα Falcon 50ml.
6. Προσθήκη 2,5 φορές του όγκου σε αιθανόλη 96% και ήπια ανάδευση. Σε αυτή τη φάση γίνεται ορατό το DNA. Συγκέντρωση DNA σε κουβάρι σε roller bench.
7. Απομάκρυνση DNA από το διάλυμα με πιπέτα Pasteur, της οποίας το άκρο έχει κλείσει με θέρμανση.

8. Πλύσιμο του DNA (εμβάπτιση της πιπέτας σε 70% αιθανόλη) και στέγνωμα (20min). Το επιπλέον βήμα καθαρισμού με αιθανόλη χρειάζεται για την απομάκρυνση άλατος που έχει καταβυθιστεί με την αιθανόλη.
9. Μεταφορά του DNA σε σωλήνα erppendorf που περιέχει 0,5ml διαλύματος TE.
11. Διαλυτοποίηση DNA σε roller bench και αποθήκευση (4°C).

2.5 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR).

Μετά την απομόνωση ακολούθησε εφαρμογή της μεθόδου PCR (86), η οποία χρησιμεύει στην εκλεκτική αντιγραφή κατά εκατομμύρια φορές ειδικών τμημάτων DNA. Η μέθοδος είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και επιτρέπει τη γρήγορη ανάλυση περιοχών του DNA που περιέχονται σε ένα πολύ μικρό δείγμα. Πρόκειται για μία αντίδραση πολυμερισμού, η οποία μιμείται in vitro τον τρόπο με τον οποίο τα ένζυμα του πυρήνα (DNA πολυμεράσες) αντιγράφουν το DNA του κυττάρου. Η εφαρμογή της μεθόδου προϋποθέτει να είναι γνωστή η νουκλεοτιδική αλληλουχία που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Η αλληλουχία αυτή χρησιμοποιείται για το σχεδιασμό δύο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, ενός συμπληρωματικού προς το 3' άκρο της μιας αλυσίδας του DNA και ενός συμπληρωματικού προς το 3' άκρο της άλλης αλυσίδας. Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά μήκους 20-30 βάσεων χρησιμοποιούνται ως πρωταρχικά τμήματα (εκκινητές-primers) για in vitro σύνθεση DNA και οριοθετούν τα άκρα του τελικού προϊόντος. Παρουσία περίσσειας των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ιόντων μαγνησίου και της κατάλληλης DNA πολυμεράσης επιτυγχάνεται η αντίδραση πολυμερισμού. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται για τον πολυμερισμό είναι η Taq πολυμεράση, η οποία απομονώνεται από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και είναι ανθεκτική στις υψηλές θερμοκρασίες. Η πολυμεράση αυτή παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ενεργότητα πολυμερισμού στους 72°C, ενώ παραμένει ενεργή σε θερμοκρασία μέχρι 95°C.

Η τεχνική της PCR περιλαμβάνει την κυκλική επανάληψη τριών αντιδράσεων:

1. **Αποδιάταξη** (template denaturation). Το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται σε μονόκλωνες αλυσίδες σε υψηλή θερμοκρασία (94-96°C).
2. **Σύνδεση εκκινητών** (primer annealing). Οι δύο εκκινητές συνδέονται με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες που βρίσκονται στις δύο αλυσίδες του DNA. Η σύνδεση αυτή πραγματοποιείται σε θερμοκρασία που εξαρτάται αποκλειστικά από την αλληλουχία των εκκινητών.
3. **Επιμήκυνση** (primer extension). Στο στάδιο αυτό γίνεται σύνθεση DNA με επιμήκυνση των εκκινητών κατά την 5'-3' κατεύθυνση, χρησιμοποιώντας τα νουκλεοτίδια που βρίσκονται στο

διάλυμα και έχοντας ως καλούπι τις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA. Η αντίδραση πολυμερισμού καταλύεται από την Taq DNA πολυμεράση και πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 72°C.

4. Οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες αποδιατάσσονται ξανά και οι μονόκλωνες αλυσίδες επανυβριδίζονται με τους εκκινητές και ο κύκλος αυτός επαναλαμβάνεται 25-35 φορές.

Το κύριο προϊόν της εκθετικής αυτής αντίδρασης είναι ένα δίκλωνο τμήμα DNA του οποίου τα άκρα ορίζονται από τα 5' άκρα των εκκινητών και έχει μήκος ίσο με την απόσταση των εκκινητών. Για παράδειγμα 30 κύκλοι PCR δίνουν πολλαπλασιασμό της τάξης του εκατομμυρίου. Το προϊόν της PCR χρησιμοποιείται στη συνέχεια για τη μελέτη του τμήματος DNA που πολλαπλασιάστηκε.

Για την εφαρμογή της μεθόδου PCR στο εξόνιο 10 του γονιδίου GNβ3 χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια (75):

❖ **ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ.** Ο αριστερός εκκινητής (forward primer) είχε την αλληλουχία 5'-TGA CCC ACT TGC CAC CCG TGC-3' και ήταν σε ξηρή μορφή. Προστέθηκαν 322 μl απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού, έτσι ώστε η συγκέντρωση να είναι 100 pmol/μl. (stock solution)

Ο δεξιός εκκινητής (reverse primer) είχε την αλληλουχία 5'-GCA GCA GCC AGG GCT GGC-3' και ήταν σε μορφή σκόνης. Προστέθηκαν 639 μl απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού, έτσι ώστε η συγκέντρωση να είναι 100 pmol/μl. (stock solution)

Από τα διαλύματα των εκκινητών που σχηματίστηκαν (stock solutions), παρασκευάστηκαν νέα διαλύματα με αραίωση 1:8 (working solutions: 25 μl stock + 175 μl απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην PCR. Η τελική συγκέντρωση των διαλυμάτων ήταν 12,5 pmol/μl. Τα διαλύματα των εκκινητών (stock και working solutions) διατηρούνται σε θερμοκρασία -20°C.

❖ **Taq ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ.**

Χρησιμοποιήθηκε η Platinum Taq πολυμεράση και είχε συγκέντρωση 5 U/ μl. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C.

❖ **PCR BUFFER.**

Η συγκέντρωσή του ήταν 10X και περιείχε: 200 mM Tris-HCL (pH 8,4) και 500 mM KCL. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C.

❖ **ΔΙΑΛΥΜΑ MgCl₂.**

Η συγκέντρωσή του ήταν 50 mM. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C.

❖ **ΜΙΓΜΑ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ (dNTP's).**

Τα τέσσερα ολιγονουκλεοτίδια είχαν συγκέντρωση 100 mM το καθένα. Αναμίχθηκαν και μεταφέρθηκαν σε eppendorf. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C.

❖ **ΑΠΕΣΤΑΓΜΕΝΟ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΟ ΝΕΡΟ.**

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την πραγματοποίηση της PCR έχει ως εξής:

1. ΜΙΓΜΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΤΗΣ PCR.

Αρχικά παρασκευάζεται το μίγμα των αντιδραστηρίων της PCR. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 2.1. Τα αντιδραστήρια διατηρούνται σε πάγο σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Η ποσότητα από το κάθε αντιδραστήριο πολλαπλασιάζεται με τον αριθμό των δειγμάτων στα οποία θα γίνει PCR, συν 1 δείγμα για τυχόν απώλειες. Αφού παρασκευαστεί το μίγμα, αναδεύεται σε vortex και διατηρείται σε πάγο.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.1. ΜΙΓΜΑ ΓΙΑ PCR ΣΤΟ ΕΞΟΝΙΟ 10 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ GNβ3.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΟΓΚΟΣ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
Taq ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ	0,3 µl	1,5 Units
PCR BUFFER	2,5 µl	1X
MgCl ₂	1,25 µl	1,5 mM
dNTP's	0,2 µl	20 mM
ΔΕΞΙΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ	0,375 µl	4,6875 pmol
ΑΡΙΣΤΕΡΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ	0,375 µl	4,6875 pmol
ΝΕΡΟ ΑΠΕΣΤΑΓΜΕΝΟ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΟ	18 µl	

2. Το μίγμα χωρίζεται σε αποστειρωμένα erppendorf των 0,2 ml όσα και τα δείγματα. Σε κάθε erppendorf τοποθετούνται 23 µl από το μίγμα με πιπέτα και με το ίδιο αποστειρωμένο tip για να μειωθούν οι απώλειες. Τα erppendorf με το μίγμα διατηρούνται στον πάγο.

3. Σε κάθε erppendorf προστίθενται 2 µl DNA από τα δείγματα. Ο συνολικός όγκος του μίγματος για την PCR είναι 25 µl.

4. Τα erppendorf τοποθετούνται στην φυγόκεντρο (έως 8000 rpm για λίγα δευτερόλεπτα – short spin) ώστε να αναμιχθεί το μίγμα με το DNA και να μην υπάρχουν φυσαλίδες. Στη συνέχεια προστίθεται σε κάθε erppendorf μια σταγόνα mineral oil για να αποφευχθεί η εξάτμιση του μίγματος στις υψηλές θερμοκρασίες της PCR.

5. Τα erppendorf μεταφέρονται σε θερμικό κυκλοποιητή (μηχάνημα PCR) και ακολουθείται το ακόλουθο πρόγραμμα (75):

ΒΗΜΑ 1^ο: 94°C για 5 min

ΒΗΜΑ 2^ο: 94°C για 1 min

ΒΗΜΑ 3^ο: 60°C για 45 seconds

BHMA 4⁰: 72°C για 1 min

BHMA 5⁰: (BHMA 1⁰, BHMA 2⁰, BHMA 3⁰ ΚΑΙ BHMA 4⁰) x 35

BHMA 6⁰: 72°C για 7 min

BHMA 7⁰: 4°C αποθήκευση

2.6 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΤΥΧΙΑΣ PCR.

Ο έλεγχος της επιτυχίας της PCR γίνεται με ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στηρίζεται στο γεγονός ότι σε ουδέτερο pH το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο. Επομένως αν τοποθετηθούν τμήματα DNA στην κάθοδο (-), θα μετακινηθούν προς την άνοδο (+). Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA κατά μήκος των πηκτωμάτων εξαρτάται κυρίως από το μοριακό μέγεθος του DNA και τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Η ταχύτητα μετακίνησης του DNA είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους των κλασμάτων DNA που ηλεκτροφορούνται και αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης του πηκτώματος. Σημειώνεται τέλος, ότι χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορούμε να διαχωρίσουμε ένα μεγάλο εύρος μεγεθών DNA. Με συγκέντρωση 2% γίνεται διαχωρισμός γραμμικών τμημάτων DNA μήκους 0,1-3 Kb.

➤ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 2%.

- Ζυγίζονται 3 gr αγαρόζης και τοποθετούνται σε κωνική φιάλη.
- Προσθήκη 150 ml διαλύματος TBE 0,5X (Tris Borate Acid).
- Ταχεία θέρμανση μερικών λεπτών σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη.
- Αφού κρυώσει το διάλυμα προστίθενται 9μl διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου 10 mg/ml (EtBr) και αναδεύεται το διάλυμα.

Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μια φθορίζουσα χρωστική. Το μόριο του περιλαμβάνει έναν οριζόντιο δακτύλιο που έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA, με αποτέλεσμα το DNA να φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία μήκους κύματος 302-366 nm. Το αντιδραστήριο αυτό είναι καρκινογόνο.

- Το διάλυμα χύνεται στο εκμαγείο της ηλεκτροφορητικής συσκευής, αφού πρώτα έχουν τοποθετηθεί σε αυτό "χτένες" ώστε να δημιουργηθούν "πηγάδια" καθώς πηζει το πήκτωμα της αγαρόζης.
- Το διάλυμα αφήνεται να πηξει (~10 min).

- Αφού δημιουργηθεί το πήκτωμα αγαρόζης, αφαιρούνται οι “χτένες” από αυτό και προστίθεται στο δοχείο της ηλεκτροφόρησης ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X μέχρι την ένδειξη της ηλεκτροφορητικής συσκευής (fill line), ώστε να καλύπτεται πλήρως το πήκτωμα.

➤ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ.

- Σε μη αποστειρωμένα erppendorf των 0,5 ml μεταφέρονται 5 μl του προϊόντος PCR από κάθε δείγμα και σε ένα erppendorf τοποθετείται 1 μl μάρτυρα (DNA ladder 100bp). Το υπόλοιπο προϊόν της PCR διατηρείται στους 4 °C, ενώ ο μάρτυρας διατηρείται στους -20 °C.
- Σε όλα τα erppendorf προστίθενται 2 μl χρωστικής κυανού της ξυλόλης και φυγοκεντρούνται (short spin) για να αναμιχθεί η χρωστική με το προϊόν της PCR και το μάρτυρα.
- Στη συνέχεια, μεταφέρεται κάθε δείγμα με τη χρωστική σε ένα από τα “πηγάδια” του πηκτώματος, ενώ σε ένα από τα πηγάδια μεταφέρεται ο “μάρτυρας”.

➤ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΟΥ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ.

- Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 100 V για περίπου 20 λεπτά.
- Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα παρατηρείται στο υπεριώδες. Σε κάθε δείγμα φαίνεται μια ζώνη DNA, η οποία αντιπροσωπεύει το κομμάτι του DNA που πολλαπλασιάστηκε από την PCR. Το μήκος του κομματιού ελέγχεται σε σύγκριση με τον “μάρτυρα”, οπότε και ελέγχεται η επιτυχία της PCR.

2.7 ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΗ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗ.

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που παράγονται από βακτήρια. Λέγονται ενδονουκλεάσες γιατί κόβουν το DNA στο εσωτερικό του μορίου και όχι στα άκρα, ενώ λέγονται περιοριστικές επειδή η δραστηριότητά τους περιορίζεται σε “ξένο” DNA. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν ειδικές δίκλωνες αλληλουχίες DNA και κόβουν το μόριο μέσα ή κοντά στην αλληλουχία αναγνώρισης. Οι αλληλουχίες αναγνώρισης έχουν συνήθως μήκος 4-8 νουκλεοτίδια και συχνά είναι παλίνδρομες (“διαβάζονται” το ίδιο και από τις δύο κατευθύνσεις 5’-3’ και 3’-5’ του DNA). Τα τμήματα DNA που παράγονται από την πέψη με μια περιοριστική ενδονουκλεάση έχουν πάντα τα ίδια άκρα, είτε αυτά είναι προεξέχοντα (sticky ends), είτε όχι (blunt ends). Η συχνότητα και η θέση ανεύρεσης των αλληλουχιών αναγνώρισης οποιασδήποτε περιοριστικής ενδονουκλεάσης μέσα σε ένα μόριο DNA, εξαρτάται από την ακριβή αλληλουχία του δείγματος που εξετάζεται. Οι ιδιότητες των περιοριστικών ενδονουκλεασών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την χαρτογράφηση ενός συγκεκριμένου μορίου DNA με βάση τον εντοπισμό των θέσεων αναγνώρισης, αλλά και στην διαδικασία σύνδεσης τμημάτων DNA που περιέχουν τα ίδια προεξέχοντα άκρα ακόμη και αν αυτά προέρχονται από διαφορετικά δείγματα (86).

Τα περιοριστικά ένζυμα ποικίλουν ως προς τις συνθήκες άριστης δράσης τους. Οι παραλλαγές αυτές αναφέρονται στη θερμοκρασία επώασης και στη σύσταση του διαλύματος επώασης. Η επιλογή της κατάλληλης θερμοκρασίας είναι αυστηρή, ενώ οι διαφορές στη σύσταση των διαλυμάτων επώασης είναι μικρές. Τα ρυθμιστικά διαλύματα μέσα στα οποία γίνεται η αντίδραση της επώασης περιέχουν συνήθως Mg^{+2} που λειτουργεί ως συμπάροντας του ενζύμου, καθώς και Na^+ . Τα συστατικά των διαλυμάτων επώασης πρέπει να είναι καθαρά και απαλλαγμένα από νουκλεάσες. Οι σουλφιδριλικοί παράγοντες (β-μερκαπτοαιθανόλη, DTT κ.ά.) που προστίθενται αποσκοπούν στην αναστολή των νουκλεασών που ενδεχομένως συνυπάρχουν. Η προσθήκη BSA (αλβουμίνη ορού βοός) στην αντίδραση επώασης προφυλάσσει το ένζυμο από πρωτεάσες και άλλους παράγοντες, ωστόσο η προσθήκη ή όχι BSA καθορίζεται από το ένζυμο. Το DNA που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι απαλλαγμένο από προσμίξεις (όπως EDTA, SDS, φαινόλη, βρωμιούχο αιθίδιο) που μπορεί να παρεμποδίζουν τη δραστηριότητα του ενζύμου. Τα ένζυμα διατηρούνται στους $-20^{\circ}C$ μέσα σε διάλυμα που περιέχει 50% v/v γλυκερόλη (86).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε για την πέψη το ένζυμο **BsaJ I** (75). Αυτή η περιοριστική ενδονουκλεάση απομονώνεται από το στέλεχος *Bacillus stearothermophilus* J695. Η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου φαίνεται στην εικόνα 2.1.



ΕΙΚΟΝΑ 2.1. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ
ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ BsaJ I. ΤΑ ΒΕΛΗ
ΔΕΙΧΝΟΥΝ ΤΑ ΣΗΜΕΙΑ ΚΟΠΗΣ.

Για την πέψη του προϊόντος της PCR χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

❖ **ENZYMΟ BsaJ I.**

Η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 2.500 U/ml και διατηρείται σε θερμοκρασία $-20^{\circ}C$.

❖ **ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ (BUFFER 2).**

Το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer 2) ήταν σε συγκέντρωση 1X και περιείχε: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM dithiothreitol και είχε pH 7,9 στους $25^{\circ}C$.

❖ **ΑΠΕΣΤΑΓΜΕΝΟ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΟ ΝΕΡΟ.**

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την πραγματοποίηση της πέψης έχει ως εξής:

1. ΜΙΓΜΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΤΗΣ ΠΕΨΗΣ.

Αρχικά παρασκευάζεται το μίγμα αντιδραστηρίων της πέψης. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 2.2. Τα αντιδραστήρια διατηρούνται σε πάγο σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Η ποσότητα από το κάθε αντιδραστήριο πολλαπλασιάζεται με τον αριθμό των δειγμάτων στα οποία θα γίνει πέψη, συν 2 δείγματα για τυχόν απώλειες. Αφού παρασκευαστεί το μίγμα αναδεύεται σε vortex και διατηρείται σε πάγο.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.2. ΜΙΓΜΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΨΗ.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΟΓΚΟΣ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
ENZYMΟ BsaJ I	0,5 μl	1,25 U
BUFFER 2	2 μl	1X
ΑΠΕΣΤΑΓΜΕΝΟ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΟ ΝΕΡΟ	7,5 μl	

2. Το μίγμα χωρίζεται σε μη αποστειρωμένα erppendorf του 1,5 ml όσα και τα δείγματα. Σε κάθε erppendorf μεταφέρονται 10 μl από το μίγμα με πιπέτα και το ίδιο tip για να μειωθούν οι απώλειες. Τα erppendorf με το μίγμα της πέψης διατηρούνται σε πάγο.
3. Στα erppendorf προστίθενται 10 μl από το προϊόν της PCR κάθε δείγματος. Ο συνολικός όγκος μίγματος για την πέψη είναι 20 μl.
4. Τα erppendorf τοποθετούνται στην φυγόκεντρο (έως 8000 rpm για λίγα δευτερόλεπτα – short spin) ώστε να αναμιχθεί το διάλυμα επώασης του ενζύμου με το προϊόν της PCR. Στη συνέχεια προστίθεται σε κάθε erppendorf μια σταγόνα mineral oil για να αποφευχθεί η εξάτμιση του μίγματος στις υψηλές θερμοκρασίες επώασης.
5. Τα erppendorf τοποθετούνται σε εκκολαπτικό θάλαμο στους 60 °C για 2,5 ώρες.

2.8 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ ΤΗΣ ΠΕΨΗΣ.

Ο έλεγχος του προϊόντος της πέψης γίνεται με ηλεκτροφόρησή του σε πήκτωμα αγαρόζης 3%.

➤ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 3%.

Ακολουθείται ακριβώς η ίδια διαδικασία με την προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης 2% για τον έλεγχο επιτυχίας της PCR, όπως αυτή περιγράφεται στην ενότητα 2.6. Οι μόνες διαφοροποιήσεις είναι:

- Ζυγίζονται 4,5 gr αγαρόζης και τοποθετούνται στην κωνική φιάλη.
- Το διάλυμα αφήνεται να πήξει για ~20 min.

➤ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ.

- Αφού αποσυρθούν τα eppendorf με το προϊόν της πέψης από τους 60 °C μετά το πέρας των 2,5 ωρών, προστίθενται στο καθένα 5 μl χρωστικής κυανούν της ξυλόλης. Σε καθαρό eppendorf τοποθετείται 1 μl μάρτυρα (DNA ladder 100bp) και 5 μl χρωστικής.
- Ακολουθεί φυγοκέντριση (short spin) για την ανάμιξη του προϊόντος της πέψης με τη χρωστική και του μάρτυρα με την χρωστική.
- Στη συνέχεια, μεταφέρεται κάθε δείγμα με τη χρωστική σε ένα από τα "πηγάδια" του πηκτώματος, ενώ σε ένα από τα πηγάδια μεταφέρεται ο "μάρτυρας".

➤ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΟΥ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ.

- Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 100 V για περίπου 40 λεπτά.
- Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα παρατηρείται στο υπεριώδες. Σε κάθε δείγμα φαίνονται ζώνες ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι του πολυμορφισμού στο ένα ή και στα δύο αλληλόμορφα. Τα κομμάτια DNA που αντιστοιχούν στις ζώνες συγκρίνονται με τον "μάρτυρα" και γίνεται διάγνωση του γονότυπου για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό (825C/T) σε κάθε δείγμα.

2.9 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.

➤ Lysis I (20x)

- ο 82,9gr NH_4CL (3,1M).
- ο 10,01gr KHCO_3 (200mM).
- ο 20ml EDTA (0,5M).
- ο Ανάδευση.
- ο Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι $V_{\text{τελ}}=500\text{ml}$.
- ο Έλεγχος και ρύθμιση pH στο 7,4.
- ο Αποστείρωση.

➤ Lysis I (1x)

- ο 25ml Lysis I 20x.
- ο Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι $V_{\text{τελ}}=500\text{ml}$.
- ο Ανάδευση.

➤ Lysis II

- ο 0,61gr TrisHCL (10mM).
- ο 11,69gr NaCL (400mM).
- ο 2ml EDTA (0,5M).
- ο Ανάδευση.
- ο Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι $V_{\text{τελ}}=500\text{ml}$.
- ο Έλεγχος και ρύθμιση pH στο 8,4.
- ο Αποστείρωση.

➤ Πρωτεΐνάση K (20mg/ml)

- ο 100mg πρωτεΐνάση K.
- ο 5ml αποστειρωμένο νερό.
- ο Ανάδευση σε Vortex.
- ο Κατανομή σε eppendorfs των 1,5ml.
- ο Αποθήκευση στους -20°C .

➤ Tris Borate Acid 5x (TBE 5x)

- ο 54gr Tris Base.
- ο 27,5gr Boric Acid.
- ο 20ml EDTA 0,5M.
- ο Προσθήκη ~800ml απεσταγμένου νερού.

- ο Ανάδευση.
- ο Έλεγχος και ρύθμιση pH στο 8,3.
- ο Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι $V_{\text{τελ}}=1\text{lt}$.

➤ **Tris Borate Acid 1x (TBE 1x)**

- ο 200ml TBE 5x.
- ο Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι $V_{\text{τελ}}=1\text{lt}$.
- ο Ανάδευση.

➤ **EDTA 0,5M**

- ο 186,1gr EDTA $2\text{H}_2\text{O}$.
- ο Προσθήκη ~700ml απεσταγμένου νερού.
- ο Ρύθμιση pH με προσθήκη NaOH (pellets) υπό ανάδευση στο 8.
- ο Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι $V_{\text{τελ}}=1\text{lt}$.

➤ **SDS 20%**

- ο 20gr SDS.
- ο 60ml απεσταγμένο νερό.
- ο Ανάδευση.

➤ **Βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml)**

- ο 10mg EtBr.
- ο 1ml αποστειρωμένο νερό.
- ο Ανάδευση σε Vortex.
- ο Φύλαξη στους 4°C.

➤ **Tris-EDTA (TE)**

- ο 0,61gr Tris Base 10Mm.
- ο 1ml EDTA 0,05M.
- ο Προσθήκη $\approx 400\text{ml}$ απεσταγμένο νερό.
- ο Ανάδευση.
- ο Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι $V_{\text{τελ}}=500\text{ml}$.
- ο Έλεγχος και ρύθμιση pH στο 7,4.
- ο Αποστείρωση.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.

3.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.

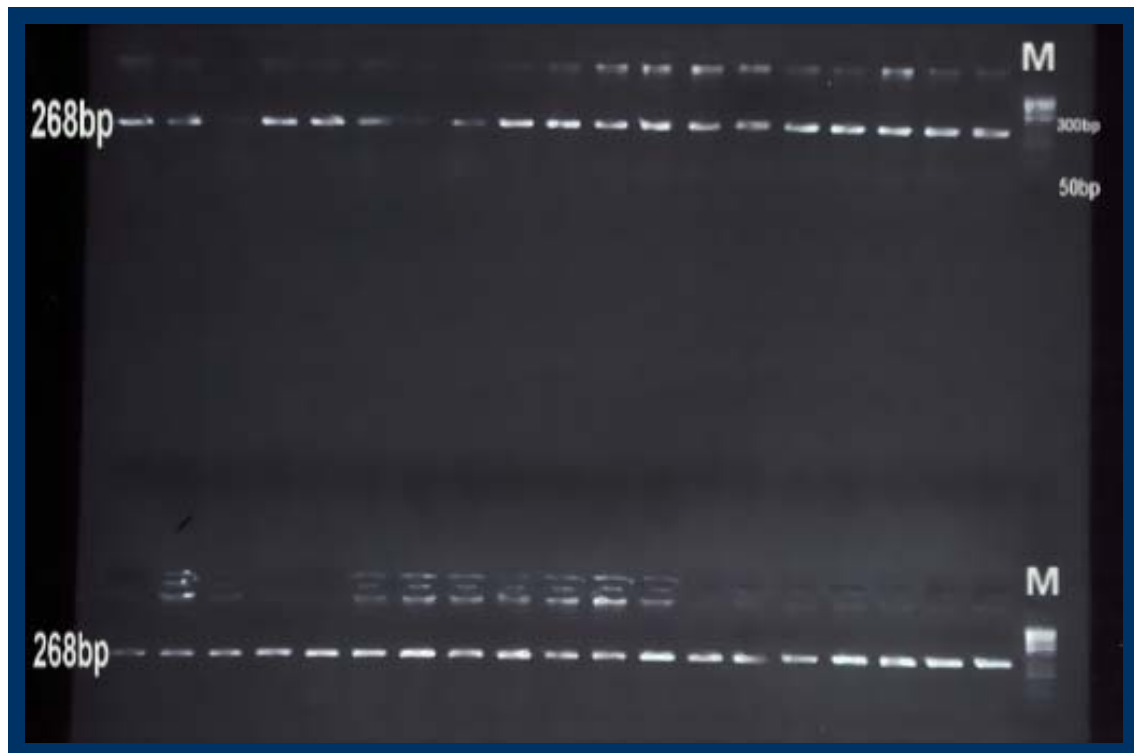
Όπως αναφέρθηκε την ενότητα 2.2 του πειραματικού μέρους, η παρούσα μελέτη είχε δείγμα 400 ατόμων από τον πληθυσμό της μελέτης "ΑΤΤΙΚΗ". Από τα 400 άτομα του δείγματος έγινε προσδιορισμός του γονότυπου, ως προς τον πολυμορφισμό C825T του γονιδίου GNβ3, για τα 375 άτομα (205 άντρες και 170 γυναίκες). Τα χαρακτηριστικά του δείγματος φαίνονται στον πίνακα 3.1.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.

ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.			
	ΑΝΤΡΕΣ	ΓΥΝΑΙΚΕΣ	p value
ΠΛΗΘΟΣ (%)	205 (54,7%)	170 (45,3%)	
ΗΛΙΚΙΑ (ΧΡΟΝΙΑ)	48,4 ∓ 14,2	47,8 ∓ 13,8	0,384
ΜΟΡΦΩΤΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ (%)			0,023
ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ Ι	45 (22%)	48 (28%)	
ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΙΙ	84 (41%)	66 (39%)	
ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΙΙΙ	76 (37%)	56 (33%)	
ΚΑΠΝΙΣΜΑ			< 0,001
ΜΗ ΚΑΠΝΙΣΤΕΣ	68 (33%)	100 (59%)	
ΚΑΠΝΙΣΤΕΣ	92 (45%)	60 (35%)	
ΠΡΩΪΝ ΚΑΠΝΙΣΤΕΣ	45 (22%)	10 (6%)	
ΦΥΣΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ (%)			< 0,001
ΚΑΘΙΣΤΙΚΗ ΖΩΗ	117 (57%)	109 (64%)	
ΕΛΑΦΡΙΑ ΑΣΚΗΣΗ	41 (20%)	24 (14%)	
ΕΝΤΟΝΗ ΑΣΚΗΣΗ	47 (23%)	37 (22%)	
ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ (Δ.Μ.Σ. >29,9 kgr/m²)	45 (22%)	30 (18%)	0,024

3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).

Από τα 400 άτομα του δείγματος η PCR ήταν επιτυχής για τα **379** άτομα. Ο έλεγχος για την επιτυχία της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης, όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.6 του πειραματικού μέρους. Ένα τέτοιο πήκτωμα φαίνεται στην εικόνα 3.1. Η ζώνη που φαίνεται σε κάθε δείγμα αντιστοιχεί σε κομμάτι DNA ίσο με 268 bp, συγκρινόμενο με τον μάρτυρα (L).



ΕΙΚΟΝΑ 3.1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΤΥΧΙΑΣ PCR ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.

Το προϊόν της PCR αποτελείται από το κομμάτι του γονιδίου GNβ3 μεταξύ των νουκλεοτιδίων 5348 και 5615 με μέγεθος 268 bp (75). Το τμήμα αυτό περιλαμβάνει ολόκληρο το εξόνιο 10 του γονιδίου. Η αλληλουχία του κομματιού που πολλαπλασιάζεται με την PCR φαίνεται στην νουκλεοτιδική αλληλουχία που ακολουθεί. Τα πράσινα βέλη οριοθετούν το κομμάτι που πολλαπλασιάζεται, η μπλε αλληλουχία αποτελεί το εξόνιο 10, ενώ φαίνεται και η θέση του μελετούμενου πολυμορφισμού C825T.

```

EX.105341 ctgatcc>ctg acccacttgc caccctgtgcc ctca<gttctt ccccaatgga gaggccatct
5401 gcacgggctc ggatgacgct tcctgcccgt tgtttgacct gcgggcagac caggagctga
C825T5461 tctgcttctc ccacgagagc atcatctgcg gcatcacgt< cgtggccttc tccctcagtg
5521 gccgcctact attcgctggc tacgacgact tcaactgcaa tgtctgggac tccatgaagt
5581 ctgagcgtgt gggttaagggc cagccctggc tgctg<cttcc tcagctggaa ggaccctccc
  
```

3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΨΗΣ.

Η αλληλουχία αναγνώρισης για το ένζυμο BsaI I, με το οποίο έγινε η πέψη, υπάρχει στο εξόνιο 10 του γονιδίου GNβ3 μόνο απουσία του πολυμορφισμού C825T. Μετά την ηλεκτροφόρηση του πηκτώματος αгарόζης (όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.8) έγινε παρατήρησή του στο υπεριώδες. Για κάθε δείγμα υπήρχαν ζώνες που αντιστοιχούσαν σε κομμάτια DNA, ανάλογα με αν το ένζυμο είχε βρει την αλληλουχία αναγνώρισης ή όχι.

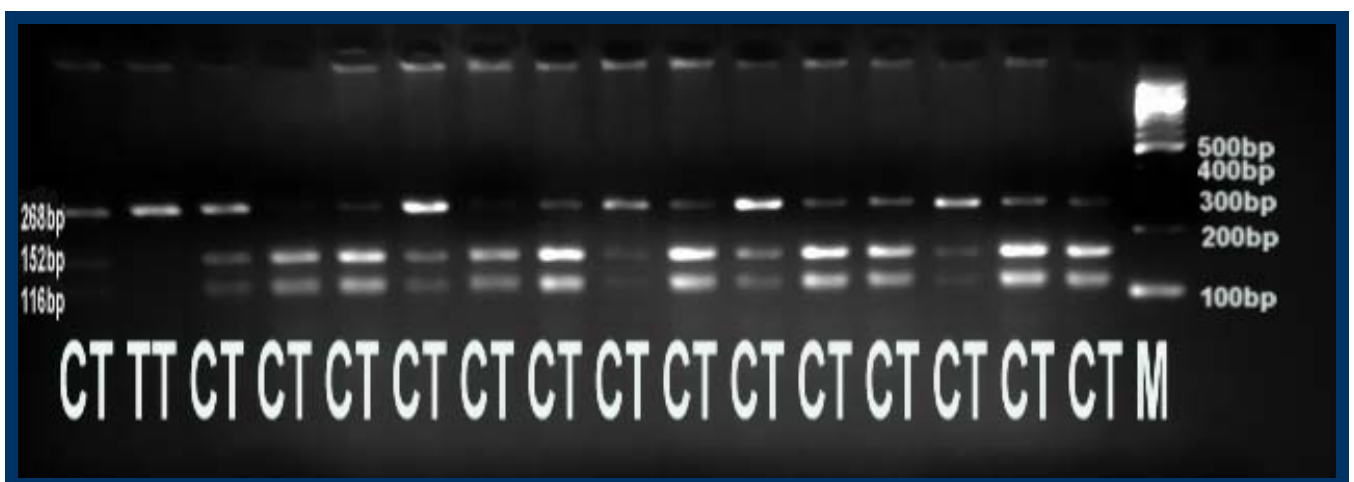
Στα δείγματα DNA που δεν έφεραν τον πολυμορφισμό, το ένζυμο εντόπισε την αλληλουχία αναγνώρισης και στα δύο αλληλόμορφα και στο πήκτωμα παρατηρήθηκαν δύο ζώνες που αντιστοιχούσαν σε κομμάτια DNA ίσα με 152 bp και 116 bp. Τα άτομα αυτά χαρακτηρίστηκαν CC, δηλαδή ομόζυγα φυσιολογικά.

Στα δείγματα DNA που έφεραν τον πολυμορφισμό και στα δύο αλληλόμορφα, το ένζυμο δεν εντόπισε την αλληλουχία αναγνώρισης και στο πήκτωμα παρατηρήθηκε μόνο μια ζώνη που αντιστοιχούσε σε κομμάτι DNA ίσο με 268 bp (άκοπο κομμάτι). Τα άτομα αυτά χαρακτηρίστηκαν TT, δηλαδή ομόζυγα για τον πολυμορφισμό.

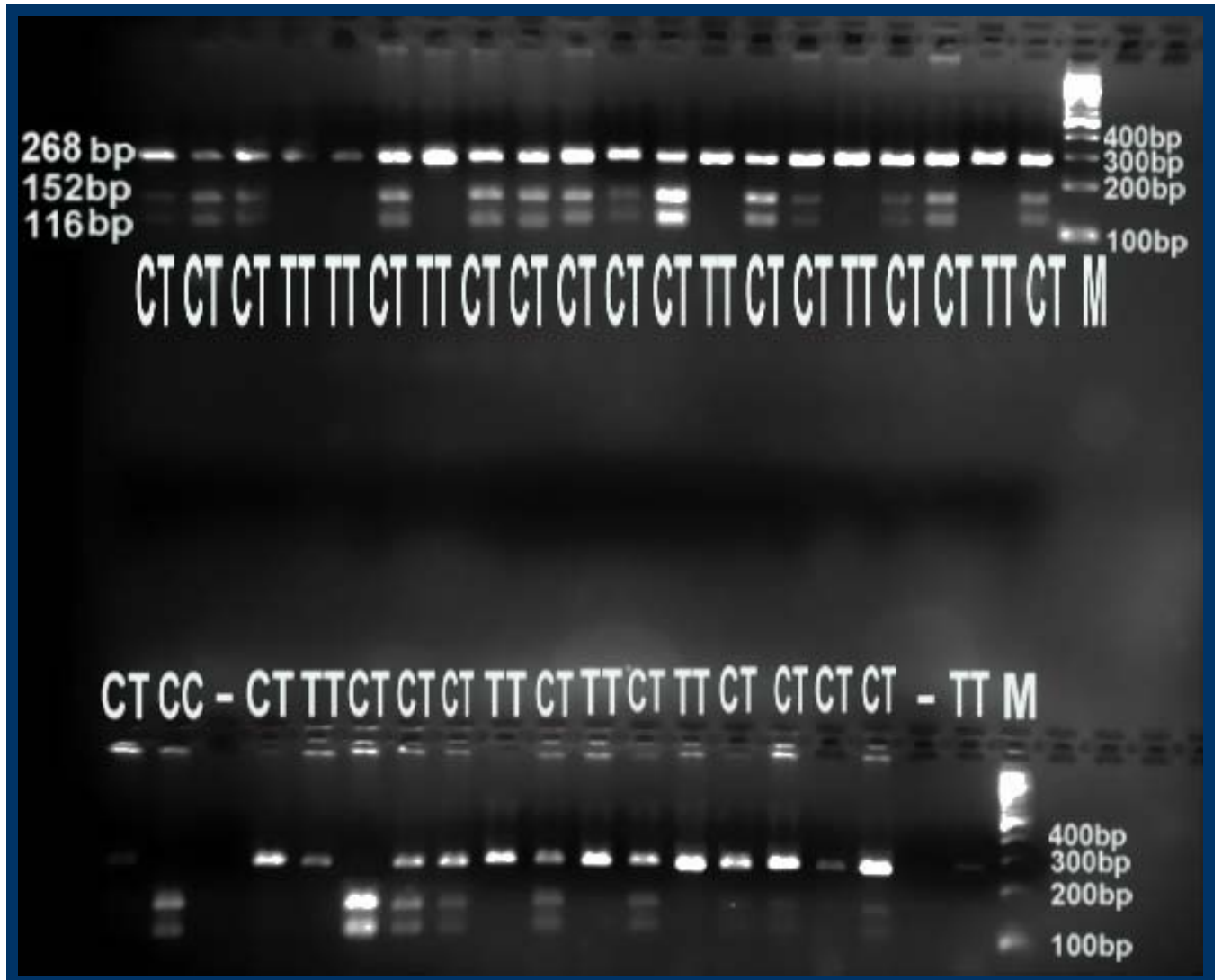
Στα δείγματα DNA που έφεραν τον πολυμορφισμό μόνο στο ένα αλληλόμορφο, το ένζυμο εντόπισε μία αλληλουχία αναγνώρισης (στο φυσιολογικό αλληλόμορφο) και στο πήκτωμα παρατηρήθηκαν τρεις ζώνες, που αντιστοιχούσαν σε κομμάτια DNA ίσα με 268 bp, 152 bp και 116 bp. Τα άτομα αυτά χαρακτηρίστηκαν CT, δηλαδή ετερόζυγα για τον πολυμορφισμό.

Από τα 379 δείγματα με επιτυχημένη PCR, επιτυχή πέψη είχαν τα **375** δείγματα. Από αυτά 38 ήταν CC, 192 ήταν CT και 145 TT.

Πηκτώματα ελέγχου της πέψης φαίνονται στις εικόνες 3.2 και 3.3, όπου με M συμβολίζεται ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε (100 bp) για την σύγκριση με τις ζώνες των δειγμάτων.



ΕΙΚΟΝΑ 3.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΕΨΗΣ.



ΕΙΚΟΝΑ 3.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΕΨΗΣ.

3.4 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ ΣΤΟ ΔΕΙΓΜΑ.

Στα 375 άτομα του δείγματος βρέθηκαν 38 ομοζυγώτες για το φυσιολογικό αλληλόμορφο (CC), 192 ετεροζυγώτες (CT), και 145 ομοζυγώτες με τον πολυμορφισμό (TT). Το ποσοστό των ομόζυγων φυσιολογικών είναι 10,1%, των ετερόζυγων 51,2% και των ομόζυγων για τον πολυμορφισμό 38,7%. Η συχνότητα εμφάνισης του C αλληλομόρφου στο δείγμα είναι 35,73% και του T αλληλομόρφου 64,27%. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στον πίνακα 3.2.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.2. ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΣΤΟ ΔΕΙΓΜΑ.

	CC	CT	TT	ΣΥΝΟΛΟ	C	T
n = 375	38	192	145	375	268	482
%	10,1%	51,2%	38,7%	100%	35,73%	64,27%

Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 3.1, από τα 375 άτομα του δείγματος τα 220 ήταν άντρες και τα 155 ήταν γυναίκες. Από τους 220 άντρες βρέθηκαν 24 ομοζυγώτες για το φυσιολογικό αλληλόμορφο (CC), 122 ετεροζυγώτες (CT) και 74 ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό (TT). Από τις 155 γυναίκες βρέθηκαν 15 ομοζυγώτες για το φυσιολογικό αλληλόμορφο (CC), 70 ετεροζυγώτες (CT) και 70 ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό (TT). Τα αποτελέσματα αυτά καθώς και η συχνότητα εμφάνισης του κάθε αλληλομόρφου στα δύο φύλλα φαίνονται στον πίνακα 3.3.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3. ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΑΝΑ ΦΥΛΟ.

	CC	CT	TT	ΣΥΝΟΛΟ	C	T
ΑΝΤΡΕΣ	22	114	69	205	158	252
%	10,73%	55,61%	33,66%	100%	38,54%	61,46%
ΓΥΝΑΙΚΕΣ	16	78	76	170	110	230
%	9,41%	45,88%	44,71%	100%	32,35%	67,65%
ΣΥΝΟΛΟ	38	192	145	375		

Ο στατιστικός έλεγχος με Pearson Chi-Square test δεν έδειξε συσχέτιση του πολυμορφισμού με τη συχνότητα εμφάνισης σε ένα από τα δύο φύλα (p value=0,103).

Επίσης, ελέγχθηκε η συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού στα καπνίζοντα και μη καπνίζοντα άτομα του δείγματος, όπως αυτή φαίνεται στον πίνακα 3.4.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.4. ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΟ ΚΑΠΝΙΣΜΑ.

	CC	CT	TT	ΣΥΝΟΛΟ	Pearson Chi-square test
ΜΗ ΚΑΠΝΙΣΤΕΣ	13	64	56	133	p value = 0,450
	36,1%	35,6%	42,4%	38,2%	
ΚΑΠΝΙΣΤΕΣ	23	116	76	215	
	63,9%	64,4%	57,6%	61,8%	
ΣΥΝΟΛΟ	36	180	132	348	

Παράλληλα, ελέγχθηκε η συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού σε σχέση με την υπέρταση στα άτομα του δείγματος, χωρίς όμως να προκύψει συσχέτιση (p value=0,112). Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 3.5.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.5. ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΥΠΕΡΤΑΣΗ.

	CC	CT	TT	ΣΥΝΟΛΟ	Pearson Chi-square test
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΠΙΕΣΗ	25	114	102	241	p value = 0,112
	65,8%	59,4%	70,3%	64,3%	
ΥΠΕΡΤΑΣΗ	13	78	43	134	
	34,2%	40,6%	29,7%	35,7%	
ΣΥΝΟΛΟ	38	192	145	375	

Ακόμη, ελέγχθηκε η συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού σε σχέση με το διαβήτη, χωρίς πάλι να προκύψει συσχέτιση (p value=0,930), όπως φαίνεται στον πίνακα 3.6.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.6. ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΟ ΔΙΑΒΗΤΗ.

	CC	CT	TT	ΣΥΝΟΛΟ	Pearson Chi-square test
ΥΓΙΕΙΣ	33	161	121	315	p value = 0,930
	94,3%	92,5%	93,1%	92,9%	
ΔΙΑΒΗΤΙΚΟΙ	2	13	9	24	
	5,7%	7,5%	6,9%	7,1%	
ΣΥΝΟΛΟ	35	174	130	339	

Τέλος, ελέγχθηκε η συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού σε σχέση με τη στεφανιαία νόσο, όπου το Pearson Chi-square test έδειξε συσχέτιση (p value=0,043). Στα άτομα με στεφανιαία νόσο, οι αναλογίες των γονότυπων ήταν 27,3% CC, 18,2% CT και 54,5% TT, ενώ στα άτομα χωρίς στεφανιαία νόσο η αναλογία των γονότυπων ήταν 10,3% CC, 53,3% CT και 36,4% TT. Ωστόσο, στο δείγμα υπήρχαν μόνο 11 άτομα με στεφανιαία νόσο και επομένως η συσχέτιση δεν μπορεί να θεωρηθεί αληθής. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 3.7.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.7. ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟ.

	CC	CT	TT	ΣΥΝΟΛΟ	Pearson Chi-square test
ΑΠΟΥΣΙΑ ΚΑΡΔ/ΚΗΣ ΝΟΣΟΥ	33	171	117	321	p value = 0,043
	91,7%	98,8%	95,1%	96,7%	
ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟΣ	3	2	6	11	
	8,3%	1,2%	4,9%	3,3%	
ΣΥΝΟΛΟ	36	173	123	332	

3.5 ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ C825T ΜΕ ΤΗΝ ΗΛΙΚΙΑ, ΤΗΝ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΠΙΕΣΗ, ΤΟΝ ΔΕΙΚΤΗ ΜΑΖΑΣ ΣΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΥΣ ΔΕΙΚΤΕΣ.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η συσχέτιση του πολυμορφισμού C825T με την ηλικία, το δείκτη μάζας σώματος και με την αρτηριακή πίεση (συστολική και διαστολική). Επίσης διερευνήθηκε η συσχέτιση του πολυμορφισμού με τους παρακάτω βιοχημικούς δείκτες: ολική χοληστερόλη (TC), τριγλυκερίδια (TG), γλυκόζη (GLU), HDL χοληστερόλη, λιποπρωτεΐνη α (Lp a), απολιποπρωτεΐνη A1 (Apo A1), απολιποπρωτεΐνη B (Apo B), ινωδογόνο, αμυλοειδές, ομοκυστεΐνη, οξειδωμένη LDL χοληστερόλη (OX. LDL-C) και C αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP).

Στον πίνακα 3.8 φαίνονται ο μέσος όρος, η τυπική απόκλιση, το τυπικό σφάλμα, το κατώτερο και υψηλότερο όριο του διαστήματος εμπιστοσύνης για τον μέσο και οι μέγιστες και ελάχιστες τιμές των παραμέτρων που εξετάστηκαν στους φυσιολογικούς (CC), στους ετεροζυγώτες (CT), στους ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό (TT) και στο σύνολο του δείγματος.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.8. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΑΝΑ ΓΟΝΟΤΥΠΟ ΣΤΟ ΔΕΙΓΜΑ.

		N	ΜΕΣΟΣ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ	ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ	95% ΔΙΑΣΤΗΜΑ ΕΜΠΙΣΤΟΣΥΝΗΣ		ΕΛΑΧΙΣΤΟ	ΜΕΓΙΣΤΟ
						ΚΑΤΩΤΕΡΟ ΟΡΙΟ	ΥΨΗΛΟΤΕΡΟ ΟΡΙΟ		
ΗΛΙΚΙΑ	CC	36	44,47	9,355	1,559	41,31	47,64	25	60
	CT	180	43,32	10,167	0,758	41,38	44,82	3	67
	TT	133	44,37	10,237	0,888	42,61	46,12	18	71
	ΣΥΝΟΛΟ	349	43,84	10,100	0,541	42,78	44,90	3	71
BMI	CC	35	27,5496	4,85370	0,82042	25,8823	29,2169	19,88	36,92
	CT	175	26,6672	5,00763	0,37854	25,9200	27,4143	17,07	52,52
	TT	132	25,9693	4,01067	0,34908	25,2787	26,6598	17,99	37,87
	ΣΥΝ.	342	26,4881	4,64330	0,25108	25,9942	26,9820	17,07	52,52
SBP	CC	34	124,82	19,145	3,283	118,14	131,50	100	160
	CT	172	125,39	19,043	1,452	122,52	128,26	90	200
	TT	123	123,12	18,129	1,635	119,89	126,36	90	195
	ΣΥΝ.	329	124,48	18,690	1,030	122,46	126,51	90	200
DBP	CC	34	76,91	19,606	3,362	70,07	83,75	9	100
	CT	172	82,05	12,080	0,921	80,23	83,86	60	120
	TT	123	80,81	11,077	0,999	78,84	82,79	40	110
	ΣΥΝ.	329	81,05	12,756	0,703	79,67	82,44	9	120
TC	CC	35	201,037	43,84442	7,41106	185,9761	216,0982	127,50	346,80
	CT	177	191,725	36,07403	2,71149	186,3742	197,0766	102,85	293,25
	TT	131	194,442	42,81868	3,74109	187,0411	201,8437	86,70	371,45
	ΣΥΝ.	343	193,713	39,56592	2,13636	189,5112	197,9153	86,70	371,45
TG	CC	33	120,64	63,841	11,113	98,00	143,27	40	312
	CT	157	114,92	62,817	5,013	105,01	124,82	34	322
	TT	118	113,19	57,964	5,336	102,62	123,75	39	379
	ΣΥΝ.	308	114,87	60,951	3,473	108,03	121,70	34	379
GLU	CC	36	107,42	42,821	7,137	92,93	121,91	70	292
	CT	177	99,29	25,815	1,940	95,46	103,12	62	265
	TT	131	95,06	23,149	2,023	91,06	99,06	10	275
	ΣΥΝ.	344	98,53	27,301	1,472	95,64	101,43	10	292
HDL	CC	35	50,03	12,188	2,060	45,84	54,22	34	85
	CT	173	49,18	12,881	0,979	47,25	51,12	29	91
	TT	128	51,21	19,281	1,704	47,84	54,58	24	205
	ΣΥΝ.	336	50,04	15,560	0,849	48,37	51,71	24	205
Lp (a)	CC	36	22,456	23,28881	3,88147	14,5758	30,3354	2,41	89,50
	CT	170	19,293	20,34468	1,56037	16,2132	22,3738	2,39	147,00
	TT	123	22,714	34,31140	3,09376	16,5896	28,8384	2,39	318,00
	ΣΥΝ.	329	20,918	26,68074	1,47096	18,0246	23,8120	2,39	318,00

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.8. ΣΥΝΕΧΕΙΑ.

		N	ΜΕΣΟΣ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙ ΣΗ	ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ	95% ΔΙΑΣΤΗΜΑ ΕΜΠΙΣΤΟΣΥΝΗΣ		ΕΛΑ ΧΙ ΣΤΟ	ΜΕΓΙ- ΣΤΟ
						ΚΑΤΩΤΕ- ΡΟ ΟΡΙΟ	ΥΨΗΛΟ- ΤΕΡΟ ΟΡΙΟ		
Apo B	CC	31	117,932	28,65087	5,14585	107,4230	128,4415	70,10	188,00
	CT	150	108,987	30,28303	2,47260	104,1011	113,8729	0,45	171,00
	TT	100	111,024	29,88792	2,98879	105,0936	116,9544	42,20	213,00
	ΣΥΝΟ- ΛΟ	281	110,699	29,98666	1,78885	107,1774	114,2201	0,45	213,00
Apo A1	CC	31	163,000	25,54473	4,58797	153,6301	172,3699	124,00	220,00
	CT	150	163,933	24,72063	2,01843	159,9449	167,9218	103,00	242,00
	TT	100	157,687	27,35832	2,73583	152,2585	163,1155	90,20	218,00
	ΣΥΝ.	281	161,607	25,85255	1,54223	158,5716	164,6433	90,20	242,00
INΩ ΛΟ ΓΟ ΝΟ	CC	31	308,903	55,79926	10,02184	288,4359	329,3706	181,00	408,00
	CT	150	320,073	63,26806	5,16582	309,8656	330,2811	205,00	577,00
	TT	100	320,610	61,59396	6,15940	308,3884	332,8316	207,00	503,00
	ΣΥΝ.	281	319,032	61,78912	3,68603	311,7762	326,2879	181,00	577,00
AMY ΛΟΕΙ ΔΕΣ	CC	33	5,5030	8,44406	1,46992	2,5089	8,4972	0,90	43,40
	CT	113	5,6823	8,07565	0,75969	4,1771	7,1875	0,70	76,10
	TT	82	3,8709	2,97395	0,32842	3,2174	4,5243	0,70	18,10
	ΣΥΝ.	228	5,0049	6,79069	0,44972	4,1187	5,8910	0,70	76,10
ΟΜΟ ΚΥ ΣΤΕΪ NH	CC	24	10,5858	2,32389	0,47436	9,6045	11,5671	6,99	16,30
	CT	128	12,9645	6,70996	0,59308	11,7909	14,1381	4,24	46,00
	TT	79	10,9747	3,89456	0,43817	10,1024	11,8470	-6,93	22,01
	ΣΥΝ.	231	12,0369	5,62413	0,37004	11,3078	12,7660	-6,93	46,00
OX. LDL	CC	4	111,577	13,87885	6,93942	89,4932	133,6618	92,06	124,89
	CT	19	64,9621	26,48393	6,07583	52,1973	77,7269	28,72	127,51
	TT	21	74,1000	28,69802	6,26242	61,0368	87,1632	38,69	150,06
	ΣΥΝ.	44	73,5611	29,28074	4,41424	64,6590	82,4633	28,72	150,06
CRP	CC	31	1,4446	1,37774	0,24745	0,9393	1,9500	0,00	4,63
	CT	140	1,7022	1,67034	0,14117	1,4230	1,9813	0,15	8,66
	TT	89	1,6896	1,78164	0,18885	1,3143	2,0649	0,15	8,72
	ΣΥΝ.	260	1,6671	1,67407	0,10382	1,4627	1,8716	0,00	8,72

Η στατιστική ανάλυση έγινε με έλεγχο ANOVA και τα αποτελέσματά της φαίνονται στον πίνακα 3.9

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ANOVA.

ΧΑΡΑΚΤΗ- ΡΙΣΤΙΚΟ	ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΤΕΤΡΑΓΩΝΩΝ	df	ΜΕΣΟΣ ΤΕΤΡΑΓΩΝΟΥ	F	P-VALUE
ΗΛΙΚΙΑ	99,784	2	49,892	0,488	0,614
BMI	80,583	2	40,291	1,878	0,154
SBP	373,145	2	186,572	0,533	0,588
DBP	759,953	2	379,976	2,355	0,097
TC	2646,427	2	1323,214	0,844	0,431
TG	1432,084	2	716,042	0,192	0,826
GLU	4522,664	2	2261,332	3,071	0,048
HDL	301,973	2	150,987	0,622	0,537
Lp(a)	930,464	2	465,232	0,652	0,522
Apo B	2072,128	2	1036,064	1,153	0,317
Apo A1	2408,568	2	1204,284	1,812	0,165
ΙΝΩΔΟ- ΓΟΝΟ	3592,019	2	1796,009	0,469	0,626
ΑΜΥΛΟ- ΕΙΔΕΣ	165,498	2	82,749	1,807	0,166
ΟΜΟΚΥ- ΣΤΕΪΝΗ	249,814	2	124,907	4,054	0,019
OX. LDL	7191,997	2	3595,998	4,968	0,012
CRP	1,751	2	0,876	0,311	0,733

BMI: δείκτης μάζας σώματος

SBP: συστολική αρτηριακή πίεση

DBP: διαστολική αρτηριακή πίεση

TC: ολική χοληστερόλη

TG: τριγλυκερίδια

GLU: επίπεδα γλυκόζης

HDL: υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη

Lp(a): λιποπρωτεΐνη α

Apo B: απολιποπρωτεΐνη B

Apo A1: απολιποπρωτεΐνη A1

OX. LDL: οξειδωμένη LDL

CRP: C αντιδρώσα πρωτεΐνη

Όπως φαίνεται από τους πίνακες 3.8 και 3.9, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού C825T με την ηλικία (p value=0,614). Επίσης δεν βρέθηκε συσχέτιση με την αρτηριακή πίεση, ούτε με τη συστολική (p value= 0,588), ούτε με τη διαστολική (p value=0,097). Η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε συσχέτιση του πολυμορφισμού με τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης (p value=0,431), ούτε με τα επίπεδα τριγλυκεριδίων (p value=0,826), ούτε με τα επίπεδα HDL χοληστερόλης (p value=0,537) αλλά ούτε και με τα επίπεδα λιποπρωτεΐνης α ($Lp\alpha$) (p value=0,522). Όσον αφορά στις απολιποπρωτεΐνες A1 και B δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτισή τους με τον πολυμορφισμό (p value=0,165 και p value=0,317 αντίστοιχα). Τέλος, δεν βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού με τα επίπεδα ινωδογόνου (p value=0,626), ούτε με τα επίπεδα αμυλοειδούς (p value=0,166) αλλά ούτε με τα επίπεδα της C αντιδρώσας πρωτεΐνης (p value=0,733).

Η στατιστική ανάλυση έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού με τα επίπεδα γλυκόζης (p value=0,048), όπου τα άτομα με γονότυπο TT (ομόζυγα για τον πολυμορφισμό) εμφάνιζαν χαμηλότερες τιμές γλυκόζης ($95,06 \pm 23,2$ mg/dl, $n=131$) σε σχέση με τους γονότυπους CT ($99,29 \pm 25,8$ mg/dl, $n=177$) και CC ($107,42 \pm 42,8$ mg/dl, $n=36$). Επίσης, βρέθηκε συσχέτιση των επιπέδων ομοκυστεΐνης (p value=0,019) με τον πολυμορφισμό, όπου τα άτομα με γονότυπο CT και τα άτομα με γονότυπο TT εμφάνιζαν υψηλότερα επίπεδα ομοκυστεΐνης ($12,96 \pm 6,7$ μ mol/L $n=128$ και $10,97 \pm 3,9$ μ mol/L $n=79$, αντίστοιχα), σε σχέση με τα άτομα με γονότυπο CC ($10,58 \pm 2,3$ μ mol/L, $n=24$). Τέλος, βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του μελετούμενου πολυμορφισμού με τα επίπεδα οξειδωμένης LDL χοληστερόλης ($p=0,012$) σε ένα περιορισμένο κομμάτι του δείγματος ($n=44$), αρκούντως όμως μεγάλου για στατιστική ανάλυση. Συγκεκριμένα, βρέθηκε πως τα άτομα με γονότυπο CT και TT έχουν χαμηλότερα επίπεδα οξειδωμένης LDL ($64,96 \pm 26,5$ mg/dl $n=19$ και $74,10 \pm 28,7$ mg/dl $n=21$, αντίστοιχα) σε σχέση με τα άτομα με τον γονότυπο CC ($111,57 \pm 13,9$ mg/dl, $n=4$).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.

Η στεφανιαία νόσος και η υπέρταση είναι σύνθετα πολυπαραγοντικά νοσήματα με σίγουρη επίδραση από γενετικούς παράγοντες. Οι μελέτες σε γονιδιακό επίπεδο έχουν πιστοποιήσει αρκετές μεταλλάξεις, που εμπλέκονται στο μηχανισμό ανάπτυξης των παραπάνω νοσημάτων. Σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο του υποδοχέα της LDL (14), στο γονίδιο της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (15) και σε άλλα γονίδια, έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν στη διαδικασία της αθηρογένεσης. Επίσης, η ταυτοποίηση μεταλλάξεων στο γονίδιο του αγγειοτενσινογόνου (31,32) και του υποδοχέα της αγγειοτενσίνης II (33) έχουν βοηθήσει στην κατανόηση μηχανισμών της ιδιοπαθούς υπέρτασης.

Η παρατήρηση της αυξημένης ιοντοανταλλακτικής δραστηριότητας Na^+/H^+ σε κύτταρα ασθενών με ιδιοπαθή υπέρταση (47,48), οδήγησε τους ερευνητές στην εξέταση του μηχανισμού και του γενετικού υπόβαθρου για αυτό το φαινόμενο. Αποδείχθηκε πως η αυξημένη ανταλλαγή Na^+/H^+ οφείλεται σε αυξημένη ενεργοποίηση των Gi πρωτεϊνών σε αυτούς τους ασθενείς (50). Μελέτες για τη διευκρίνιση του αιτίου της αυξημένης ενεργοποίησης των Gi πρωτεϊνών οδήγησαν στον εντοπισμό του πολυμορφισμού C825T του γονιδίου $\text{GN}\beta 3$, που κωδικοποιεί την Gβ3 υπομονάδα των Gi πρωτεϊνών (54). Ο πολυμορφισμός C825T οδηγεί σε έλλειψη 41 αμινοξέων από την πρωτεΐνη Gβ3 (Gβ3s) και φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένη ενεργοποίηση των Gi πρωτεϊνών (54). Το γονίδιο $\text{GN}\beta 3$ θεωρείται υποψήφιο γονίδιο για την υπέρταση, ωστόσο η συσχέτιση του πολυμορφισμού C825T με τη νόσο δεν επαληθεύεται στο σύνολο των ερευνών. Παράλληλα, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο συμμετέχει η αυξημένη ανταλλαγή Na^+/H^+ στην υπέρταση δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος.

Ο πολυμορφισμός C825T βρέθηκε επίσης να προκαλεί μειωμένη ενεργοποίηση των Gi πρωτεϊνών στο λιπώδη ιστό με συνέπεια τη μειωμένη λιπόλυση (85). Τα ερευνητικά δεδομένα προς αυτή την κατεύθυνση είναι λιγοστά και δεν επιβεβαιώνεται από όλα η συσχέτιση του πολυμορφισμού με την παχυσαρκία.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η πιθανή συσχέτιση του πολυμορφισμού C825T με τα επίπεδα αρτηριακής πίεσης, το δείκτη μάζας σώματος και βιοχημικούς δείκτες σε ένα τυχαίο δείγμα 375 ενήλικων ατόμων (205 αντρών και 170 γυναικών) γενικού πληθυσμού.

❖ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ C825T.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η κατανομή των γονότυπων στο δείγμα ήταν: 10,1% CC, 51,2% CT και 38,7% TT. Η συχνότητα εμφάνισης του αλληλόμορφου C ήταν 35,73% και του T αλληλόμορφου 64,27%. Δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού στα δύο φύλλα ($p=0,103$).

Η συχνότητα εμφάνισης των αλληλομόρφων είναι εντελώς διαφορετική από τη συχνότητα που παρατηρείται στους Καυκάσιους. Σύμφωνα με την έρευνα των Siffert et.al. (84), η συχνότητα

εμφάνισης του T αλληλόμορφου στους Καυκάσιους κυμαίνεται από 21%-38%. Στους Γερμανούς η συχνότητα εμφάνισης των αλληλομόρφων είναι 30% για το T και 70% για το C (52,69). Στην Ισπανία, η συχνότητα εμφάνισης του T αλληλόμορφου σε δείγμα 86 ατόμων ήταν 33,7% (70), ενώ σε συμφωνία με αυτή τη συχνότητα είναι και έρευνα με Ιταλικό πληθυσμό (71). Στη Γαλλία και Φιλανδία η συχνότητα εμφάνισης του T είναι 30% (63), ενώ παρόμοια συχνότητα εμφανίζεται και σε δείγμα Αυστραλών (55).

Μόνο σε μία έρευνα βρέθηκε μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης του T αλληλόμορφου σε Καυκάσιους. Πρόκειται για την έρευνα σε δείγμα 447 ατόμων Oji-Cree στον Καναδά. Η συχνότητα εμφάνισης του T αλληλόμορφου βρέθηκε 50,1% (68).

Σε όλες τις έρευνες σε Καυκάσιους πληθυσμούς φαίνεται ότι το C αλληλόμορφο είναι επικρατές, εκτός από την παρούσα όπου επικρατεί το T αλληλόμορφο. Κρίνεται σκόπιμη η επαλήθευση ή διάψευση αυτού του ευρήματος για τον Ελληνικό πληθυσμό.

❖ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ C825T ΚΑΙ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΠΙΕΣΗ.

Στην παρούσα μελέτη δεν βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού με τη συστολική αρτηριακή πίεση (CC:124,82±19,1 n=34, έναντι CT:125,39±19 n=172, έναντι TT:123,12±18,1 n=123, p=0,588), ούτε με τη διαστολική αρτηριακή πίεση (CC:76,91±19,6 n=34, έναντι CT:82,05±12,1 n=172, έναντι TT:80,81±11,1 n=123, p=0,097). Επίσης δεν βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού με την υπέρταση (p=0,112). Ως υπερτασικά χαρακτηρίστηκαν τα άτομα του δείγματος με συστολική αρτηριακή πίεση ≥140 mm Hg ή/και διαστολική πίεση ≥90 mm Hg (5) ή με χρήση αντιυπερτασικής αγωγής.

Τα ευρήματα αυτά είναι σύμφωνα με τις μελέτες των Kato et.al. (61) και Ishikara et.al. (62) στην Ιαπωνία. Στην έρευνα των Kato et.al. με δείγμα 1233 ατόμων σε δύο ομάδες (υπερτασικοί – μη υπερτασικοί) δεν βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού με την υπέρταση. Ωστόσο, στην έρευνα αυτή θεωρήθηκαν υπερτασικοί όσοι είχαν συστολική πίεση ≥160 mm Hg ή/και διαστολική πίεση ≥95 mm Hg ή λάμβαναν αντιυπερτασικά φάρμακα. Στην έρευνα των Ishikara et.al. με δείγμα 352 ατόμων αστικού πληθυσμού, επίσης δεν βρέθηκε συσχέτιση. Ανάλογα ήταν και τα αποτελέσματα σε πληθυσμό Αφρικανοαμερικάνων (n=904) (65). Επίσης σε έρευνα “ασθενών –μαρτύρων” με Γαλλικό πληθυσμό δεν βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού με τα επίπεδα αρτηριακής πίεσης (63). Ωστόσο, στη συγκεκριμένη έρευνα τα κριτήρια για ύπαρξη υπέρτασης ήταν: διαστολική πίεση ≥160 mm Hg ή λήψη φαρμάκων για την υπέρταση. Σε πληθυσμιακή προοπτική έρευνα 903 Φιλανδών αντρών δεν βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού με την αρτηριακή πίεση.

Αντίθετα, σε έρευνα των Benjafield et.al. με δείγμα 110 υπερτασικών και 189 μη υπερτασικών Αυστραλών, βρέθηκε στατιστικά μεγαλύτερη συχνότητα του T αλληλόμορφου στην ομάδα των

υπερτασικών (55). Σε παρόμοια έρευνα “ασθενών-μαρτύρων” στο Βερολίνο βρέθηκε επίσης συσχέτιση του πολυμορφισμού με την υπέρταση ($p < 0,01$), με κριτήρια για ύπαρξη υπέρτασης: >140 mm Hg ή/και >95 mm Hg ή φαρμακευτική αγωγή (56). Η ίδια συσχέτιση υπάρχει και σε έρευνα “ασθενών – μαρτύρων” στην Ιαπωνία (57). Επίσης, σε έρευνα με δείγμα 428 ατόμων Αφρικανικής καταγωγής στο Λονδίνο, βρέθηκε ισχυρή συσχέτιση του πολυμορφισμού με την υπέρταση ($p = 0,032$) (58). Τα κριτήρια ύπαρξης υπέρτασης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: ≥ 160 mm Hg ή/και ≥ 95 mm Hg ή φαρμακευτική αγωγή.

Σε πληθυσμιακή έρευνα των Schunkert et.al. στη Γερμανία με δείγμα 608 ατόμων 52-67 ετών, βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού με αυξημένα επίπεδα διαστολικής αρτηριακής πίεσης ($p = 0,02$) (59). Τα κριτήρια ύπαρξης υπέρτασης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: ≥ 160 mm Hg ή/και ≥ 95 mm Hg ή φαρμακευτική αγωγή. Σε έρευνα δείγματος 447 νεαρών ατόμων του πληθυσμού Oji-Cree στον Καναδά, βρέθηκαν στατιστικά χαμηλότερα επίπεδα συστολικής αρτηριακής πίεσης για το γονότυπο TT σε σχέση με τους άλλους γονότυπους ($p = 0,022$). Τα κριτήρια ύπαρξης υπέρτασης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: >140 mm Hg ή/και >90 mm Hg ή φαρμακευτική αγωγή (68).

Τα διαφορετικά αποτελέσματα των ερευνών σε σχέση με τον πολυμορφισμό C825T και την υπέρταση μπορεί να οφείλονται στην ύπαρξη και άλλων πολυμορφικών θέσεων στο γονίδιο GNβ3 με δυσαναλογία σύνδεσης για τον εν λόγω πολυμορφισμό. Η παραγωγή της μεταλλαγμένης Gβ3s πρωτεΐνης πιθανόν να απαιτεί την παρουσία και άλλων πολυμορφισμών, εκτός του C825T, στο γονίδιο GNβ3. Ακόμη, είναι πιθανό να εμπλέκονται και άλλα γονίδια συνεργώντας στον υπερτασικό φαινότυπο. Θα πρέπει επίσης να επισημανθεί η διαφορετική ταξινόμηση των ατόμων ως προς την υπέρταση στις διάφορες έρευνες.

❖ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ C825T ΚΑΙ ΔΕΙΚΤΗΣ ΜΑΖΑΣ ΣΩΜΑΤΟΣ (ΔΜΣ).

Στην παρούσα έρευνα δεν βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού με το δείκτη μάζας σώματος (CC: $27,55 \pm 4,8$ $n=35$, έναντι CT: $26,67 \pm 5,0$ $n=175$, έναντι TT: $25,97 \pm 4$ $n=342$, $p=0,154$).

Το εύρημα αυτό είναι σύμφωνο με την πληθυσμιακή έρευνα των Snapir et.al. στην Φιλανδία, με δείγμα 903 αντρών 42-61 χρονών, όπου δεν βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού με το ΔΜΣ (66). Αντίθετα, στην έρευνα των Siffert et.al. συσχετίστηκε ο πολυμορφισμός με την παχυσαρκία ($\Delta\text{ΜΣ} > 27 \text{ kg/m}^2$) σε δείγμα Γερμανών ($n=277$), Κινέζων ($n=960$) και Αφρικανών ($n=459$) αντρών (84).

❖ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ C825T ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.

Από τους βιοχημικούς δείκτες που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία, δεν βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού με τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης ($p \text{ value} = 0,431$), ούτε με τα επίπεδα τριγλυκεριδίων ($p \text{ value} = 0,826$), ούτε με τα επίπεδα HDL χοληστερόλης ($p \text{ value} = 0,537$).

αλλά ούτε και με τα επίπεδα λιποπρωτεΐνης α (Lp α) (p value=0,522). Όσον αφορά στις απολιποπρωτεΐνες A1 και B δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτισή τους με τον πολυμορφισμό (p value=0,165 και p value=0,317 αντίστοιχα). Τέλος, δεν βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού με τα επίπεδα ινωδογόνου (p value=0,626), ούτε με τα επίπεδα αμυλοειδούς (p value=0,166) αλλά ούτε με τα επίπεδα της C αντιδρώσας πρωτεΐνης (p value=0,733).

Αντίθετα, στην παρούσα μελέτη βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού με τα επίπεδα γλυκόζης, με τα επίπεδα ομοκυστεΐνης και με τα επίπεδα οξειδωμένης LDL χοληστερόλης. Σε σχέση με τα επίπεδα γλυκόζης, τα άτομα με γονότυπο TT εμφάνιζαν χαμηλότερα επίπεδα γλυκόζης νηστείας ($95,06 \pm 23,2$ mg/dl, $n=131$) σε σύγκριση με το γονότυπο CT ($99,29 \pm 25,8$ mg/dl, $n=177$) και με το γονότυπο CC ($107,42 \pm 42,8$ mg/dl, $n=36$). Η συσχέτιση του πολυμορφισμού με χαμηλά επίπεδα γλυκόζης ήταν οριακά σημαντική ($p=0,048$). Σε σχέση με τα επίπεδα ομοκυστεΐνης, τα άτομα με γονότυπο CT εμφάνιζαν υψηλότερα επίπεδα ($12,96 \pm 6,7$ μ mol/L, $n=128$) από τα άτομα με γονότυπο TT ($10,97 \pm 3,9$ μ mol/L, $n=79$) και από τα άτομα με γονότυπο CC ($10,58 \pm 2,3$ μ mol/L, $n=24$). Η συσχέτιση του πολυμορφισμού με αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης ήταν αρκετά σημαντική ($p=0,019$) και με δεδομένη τη συμμετοχή των επιπέδων ομοκυστεΐνης στη στεφανιαία νόσο, το παραπάνω εύρημα θα πρέπει να ερευνηθεί και σε ακόλουθες μελέτες. Σε σχέση με τα επίπεδα οξειδωμένης LDL χοληστερόλης, τα άτομα με γονότυπο CT εμφάνιζαν χαμηλότερα επίπεδα ($64,96 \pm 26,5$ mg/dl, $n=19$) από τα άτομα με γονότυπο TT ($74,10 \pm 28,7$ mg/dl, $n=21$) και από τα άτομα με γονότυπο CC ($115,57 \pm 13,9$ mg/dl, $n=4$). Η συσχέτιση του πολυμορφισμού με χαμηλά επίπεδα οξειδωμένης LDL χοληστερόλης ήταν αρκετά σημαντική ($p=0,012$), όμως το δείγμα ήταν αρκετά μικρό ($n=44$). Εξέταση μεγαλύτερου δείγματος είναι αναγκαία για την αποσαφήνιση του παραπάνω αποτελέσματος.

Τα αποτελέσματα της συσχέτισης του πολυμορφισμού C825T με τους βιοχημικούς δείκτες δεν είναι συγκρίσιμα με τα αποτελέσματα άλλων ερευνών, καθώς δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα.

Συμπερασματικά, ο πολυμορφισμός C825T φαίνεται να επικρατεί στον Ελληνικό πληθυσμό, ενώ δεν ασκεί επίδραση στα επίπεδα αρτηριακής πίεσης και στο δείκτη μάζας σώματος. Παράλληλα, φαίνεται να επιδρά θετικά στα χαμηλά επίπεδα γλυκόζης, στα χαμηλά επίπεδα οξειδωμένης LDL και στα υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης. Έρευνες με μεγαλύτερο δείγμα και σε σχέση με άλλους πολυμορφισμούς του γονιδίου θα μπορούσαν να ξεκαθαρίσουν το ρόλο του γονιδίου GNβ3 στην υπέρταση και τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Η ταυτοποίηση γενετικών δεικτών, αν και επίπονη, είναι χρήσιμη για την καλύτερη κατανόηση των νοσημάτων και την πρόληψη ή έγκαιρη αντιμετώπισή τους.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.

1. International Disease Statistics. *American Heart Association*. 2002.
2. Andreoli TE, Bennett JC, Carpenter CC, Plum F. (2000). *Cecil Παθολογία*. (Μουτσόπουλος Χ.). Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας. (έτος πρωτότυπης έκδοσης 1986).
3. Grundy SM. Primary prevention of coronary heart disease. *Circulation*. 1999;100:988-998.
4. Ockene IS, Miller NH. Cigarette smoking, cardiovascular disease, and stroke: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation*. 1998;96:3243-3247.
5. The JNC VI Guide To Prevention and Treatment of Hypertension Recommendations. JNC VI Risk Stratification and Treatment Recommendations. *From The Sixth Report of the Joint Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. Arch. Intern. Med.* 1997;157:2413-2446.
6. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. National Cholesterol Education Program (NCEP): third report of the Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol (Adult Treatment Panel III). 2001. NIH publications 01-3670.
7. Gotto AM. Low high-density lipoprotein cholesterol as a risk factor in coronary heart disease. *Circulation*. 2001;103:2213-2218.
8. Mahan LK, Escott-Stump S. Krause's food, nutrition, & diet therapy, 10th edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000.
11. Ross R. Atherosclerosis-An inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-126.
12. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis: Basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation*. 1995;91:2488-2496.
13. Γιάπαπα Θ, Ζαμπέλας Α. Οι επιδράσεις των αντιοξειδωτικών βιταμινών στα καρδιαγγειακά νοσήματα. Μια κριτική ανασκόπηση. *Ιατρική*. 2000;77(6):519-532.
14. Bertolini S, Cassanelli S, Garuti R, Ghisellini M, Simone ML, Rollerli M, Masturzo P, Calandra S. Analysis of LDL receptor gene mutations in Italian patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1999;19:408-418.
15. Benlian P, De Gennes JL, Foubert L, Zhang H, Gagne SE, Hayden M. Premature atherosclerosis in patients with familial chylomicronemia caused by mutations in the lipoprotein lipase gene. *N Engl J Med*. 1996;355:848-854.
16. Gerdes C, Fisher RM, Nicaud V, Boer J, Humphries SE, Talmud PJ, Faergeman O. Lipoprotein lipase variants D9N and N291S are associated with increased plasma triglyceride and lower high-density lipoprotein cholesterol concentrations. *Circulation*. 1997;96:733-740.
17. Jukema JW, Van Boven AJ, Groenemeijer B, Zwinderman AH, Reiber J, Bruschke A, Henneman JA, Molhoek GP, Bruin T, Jansen H, Gagne E, Hayden MR, Kastelein J. The Asp₉Asn mutation in the lipoprotein lipase gene is associated with increased progression of coronary atherosclerosis. *Circulation*. 1996;94:1913-1918.
18. Boren J, Ekstrom U, Agren B, Nilsson-Ehle P, Innerarity TL. The molecular mechanism for the genetic disorder familial defective apolipoprotein B100. *J Biol Chem*. 2001;276(12):9214-9218.
19. Ishigami T, Umemura S, Iwamoto T, Tamura K, Hibi K, Yamaguchi S, Nyuui N, Kimura K, Miyazaki N, Ishii M. Molecular variant of angiotensinogen gene is associated with coronary atherosclerosis. *Circulation*. 1995;91:951-954.
20. Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyuui N, Fujita T, Ochiai H, Kosuge M, Watanabe Y, Yoshii Y, Kihara M, Kimura K, Ishii M, Umemura S. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infraction. *Hypertension*. 1998;32:521-526.
21. Wenzel K, Ernst M, Rohde K, Baumann G, Speer A. DNA polymorphism in adhesion molecule genes – a new risk factor for early atherosclerosis. *Hum Genet*. 1996;97:15-20.
22. Nagano M, Yamashita S, Hirano K, Kujiraoka T, Mayumi I, Sagehashi Y, Hattori H, Nakajima N, Maruyama T, Sakai N, Egashira T, Matsuzawa Y. Point mutation (-69 G→A) in the promoter region of cholesteryl ester transfer protein gene in Japanese hyperalphalipoproteinemic subjects. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2001;21:985.

23. Kodolitsch Y, Pyeritz RE, Rogan PK. Splice-site mutations in atherosclerosis candidate genes. *Circulation*. 1999;100:693-699.
24. Beevers G, Lip G, O'Brien E. The pathophysiology of hypertension. *BMJ*. 2001;322:912-916.
25. Zeman FJ. Clinical nutrition and dietetics, 2nd edition. New York, USA: Mc Millian Publ. Co., 1991.
26. Hall JE. Renal and cardiovascular mechanisms of hypertension in obesity. *Hypertension*. 1994;23:381.
27. Fuchs FD, Chambless LE, Whelton PK, Nieto FJ, Heiss G. Alcohol consumption and the incidence of hypertension. The atherosclerosis risk in communities study. *Hypertension*. 2001;37:1242-1250.
28. Wilde DW, Massey KD, Walker GK, Vollmer A, Grekin RJ. High-fat diet elevates blood pressure and cerebrovascular muscle Ca^{+2} current. *Hypertension*. 2000;35:832-837.
29. Baker EH, Dong YB, Sagnella GA, Onipinla AK, Markandu ND, Cappuccio FP, Cook DG, Persu A, Corvol P, Jeunemaitre X, Carter ND, MacGregor GA. Association of hypertension with T594M mutation in β subunit of epithelial sodium channels in black people resident in London. *Lancet*. 1998;351:1388-1392.
30. Hansson JH, Schild L, Lu Y, Wilson TA, Gautschi I, Shimkets R, Nelson-Williams C, Rossier BC, Lifton RP. A de novo missense mutation of the β subunit of the epithelial sodium channel causes hypertension and Liddle syndrome, identifying a proline-rich segment critical for regulation of channel activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:11495-11499.
31. Sethi AA, Nordestgaard BG, Agerholm-Larsen B, Frandsen E, Jensen G, Tybjaerg-Hansen A. Angiotensinogen polymorphisms and elevated blood pressure in the general population. The Copenhagen city heart study. *Hypertension*. 2001;37:875-881.
32. Ishikawa K, Baba S, Katsuya T, Iwai N, Asai T, Fukuda M, Tackiuchi S, Fu Y, Mannami T, Ogata J, Higaki J, Ogihara T. T+31C polymorphism of angiotensinogen gene and essential hypertension. *Hypertension*. 2001;37:281-285.
33. Spiering W, Kroon AA, Fuss-Lejeune M, Daemen M, Leeuw PW. Angiotensin II sensitivity is associated with the angiotensin II type 1 receptor A¹¹⁶⁶C polymorphism in essential hypertensives on a high sodium diet. *Hypertension*. 2000;36:411-416.
34. Sato M, soma M, Nakayama T, Kanmatsuse K. Dopamine D1 receptor gene polymorphism is associated with essential hypertension. *Hypertension*. 2000;36:183-186.
35. Sass C, Pallaud C, Zannad F, Visvikis S. Relationship between E-selectin L/F554 polymorphism and blood pressure in the Stanislas cohort. *Hum Genet*. 2000;107(1):58-61.
36. Jiang Z, Akey JM, Shi J, Xiong M, Wag Y, Shen Y, Xu X, Chen H, Wu H, Xiao J, Lu D, Huang W, Jin L. A polymorphism in the promoter region of catalase is associated with blood pressure levels. *Hum Genet*. 2001;109:95-98.
37. Kamitani A, Wong Z, Fraser R, Davies DL, Connor JM, Foy C, Watt G, Harrap SB. Human α -adducin gene, blood pressure, and sodium metabolism. *Hypertension*. 1998;32:138-143.
38. Moore TJ, Vollmer WM, Appel LJ, Sacks FM, Svetkey LP, Vogt TM, Conlin PR, Simons-Morton DG, Carter-Edwards L, Harsha DW. Effect of dietary patterns on ambulatory blood pressure. Results from the dietary approaches to stop hypertension (DASH) trial. *Hypertension*. 1999;34:472-477.
39. Obarzanek E, Sacks FM, Vollmer WM, Bray GA, Miller ER, Lin PH, Karanja NM, Most-Windhauser MM, Moore TJ, Swain JF, Bales CW, Proschan MA. Effects on blood lipids of a blood pressure-lowering diet: the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) Trial. *Am J Clin Nutr*. 2001;74:80-89.
40. The DASH diet. National institutes of health. National heart, lung, and blood institute. 2001. NHI publication 01-4082.
41. Mycek MJ, Harvey R, Champe PC. (1998) Φαρμακολογία. (Παπαδόπουλος ΙΣ, Παπαδόπουλος Γ.) Επιστημονικές εκδόσεις: Γρ. Παρισιάνος. (έτος πρωτότυπης έκδοσης 1997).
42. Morris AJ, Malbon CC. Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiological Reviews*. 1999;79(4):1373-1420.

43. Hamm HE. The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem.* 1998;273(2):669-672.
44. Clapham DE, Neer EJ. G protein $\beta\gamma$ subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997;37:167-203.
45. Μαρμάρας Β, Λαμπροπούλου-Μαρμάρα Μ. Βιολογία κυττάρου-Μοριακή προσέγγιση. 4^η έκδοση. Πάτρα: Εκδόσεις Typorama, 2000.
46. Orłowski J, Grinstein S. Na^+/H^+ exchangers of mammalian cells. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.* 1997;272(36):22373-22376.
47. Reeves JP, Aviv A. Na^+/H^+ exchange and essential hypertension. A new approach. *Hypertension.* 1995;25:978-980.
48. Siffert W, Düsing R. Sodium-Proton exchange and primary hypertension. An update. *Hypertension.* 1995;26:649-655.
49. Siffert W. G protein $\beta 3$ subunit 825T allele, hypertension, obesity and diabetic nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2000;15:1298-1306.
50. Siffert W, Roskopf D, Moritz A, Wieland T, Kaldenberg-Stasch S, Kettler N, Hartung K, Beckmann S, Jakobs KH. Enhanced G protein activation in immortalized lymphoblasts from patients with essential hypertension. *J. Clin. Invest.* 1995;96 :759-766.
51. Pietruck F, Moritz A, Montemurro M, Sell A, Busch S, Roskopf D, Virchow S, Esche H, Brockmeyer N, Jakobs KH, Siffert W. Selectively enhanced cellular signaling by Gi proteins in essential hypertension. *Gai2, Gai3, G β 1 and G β 2 are not mutated. Circulation Research.* 1996;79:974-983.
52. Roskopf D, Busch S, Manthey I, Siffert W. G protein $\beta 3$ gene. *Hypertension.* 2000;36:33-41.
53. Farfel Z, Bourne HR, Iiri T. The expanding spectrum of G protein diseases. *N Engl J Med.* 1999;340(13):1012-1020.
54. Siffert W, Roskopf D, Siffert G, busch S, Moritz A, Erbel R, Sharma AM, Ritz E, Wichmann H-E, Jakobs KH, Horsthemke B. Association of a human G-protein $\beta 3$ subunit variant with hypertension. *Nat Genet.* 1998;18:45-48.
55. Benjafield AV, Jeyasingam CL, Nyholt DR, Griffiths LR, Morris BJ. G-protein $\beta 3$ subunit gene (GNB3) variant in causation of essential hypertension. *Hypertension.* 1998;32:1094-1097.
56. Beige J, Hohenbleicher H, Distler A, Sharma A. G-protein $\beta 3$ subunit C825T variant and ambulatory blood pressure in essential hypertension. *Hypertension.* 1999;33:1049-1051.
57. Tozawa Y. G protein beta3 subunit variant: tendency of increasing susceptibility to hypertension in Japanese. *Blood Press.* 2001;10(3):131-134.
58. Dong Y, Zhu H, Sagnella GA, Carter ND, Cook DG, Cappuccio FP. Association between the C825T polymorphism of the G protein $\beta 3$ -subunit gene and hypertension in blacks. *Hypertension.* 1999;34:1193-1196.
59. Schunkert H, Hense H-W, Döring A, Rieger G, Siffert W. Association between a polymorphism in the G protein $\beta 3$ subunit and lower renin and elevated diastolic blood pressure levels. *Hypertension.* 1998;32:510-513.
60. Turner ST, Schwartz GL, Chapman AB, Boerwinkle E. C825T polymorphism of the G protein $\beta 3$ -subunit and antihypertensive response to a thiazide diuretic. *Hypertension.* 2001;37(part 2):739-743.
61. Kato N, Sugiyama T, Morita, Kurihara H, Yamori Y, Yazaki Y. G protein $\beta 3$ subunit variant and essential hypertension in Japanese. *Hypertension.* 1998;32:935-938.
62. Ishikawa K, Imai Y, Katsuya T, Ohkubo T, Tsuji I, Nagai K, Takami S, Nakata Y, Satoh H, Hisamichi S, Higaki J, Ogihara T. Human G-protein beta3 subunit variant is associated with serum potassium and total cholesterol levels but not with blood pressure. *Am. J. Hypertension.* 2000;13(2):140-145.
63. Brand E, Herrmann S-M, Nicaud V, Ruidavets J-B, Evans A, Arveiler D, Luc G, Plouin P-F, Tiret L, Cambien F. The 825C/T polymorphism of the G-protein subunit $\beta 3$ is not related to hypertension. *Hypertension.* 1999;33:1175-1178.
64. Siffert W. Molecular genetics of G proteins and atherosclerosis risk. *Basic Res. Cardiol.* 2001;96(6):606-611.

65. Larson N, Hutchinson R, Boerwinkle E. Lack of association of 3 functional gene variants with hypertension in African Americans. *Hypertension*. 2000;35:1297-1300.
66. Snapir A, Heinonen P, Tuomainen TP, Lakka TA, Kauhanen J, Salonen JT, Scheinin M. G-protein $\beta 3$ subunit C825T polymorphism: no association with risk for hypertension and obesity. *J. Hypertension*. 2001;19:2149-2155.
67. Buchmayer H, Sunder-Plassmann G, Hirschl MM, Kletzmayer J, Woisetschlager C, Laggner AN, Hörl WH, Födinger M. G-protein $\beta 3$ subunit gene (GNB3) polymorphism 825C $\rightarrow$ T in patients with hypertensive crisis. *Crit Care Med*. 2000;28:3203-3206.
68. Hegele RA, Harris SB, Hanley A, Cao H, Zinman B. G protein $\beta 3$ subunit gene variant and blood pressure variation in Canadian Oji-Cree. *Hypertension*. 1998;32:688-692.
69. Schorr U, Blascke K, Beige J, Distler A, Sharma AM. G-protein $\beta 3$ subunit 825T allele and response to dietary salt in normotensive men. *J. Hypertension*. 2000;18:855-859.
70. Poch E, González D, Gómez-Angelats E, Enjuto M, Paré JC, Rivera F, Sierra A. G-protein $\beta 3$ subunit gene variant and left ventricular hypertrophy in essential hypertension. *Hypertension*. 2000;35(part 2):214-218.
71. Semplicini A, Siffert W, Sartori M, Monari A, Naber C, Frigo G, Santonastaso M, Cozzutti E, Winnicki M, Palatini P. G protein beta3 subunit gene 825T allele is associated with increased left ventricular mass in young subjects with mild hypertension. *Am. J. Hypertension*. 2001;14(12):1191-1195.
72. Sedláček K, Fischer M, Erdmann J, Hegstenberg C, Holmer S, Kürzinger S, Muscholl M, Luchner A, Riegger GA, Hense H-W, Schunkert H. Relation of the G protein $\beta 3$ -subunit polymorphism with left ventricle structure and function. *Hypertension*. 2002;40:162.
73. Baumgart D, Naber C, Haude M, Oldenburg O, Erbel R, Heusch G, Siffert W. G protein $\beta 3$ subunit 825T allele and enhanced coronary vasoconstriction on $\alpha 2$ -adrenoceptor activation. *Circ Res*. 1999;85:965-969.
74. Dobrev D, Wettwer E, Himmel HM, Kortner A, Kuhlisch E, Schüler S, Siffert W, Ravens U. G-protein $\beta 3$ -subunit 825T allele is associated with enhanced human atrial inward rectifier potassium currents. *Circulation*. 2000;102:692-697.
75. Morrison AC, Doris PA, Folsom AR, Nieto FJ, Boerwinkle E. G-protein $\beta 3$ subunit and α -adducin polymorphism and risk of subclinical and clinical stroke. *Stroke*. 2001;32:822-829.
76. Naber CK, Hüsing J, Wolfhard U, Erbel R, Siffert W. Interaction of the ACE D allele and the GNB3 825T allele in myocardial infarction. *Hypertension*. 2000;36:986-989.
77. Zeltner R, Delles C, Schneider M, Siffert W, Schmieder RE. G-protein $\beta 3$ subunit gene (GNB3) 825T allele is associated with enhanced renal perfusion in early hypertension. *Hypertension*. 2001;37:882-886.
78. Beige J, Engeli S, Ringel J, Offerman G, Distler A, Sharma AM. Donor G protein $\beta 3$ subunit 825TT genotype is associated with reduced kidney allograft survival. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10:1717-1721.
79. Wüthrich RP, Cicvara S, Booy C, Widmer U, Binswanger U. The 825C/T polymorphism of the G-protein subunit $\beta 3$ does not influence blood pressure and renal function in kidney transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15:1663-1666.
80. Fogarty DG, Zychma MJ, Scott LJ, Warram JH, Krolewski AS. The C825T polymorphism in the human G-protein $\beta 3$ subunit gene is not associated with diabetic nephropathy in type I diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1998;41:1304-1308.
81. Blüthner M, Schmidt S, Siffert W, Knigge H, Nawroth P, Ritz E. *Kidney International*. 1999;55:1247-1250.
82. Beige J, Ringel J, Distler A, Sharma AM. G-protein $\beta 3$ -subunit C825T genotype and nephropathy in diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15:1384-1387.
83. Hegele RA, Anderson C, Young TK, Connelly PW. G-protein $\beta 3$ subunit gene splice variant and body fat distribution in Nunavut Inuit. *Genome Research*. 1999;9:972-977.

84. Siffert W, Forster P, Jöckel K-H, Mvere DA, Brinkmann B, Naber C, Crookes R, Heyns ADP, Epplen JT, Fridley J, Freedman BI, Müller N, Stolke D, Sharma AM, Moutarey KA, Grosse-Wilde H, Buerbaum B, Ehrlich T, Ahmad HR, Horsthemke B, Du Toit ED, Tilikainen A, Ge J, Wang Y, Yang D, Hüsing J, Roskopf D. Worldwide ethnic distribution of the G protein $\beta 3$ subunit 825T allele and its association with obesity in Caucasian, Chinese, and black African individuals. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10:1921-1930.
85. Ryden M, Faulds G, Hoffstedt J, Wennlund A, Arner P. Effect of the (C825T) G $\beta 3$ polymorphism on adrenoceptor-mediated lipolysis in human fat cells. *Diabetes.* 2002;51:1601-1608.
86. Λεκανίδου Ρ, Τσιτήλου Σ, Ροδάκης Γ. Εισαγωγή στη μοριακή βιολογία. Πανεπιστήμιο Αθηνών-Τμήμα βιολογίας. 1998.
87. United states national library of medicine. NCBI Sequence Viewer. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?cmd=&txt=&save=0&cfm=&itemID=454&list_uids=1633547
88. Levine MA, Smallwood PM, Moen PT, Helman LJ, Ahn TG. Molecular cloning of $\beta 3$ subunit, a third form of the G protein β -subunit polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990;87:2329-2333.

6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.

A. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΓΟΝΙΔΙΟΥ – ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ.

➤ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΓΟΝΙΔΙΟΥ GNB3.

Ακολουθεί η αλληλουχία του γονιδίου GNB3 και τα εξόνια που το αποτελούν (87). Στο εξόνιο 10 σημειώνεται και η θέση του πολυμορφισμού C825T (νουκλεοτίδιο 5500). Στον πίνακα 6.1 φαίνονται τα όρια και τα μεγέθη των εξονίων καθώς και τα μεγέθη των εσονίων (52).

Gene "GNB3"

BASE COUNT 1527 a 2129 c 1783 g 1743 t

```

EX.1   1 ccacaatagg ggcagacctg tccatccttc tctgtgggtc ccctgtacct ttctcccca
      61 acaggatcag acccagaggc agctgggttg ggtttgtcga gaagaaggat tatccagatc
     121 agtcctttct aatctcagct cctgcctgta ccctcccata ctcaccaaac cctcttcccc
     181 accaccctga gctgaggagc acagtttgag gtactgacaa tggggccatc tatcaccctt
     241 atatcccacc tcctggcctg gttgctaagt ggccctgact gccaagatca tcaccatgga
     301 tggggggccg gaccaggggg gccactggag ctgtagtgtt ctgtctcttt gcacccctcc
     361 caaaccccaa cccttaatcc tcacagcttt gctctaattc tgtggggcct gatgtcttta
     421 tctctgcctg cagagactga ccagggaagc accccttcac cccctcctct ctcagggtct
     481 gtggtggggg ctgcccctct ctatggcccc acactcctgc cccaaccctt cctcccggtt
     541 gggcccaagt ctctctggaa tccgtacacc tccctccctc ccccacccc ttccccccac
     601 ccctgccagc tgatttcatt tgcctgacgt tgtggttggc tctacccttc cctgtcaggc
EX.2   661 cccccaacc ccccgccggt cggggccagg ccaggccagg ccagctcctc tggcagcaga
     721 gcctgggcag gtgacgggcg ggcgcgggcg tcgcagctga gggagtaagg aggcctccag
     781 gaaccggagc tggaaacccg gccgaggtcc agccagagcc caagtaagag ggagctggcc
     841 tgggctctgc tctcctgggc tggggcgagc gcagggtcga ggcaggctgg ggctggacgc
     901 aaaggacctc aaacttgag ggcctagctg gggagagggg gcagccaccc agtcgtttcc
     961 ctgtgtcttg gagtctggtg tgggcagaa gggcagaagc acagcctggt ggggggttcc
EX.3  1021 tcaacaccga ccccatgttc ctggcaggag ccagagtgc ccctcgacct gtcagccatg
     1081 ggggagatgg agcaactgcy tcaggaagcg gagcagctca agaagcagat tgcagtaact
     1141 ccagagccct acccctgggg cccagaaaaa cagctgggga catgaggagc gtggccagg
     1201 gggagggggc tgggtttgct cttgagtgc tagaagtgc cagggacttt ctaaacttgg
     1261 ttcgcatatt tgagaccccc aagccccaga gcccgaagac caacctgccc tgaaggccca
EX.4  1321 tgcacctgcc acccccacct cgcccttgct cccctgatgt ctgctttccc tgcaggatgc
     1381 caggaaagcc tgtgctgacg ttactctggc agaggtaaga cccctgtcc cccggaaggc
     1441 agggcatggg gggaggggaa gggagctccc cgaccgcgaa tagcgcgttg ctccgagcat
     1501 tagtacagca cgtccttgga gtgaggaaac ccattaatta attcattcga ccaacatttt
     1561 agcgggacct gctctgagcc aggcaccata ttggatgcga aagatgcgga cacggttcct
     1621 attctcatcc gtagaacaag agtgaccaca gccccctccc agggccttga agatgaagaa
     1681 gcgatagtac tttgtaaatt ataaagccct tgtagactct agctgctagt tttctatgct
     1741 gtattttgtc aattctaaga tgcacatttc ttcacatttt gacatctctg aatcaagggt
     1801 gcattcagca atggatcatt gtttcaatta gaattgacag catcttttct tctttagtga
     1861 tgcaccttag attggattaa atatgttaat agtgaacact ttttatgagc cagatactgg
     1921 gctaagctgc ataaatacct gatttcattg aattttcatg atatctctgt aaggtaggtg
     1981 ctatgataag cctcatttta caccctgagt aaacagactc agggaggtga agcaacttgc
     2041 ccaacataac aaagcaggcc gggcgagtg gttcacgcct gtaatcccag cctttggga
     2101 gactgacgtg aaaggatcac ttgagctcag gattttgaga ccagcctggg caacatagtg
     2161 agatctcttc ttaataataa aaaaattgct ttttaacttt taaaaaaaga tagcaatgca
     2221 agtgatggca aatcaagtct gttcactctg gaccccgagc ctaagtctaa aatgtggtta
     2281 gagctcaagg ggcatagtac cacagatttc agggagtaca gttcagggtc atgggtgatgc
     2341 ccagggcacc cagttaaaaa gctagccgtg ctgcagcggg ggggtgcaagc aggcctctct
     2401 cggcttgga gagccagctc tgtgcatctc tcccaaatac tgtttccaat gacctcacat
     2461 tggcagctgg aaactgggtc aagtgcaggt attcgtatcg tggaaatcac cttcccacct
     2521 tcctcaccaa cactggagag gtgcttggtt aacacttaca agcaacacac ctctggccat
     2581 gcatgcatct ctttcccaca tcagtctaag acactccagg gcagagactt atttctctaa
     2641 ggctgggggc ctgacctaga gcctggcaca gagcgggaac ttgtatagat cagtggcagt
EX.5  2701 gacagacatc tgggcacgta acctgctcac cctgatattc agtccccctc tctctgcagc
     2761 tgggtgtctg cctagagggt gtgggacgag tccagatgcg gacgcggcgg acgttaaggg
     2821 gacacctggc caagatttac gccatgcact gggccactga ttctaagtga ggcttggggg
     2881 ggaaccgaga atgggagggg gagagcggga gtgaggaagg cgggaagggg aggcctgcat
EX.6  2941 gatatgggat gccctctccc caggctgctg gtaagtgcct cgcaagatgg gaagctgatc

```

3001 gtgtgggaca gctacaccac caacaaggta ccagccctgc ctccctgagc ctccaccact
 3061 gcatccttcc taagggcgcc atgcctaccc tcctgtgccc agctgggagc ttggctccgg
 EX. 7 3121 tcccatctct gctcaaacca ccctccctgc aggtgcacgc catccactg cgctcctcct
 3181 gggatcatgac ctgtgcctat gccccatcag ggaactttgt ggcattgtggg gggctggaca
 3241 acatgtgttc catctacaac ctcaaattccc gtgagggcaa tgtcaagggtc agccgggagc
 3301 tttctgctca cacagggtgag ggagagacc tctcctcccc tcctgagggg ttcaggggaa
 3361 cctgggcttc cagtgggctg tggctctgca gccagggcac tgtccttcta accgcctcca
 EX. 8 3421 gggtatctct cctgctgccg ctccctggat gacaacaata ttgtgaccag ctggggggac
 3481 accacgtggt gaggtgaac attgctgggt ctggggcttg ggagtgggccc cggcctttct
 EX. 9 3541 ctaacagtct ccctccattt tggcagtgcc ttgtgggaca ttgagactgg gcagcagaag
 3601 actgtatttt tgggacacac ggggtgactgc atgagcctgg ctgtgtctcc tgacttcaat
 3661 ctcttcattt cgggggcctg tgatgccagt gccaagctct gggatgtgag agaggggacc
 3721 tgccgtcaga ctttactggt ccacgagtcg gacatcaacg ccatctgtgt gagtgcacc
 3781 cccacccag cttactcca actccttccc cgacactccc cacaacacat acaatacaca
 3841 tcctctgccc ctcccatagc ttccctagcc ctttcttact gtattttttt tttttttttt
 3901 tttttttttg agacagagtc tcactttgtc gccaggctg gagtgcagtg gtgcaatctt
 3961 ggctcactgc aacctctgcc tcctgggttg gagcaattct cctgcttcag cctcctgagt
 4021 agctgggatt acaggtgtgc gccaccatgc cgggctaatt tttgtatttt tagtagagat
 4081 ggggttttgc catgttggtc aggtgtgtct tgaactcttg acctgaggtg atcctccac
 4141 ctgagcttcc cagagtgcag tgctgggatt acagatgtga gccactgtgc ccagtcttcc
 4201 ctgacccttt ctttcttccc tttttttgga gacagagtct cacactgttg cccagtctgg
 4261 atgcagtggg gctatcatag ctcaccgcag tctcaacctc cagggttcaa ccaatcctcc
 4321 caccacagcc tcctgagtag ctgggactac agatgcgtgt gaccacgctt ggctaattgt
 4381 ttgatttttg ttagagatg ggttcccact atgttgccca ggctgagctg gaacttctga
 4441 gctcaagcga tcctcctgcc tcagtctccc aaaatatttg gattacaggc atgagccacc
 4501 acgcctagcc cattttatca cgtttgcttt atcatttttt ctctgtagag aaatagccat
 4561 agatacacac acacatacac acttagatgt agatatacat tttctttctg tgtcttttga
 4621 aagtaggttg cagacatcat gtttctttac cccttaagta cttcccgaag caaagccctt
 4681 ctgtagcata atcactgtat gattcttaag atcaggaaac tcaacattga cacaactacta
 4741 cagtctacga tctatattca aatttcacca atagcctcaa aaatgtccat aatagctcat
 4801 gtttttttct gtccaggatc caatccagaa acgtgcatta ctttctctcg ccatatcttt
 4861 ttcgtcacca cttttaaact ggaactgttt tcccaccttt gtcttttatg tcattgacgt
 4921 ttttgaagag tacaaccag ttttctgtag actctccctc cgtttgagct tatctgacat
 4981 ttgctcgccg tgagatccag gccttgcat tgtactggac cctgttctta cacaccctga
 5041 tccagccac ttgtgtagtc tgggagctcg ggacaacctc cgtccgccct tctagccggg
 5101 tctctgcagg caagccttg tgccttgcc tgcgacgtgg aaatgatgcc tgcctgcagc
 5161 gctgtatagt gcagagcggg cgaggggcat agggagagtc ctggcacgtg gtatgtgttg
 5221 gcagggctgc ttctacccc aaaccaaggg agggacaggc agggaggctg agagcagcgg
 5281 cttgccctgg agctgtcagg tgggaggcag agggcgagg aggtgtggg ctgccagggt
 EX. 10 5341 ctgatccctg acccacttgc caccctgccc ctcagttctt cccaatgga gaggccatct
 5401 gcacgggctc ggatgacgct tcctgccgct tgtttgacct gcgggcagac caggagctga
 C825T 5461 tctgcttctc ccacgagagc atcatctcg gcacacgtc cgtggccttc tccctcagt
 5521 gccgctact attcgtggc tacgacgact tcaactgcaa tgtctgggac tccatgaagt
 5581 ctgagcgtgt gggttaagggc cagccctggc tgccttccc tcagctggaa ggaccctccc
 5641 cagccctccc tccccattct gtacccccca tcagctccca tttcggactc tcttactgct
 5701 gtccctgtgc actgggtgac tccaccctg gaattccagta ccccttggtt cccaactagg
 5761 actgttttcc ctcagtgttg ctctaagcag cctctctcca ctgcccattg cctgactgc
 5821 tccctgccct agggatcttg tggaccatga ctgtccagtc agttctgggt tcctggcatt
 5881 tcaggggcac ccactgagag gcaagacagc ctcagggaaa catggaatca aggcagaatc
 5941 aaggagatct ggagtggccc gagggccctg actgcagcct agggctcatc taagactagc
 6001 ctgaagtttg tcagatagga tggcttcttc tctatcaaga ggccagggtg tgatgaaaat
 6061 aacactggcc aggggcagaa tccaaatcct aattctgttg ctcactttct gagtgtcctt
 6121 gcacaagtca ctctccatg ggcctcagtt tcttcatctg gaagcaaaga aataggatga
 6181 acggttgcc tctcttttcc agcacctgtc aaggtgccct cgggtttttt catagtacac
 6241 agatgcttcc agcctttctc tgtctgatcc cagccctccc ccaaccaaag ctcttgacag
 6301 agaacccct gccctacagc taatcctctt tcagtctctt agccttcttc aggggttgag
 6361 cccagtctac cgagtctagg atccctgcat gcatgtgctc aagcacacat gcacacacac
 6421 acgtacacac acccacacat gcatacacat gcacacatat cccccacac acccacatac
 6481 acacacacac ccacacacc acacatacac ttacacgcat gcacacactg ctttccaaat
 EX. 11 6541 cagcttgag agacaggctg actcctttcc ctcttctca ggcatcctct ctggccacga
 6601 taacagggtg agctgcctgg gactcacagc tgacgggatg gctgtggcca caggttcctg
 6661 ggacagcttc ctcaaaatct ggaactgagg aggtggaga aagggaagtg gaaggcagt
 6721 aacacactca gcagccccct gcccgacccc atctcattca ggtgttctct tctatattcc
 6781 ggggtgccatt cccactaagc tttctccttt gagggcagtg gggagcattg gactgtgcct
 6841 ttgggaggca gcatcaggga cacaggggca aagaactgcc ccatctctc ccatggcctt

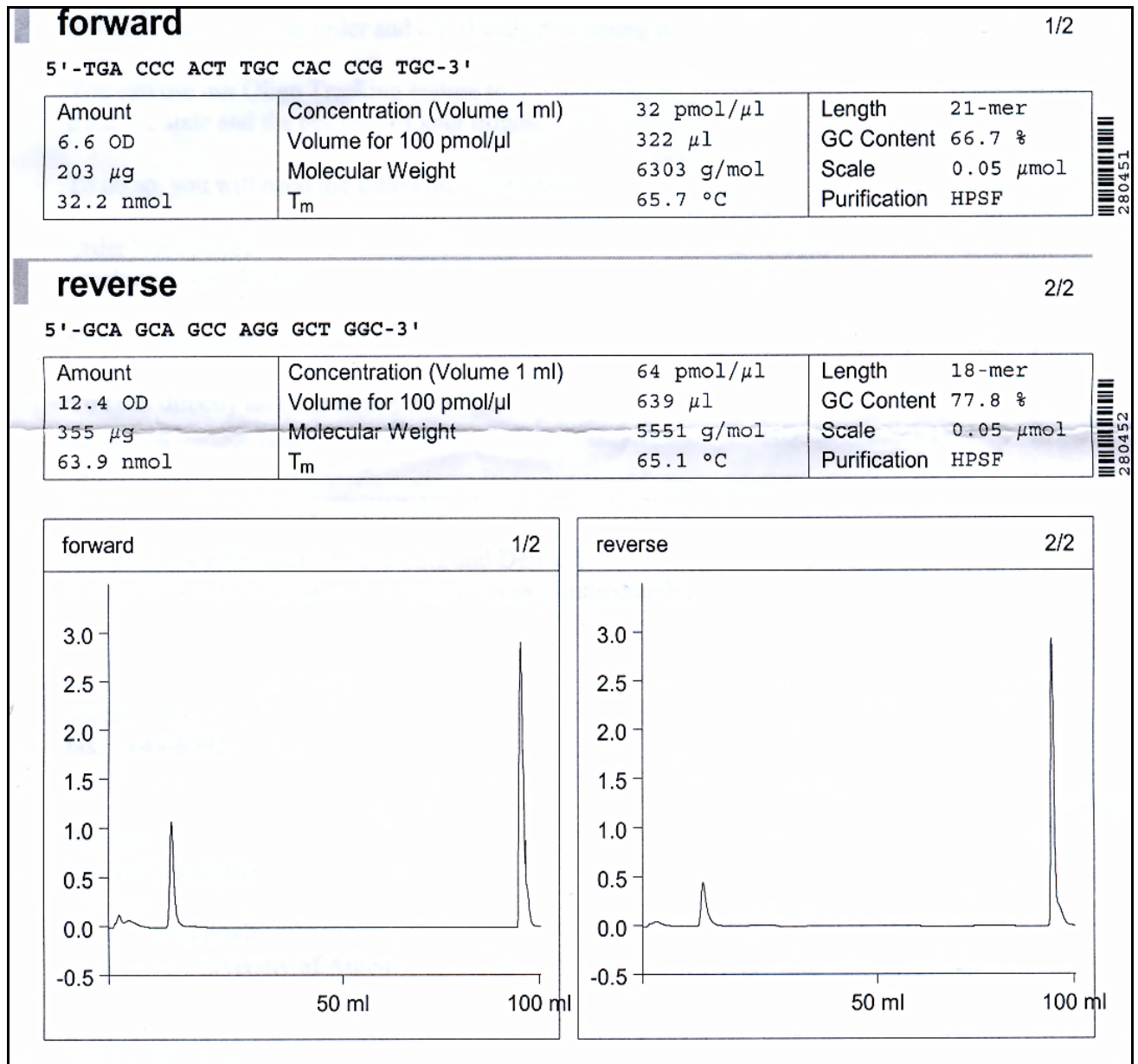
6901 ccctccccac agtcctcaca gcctctcctt taatgagcaa ggacaacctg cccctcccca
 6961 gccctttgca ggcccagcag acttgagtct gaggccccag gccctaggat tctccccca
 7021 gagccactac ctttgtccag gcctgggtgg tatagggcgt ttggccctgt gactatggct
 7081 ctggcaccac tagggctctg gccctcttct tattcatgct ttctcctttt tctacctttt
 7141 tttctctcct aagacacctg caataaagtg tagcaccctg gt

ΠΙΝΑΚΑΣ 6.1. ΕΞΟΝΙΑ ΚΑΙ ΕΞΟΝΙΑ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ GNβ3 (52).

ΕΞΟΝΙΟ	ΜΕΓΕΘΟΣ bp	ΘΕΣΗ	ΕΞΟΝΙΟ	ΜΕΓΕΘΟΣ bp
1	210	1-209	1	448
2	165	658-822	2	224
3	87	1047-1133	3	241
4	39	1375-1413	4	1345
5	107	2759-2865	5	97
6	64	2963-3026	6	125
7	163	3152-3314	7	106
8	67	3421-3487	8	78
9	202	3566-3767	9	1607
10	217	5375-5591	10	989
11	601	6581-7181		

B. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΓΙΑ PCR, ΠΕΨΗ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ.

1. ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ.



2. Taq ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ.

GIBCOBRL® LIFE TECHNOLOGIES.

PLATINUM® Taq DNA Polymerase

Cat. No. 10966-034

Conc.: 5 U/μl

Size: 500 Units

Store at -20°C in a non-frost-free freezer.

LICENSED FOR PCR

Description:

PLATINUM Taq DNA Polymerase is recombinant Taq DNA polymerase complexed with proprietary antibody that inhibits polymerase activity. Due to specific binding of the inhibitor, PLATINUM Taq DNA Polymerase is provided in an inactive form. This reagent provides an automatic "hot start" for Taq DNA polymerase in PCR (1,2,3). Hot starts are typically used in PCR to increase sensitivity, specificity, and yield while allowing assembly of reactions at ambient temperatures. The extra time, effort, and contamination risks associated with manual hot start procedures are addressed with the use of PLATINUM Taq DNA Polymerase. The activity of Taq DNA polymerase is blocked at ambient temperatures but is regained after the denaturation step in PCR cycling at 94°C. By increasing the effectiveness of Taq DNA polymerase through the use of this product, it is possible to reduce the optimization and handling of reaction components and improve PCR results. PLATINUM Taq DNA Polymerase is supplied at the same 5 unit per μl concentration as Taq DNA Polymerase (Cat. No. 10342-053). The inhibitor-bound enzyme is sufficient to eliminate or reduce nonspecific amplification in PCR. No modification to PCR reactions or protocols are necessary. PLATINUM Taq DNA Polymerase has no enzyme activity until heat denaturation is performed. This enzyme formulation can also be used in a larger volume cocktail mix without difficulty.

Components:

PLATINUM Taq DNA Polymerase	10966-034
10X PCR Buffer, Minus Mg	Y02028
50 mM Magnesium Chloride	Y02016

Doc. Rev.: 03/12/01

This product is distributed for laboratory research only. CAUTION: Not for diagnostic use. The safety and efficacy of this product in diagnostic or other clinical uses has not been established.

For technical questions about this product, call the Life Technologies Tech-LineSM (800) 828-6686.

Page 2 of 4

Storage Buffer:

20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 40 mM NaCl, 2 mM Sodium Phosphate, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, stabilizers, 50% (v/v) glycerol

10X PCR Buffer:

200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl

Unit Definition:

One unit of PLATINUM Taq DNA Polymerase incorporates 10 nmol of deoxyribonucleotide into acid-precipitable material in 30 min at 74°C.

Quality Control:

PLATINUM Taq DNA Polymerase is evaluated in a DNA polymerization activity assay that measures the percent of Taq DNA polymerase inhibition versus an uninhibited control. PLATINUM Taq DNA Polymerase is functionally tested for amplification. The product is tested for the absence of double- and single-stranded endonuclease activity as well as the absence of 5'- and 3'-exonuclease activity.

PCR Precautions:

Since PCR is a powerful technique capable of amplifying trace amounts of DNA, all appropriate precautions should be taken to avoid cross-contamination. Ideally, amplification reactions should be assembled in a DNA-free environment. Use of aerosol-resistant barrier tips is recommended. Take care to avoid contamination with the primers or template DNA used in individual reactions. PCR products should be analyzed in an area separate from the reaction assembly area.

Protocol:

The following general procedure is suggested as a guideline and as a starting point when using PLATINUM Taq DNA Polymerase in any PCR amplification. Optimal reaction conditions (incubation times and temperatures, concentration of PLATINUM Taq DNA Polymerase, primers, MgCl₂, and template DNA) vary and need to be optimized. Reaction size may be altered to suit user preferences.

Cat. No. 10966-034

Page 3 of 4

1. Add the following components to a sterile 0.5-ml microcentrifuge tube:

Components	Volume	Final Concentration
10X PCR Buffer, Minus Mg	5 μl	1X
10 mM dNTP mixture	1 μl	0.2 mM each
50 mM MgCl ₂	1.5 μl	1.5 mM
Primer mix (10 μM each)	1 μl	0.2 μM each
Template DNA	≥1 μl	(as required)
PLATINUM Taq DNA Polymerase	0.5 μl	2.5 units (or as required)
Autoclaved, distilled water	to 50 μl	Not applicable

If desired, a master mix can be prepared for multiple reactions, to minimize reagent loss and to enable accurate pipetting.

2. Mix contents of the tubes and overlay with 50 μl of mineral or silicone oil, if necessary.
3. Cap the tubes and centrifuge briefly to collect the contents.
4. Incubate tubes in a thermal cycler at 94°C for 30 s to 2 min to completely denature the template and activate the enzyme.
5. Perform 25-35 cycles of PCR amplification as follows:

Denature	94°C for 30 s
Anneal	55°C for 30 s
Extend	72°C for 1 min per kb
6. Maintain the reaction at 4°C after cycling. The samples can be stored at -20°C until use.
7. Analyze the amplification products by agarose gel electrophoresis and visualize by ethidium bromide staining. Use appropriate molecular weight standards.

Cat. No. 10966-034

Page 4 of 4

References:

1. Chou, Q., et al. (1992) *Nucl. Acids Res.*, 20, 1717.
2. Sharkey, D.J., et al. (1994) *BioTechnology*, 12, 506.
3. Westfall, B.A., et al. (1997) *Focus*, 19, 3, 46.

PLATINUM® is a registered trademark of Life Technologies, Inc.

Limited Label License No. 2:

A license under US Patents 4,683,202, 4,683,195, and 4,965,188 or their foreign counterparts, owned by Hoffmann-La Roche Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd. (Roche), has an up-front fee component and a running-royalty component. The purchase price of this product includes limited nontransferable rights under the running-royalty component to use only this amount of the product to practice the Polymerase Chain Reaction (PCR) and related processes described in said patents solely for the research and development activities of the purchaser when this product is used in conjunction with a thermal cycler whose use is covered by the up-front fee component. Rights to the up-front fee component must be obtained by the end user in order to have a complete license to use this product in the PCR process. These rights under the up-front fee component may be purchased from Perkin-Elmer or obtained by purchasing an Authorized Thermal Cycler. No right to perform or offer commercial services of any kind using PCR, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is hereby granted by implication or estoppel. Further information on purchasing licenses to practice the PCR Process may be obtained by contacting the Director of Licensing at The Perkin-Elmer Corporation, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404 or at Roche Molecular Systems, Inc., 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501.

Limited Label License No. 14:

Licensed to Life Technologies, a Division of Invitrogen Corporation, under U.S. Patent 5,338,671, 5,587,287, and foreign equivalents for use in research only.

This product is sold under licensing arrangements with F. Hoffman-La Roche Molecular Systems, Inc., and the Perkin Elmer Corporation.

Cat. No. 10966-034

3. ΜΙΓΜΑ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ.



100 mM dNTP Set, PCR Grade

Cat. No. 10297-018

Size: 4 x 250 µl; 25 µmol each
Store at -20°C.

Description:
100 mM dNTP (2'-deoxynucleoside 5'-triphosphate) Set consists of all four deoxynucleotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), each at a concentration of 100 mM. The deoxynucleotides are suitable for use in polymerase chain reaction (PCR), sequencing, fill-in, nick translation, cDNA synthesis, and TdT tailing reactions. The product is supplied as ready-to-use solutions for convenience and flexibility.

Components:

10216-018	100 mM dATP Solution
10217-016	100 mM dCTP Solution
10218-014	100 mM dGTP Solution
10219-012	100 mM dTTP Solution

Quality Control:
Performance is evaluated in cDNA synthesis reactions and functional amplification reactions.

Limited Label License No. 4:
This product is optimized for use in the Polymerase Chain Reaction (PCR) covered by patents owned by Hoffmann-La Roche, Inc. and F. Hoffmann-La Roche, Ltd. ("Roche"). No license under these patents to use the PCR process is conveyed expressly or by implication to the purchaser by the purchase of this product. A license to use the PCR process for certain research and development activities accompanies the purchase of certain reagents from licensed suppliers such as Invitrogen, when used in conjunction with an Authorized Thermal Cycler, or is available from The Perkin-Elmer Corporation. Further information on purchasing licenses to practice the PCR process may be obtained by contacting the Director of Licensing at The Perkin-Elmer Corporation, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404 or at Roche Molecular Systems, Inc., 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501.

Doc. Rev.: 07/02/01

This product is distributed for laboratory research only. CAUTION: Not for diagnostic use. The safety and efficacy of this product in diagnostic or other clinical uses has not been established.

For technical questions about this product, call the Invitrogen TECH LINE™ U.S.A. 800 955 6288

Form No. 18059J Printed on Recycled Paper

4. ENZYMO BsaJ I.

   R0536L 1,250 units Lot: 13 2,500 U/ml Store at -20°C Recognition Site: 5'...CCNNGG...3' 3'...GGNNCC...5' Source: <i>Bacillus stearothermophilus</i> J695 (Z. Chen) Supplied in: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 200 µg/ml BSA and 50% glycerol.	Reagents Supplied with Enzyme: 10X NEBuffer 2. Reaction Conditions: 1X NEBuffer 2. Incubate at 60°C. 1X NEBuffer 2: 50 mM NaCl 10 mM Tris-HCl 10 mM MgCl₂ 1 mM dithiothreitol pH 7.9 @ 25°C Unit Definition: One unit is defined as the amount of enzyme required to digest 1 µg of λ DNA in 1 hour at 60°C in a total reaction volume of 50 µl. Diluent Compatibility: Diluent Buffer A 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 200 µg/ml BSA and 50% glycerol (pH 7.4 @ 25°C)	Quality Control Assays Ligation: After 10-fold overdigestion with BsaJ I, > 95% of the DNA fragments can be ligated with T4 DNA Ligase (at a 5' termini concentration of 1–2 µM) at 16°C. Of these ligated fragments, > 95% can be recut. 16-Hour Incubation: A 50 µl reaction containing 1 µg of λ DNA and 50 units of enzyme incubated for 16 hours resulted in the same pattern of DNA bands as a reaction incubated for 1 hour with 1 unit of enzyme. Exonuclease Activity: Incubation of 10 units of enzyme with 1 µg sonicated [³H] DNA (10⁵ cpm/µg) for 4 hours at 60°C in 50 µl reaction buffer released < 0.1% radioactivity.	Enzyme Properties Activity in NEBuffers: <table border="0"> <tr> <td>NEBuffer 1</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td>NEBuffer 2</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td>NEBuffer 3</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td>NEBuffer 4</td> <td>100%</td> </tr> </table> When using a buffer other than the optimal (supplied) NEBuffer, it may be necessary to add more enzyme to achieve complete digestion. Survival in a Reaction: A minimum of 0.13 unit is required to digest 1 µg of substrate DNA in 16 hours. Heat Inactivation: 80°C for 20 minutes. Note: BsaJ I is an isoschizomer of Sec I. Incubation at 37°C results in 20% activity.	NEBuffer 1	100%	NEBuffer 2	100%	NEBuffer 3	100%	NEBuffer 4	100%
NEBuffer 1	100%										
NEBuffer 2	100%										
NEBuffer 3	100%										
NEBuffer 4	100%										

CERTIFICATE OF ANALYSIS

5. ΜΑΡΤΥΡΑΣ. (DNA LADDER)