

Άρθρο Ανασκόπησης

Γενετική και Στεφανιαία Νόσος: Παρόν και Μέλλον

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΜΠΑΜΠΑΛΗ¹, ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΜΟΥΖΑΡΟΥ², ΚΛΕΟΝΙΚΗ ΛΑΜΝΗΣΟΥ¹, ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΜΠΑΜΠΑΛΗΣ²

¹Τομέας Γενετικής Βιοτεχνολογίας Βιολογικού Τμήματος Παν/μίου Αθηνών, ²Καρδιολογικό Τμήμα Γ.Ν.Α. «ΚΑΤ»

Λέξεις ευρετηρίου:
Στεφανιαία νόσος,
γενετική, γονιδίωμα,
πολυμορφισμός,
γενετική μεταβλητή.

Ημερ. παραλαβής
εργασίας:
14 Ιουνίου 2013·
Ημερ. αποδοχής:
16 Σεπτεμβρίου 2013

Διεύθυνση
Επικοινωνίας:
Δημήτριος Μπάμπαλης

Νικολοπούλου 12,
145 78 Εκάλη
e-mail: babalisd@yahoo.gr

Την τελευταία δεκαετία βιώνουμε μια αξιοθαύμαστη ανάπτυξη στον τομέα της γενετικής. Αυτό οφείλεται στη μεγάλη τεχνολογική εξέλιξη στο εργαστήριο με την αποτύπωση και ανάλυση του γενετικού υποστρώματος του ανθρώπου και το συσχετισμό του με τις νόσους και την κατανόηση των μοριακών και γενετικών μηχανισμών, που επιτρέπουν μια πιο λεπτομερειακή αντίληψη του ρόλου της γενετικής και του περιβάλλοντος στον προσδιορισμό του κινδύνου στη νόσο. Είναι προφανές, ότι οι γενετιστές θα έστρεφαν την προσοχή τους κύρια στην ισχαιμική καρδιαγγειακή νόσο, αφού αυτή και οι υποκείμενες παθολογικές διαδικασίες της (αθηροσκλήρωση και θρόμβωση) αποτελούν την πρώτη αιτία νοσηρότητας και θνητότητας στον κόσμο. Η στεφανιαία νόσος είναι η κύρια αιτία θνητότητας τόσο στις χώρες με υψηλό εισόδημα, όσο και στις χώρες με χαμηλό εισόδημα, αλλά και παγκόσμια σύμφωνα με τα τελευταία στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας. Στην ανανεωμένη το 2011 αναφορά του το ποσοστό των θανάτων παγκόσμια από ισχαιμική καρδιοπάθεια ανέρχεται σε 12,8%.¹ Στις ΗΠΑ κατά πρόσφατη αναφορά της Αμερικανικής Καρδιολογικής Εταιρείας έχει καταγραφεί μια μείωση της καρδιαγγειακής θνητότητας κατά 32,7% τη δεκαετία 1999-2009. Όμως παρά τη μείωση αυτή οι θάνατοι

από καρδιαγγειακή νόσο το 2009 ανήλθαν στο 32,3% του συνόλου των θανάτων. Για τη στεφανιαία νόσο καθαυτή προκύπτει ένα στεφανιαίο συμβάν κάθε 34'' της ώρας και ένας θάνατος κάθε 1' της ώρας, ενώ αναλογικά αποδίδεται στη στεφανιαία νόσο ένας σε κάθε έξι θανάτους.²

Μαρτυρία γενετικής προδιάθεσης για στεφανιαία νόσο

Η γενετική προδιάθεση για στεφανιαία νόσο έχει τεκμηριωθεί από πολλά χρόνια μέσα από πολυάριθμες μελέτες, αφού ο φαινότυπος της στεφανιαίας νόσου συχνά εμφάνιζε ένα αξιοσημείωτο κληρονομίσιμο πρότυπο. Το οικογενειακό ιστορικό αποτελεί το πλέον άμεσο στοιχείο του ιατρικού ιστορικού για την εκτίμηση της γενετικής επιδεκτικότητας στη στεφανιαία νόσο. Από τη μελέτη Framingham έχει ανακοινωθεί, ότι το οικογενειακό ιστορικό στεφανιαίας νόσου ή εγκεφαλικού επεισοδίου συσχετίζεται με τη ΣΝ ανεξάρτητα από άλλους καρδιαγγειακούς κινδύνους εμφανίζοντας 2,4 φορές αυξημένο κίνδυνο στους άνδρες και 2,2 φορές στις γυναίκες.³ Άλλες μελέτες ανεβάζουν τον κίνδυνο για ΣΝ σε πρώτου βαθμού συγγενείς 2 έως 3 φορές περισσότερο.^{4,5} Η καταγραφή των διδύμων στη Δανική μελέτη έδειξε μεγαλύτερη συχνότητα ΣΝ και θανάτων στους μονοζυγώτες (44%)

σε σύγκριση με τους διζυγώτες διδύμους (14%).⁶ Επίσης σε μελέτη διδύμων αναδείχθηκε η ισχυρή γενετική βάση, που εμφανίζουν η ΣΝ και η κύρια επιπλοκή της το έμφραγμα μυοκαρδίου επιπρόσθετα από άλλους τροποποιούμενους παράγοντες κινδύνου.⁷ Αλλά και στην επί 36 χρόνια παρακολούθηση των 20.966 Σουηδών διδύμων εκτιμήθηκε η κληρονομικότητα των θανατηφόρων επεισοδίων με τον κίνδυνο να ανέρχεται σε 0,57 στους άνδρες και 0,38 στις γυναίκες.⁸ Στη μελέτη INTERHEART το οικογενειακό ιστορικό ΣΝ ανεβάζει τον κίνδυνο σε 1,55 μετά από προσαρμογή για την ηλικία, το φύλο, το κάπνισμα και τη γεωγραφική περιοχή, ενώ μετά από διόρθωση για εννέα γνωστούς παράγοντες μειώνεται ελάχιστα σε 1,45.⁹ Τέλος και στη μελέτη PROCAM το οικογενειακό ιστορικό εμφράγματος μυοκαρδίου αναδείχθηκε ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου. Μετά από προσαρμογή για την ηλικία, τη συστολική αρτηριακή πίεση, τη χοληστερόλη, το κάπνισμα, τα τριγλυκερίδια και την Lp(a) ο κίνδυνος ανερχόταν σε 1,67.¹⁰

Σύντομη ιστορική διαδρομή της γενετικής τεχνολογίας

Μελέτες γενετικού συσχετισμού με καρδιαγγειακή νόσο με τη χρήση δεικτών DNA έχουν πραγματοποιηθεί για περισσότερο από 30 χρόνια. Με την εξέλιξη της τεχνολογίας υπήρξε μια έκρηξη των μελετών, όπως αυτό καταγράφεται την τελευταία πενταετία. Το 1970 δεν ήταν δυνατόν να μελετηθεί το DNA απευθείας στον άνθρωπο παρά μόνο σε μεγάλες κυταρογενετικές ανωμαλίες, που ήταν ορατές μικροσκοπικά. Όμως πολλοί ορολογικοί δείκτες, που συχνά μελετούσαμε, όπως οι ομάδες αίματος ABO και οι κατηγορίες αντιγόνων των λευκοκυττάρων, που ελέγχονταν για σύνδεση με τη νόσο, αντικατόπτριζαν στην πραγματικότητα το επίπεδο γενετικών μεταβολών του DNA και αποτελούσαν κατά κάποιον τρόπο τους εκπροσώπους του.¹¹

Η μετάβαση από τους πρωτεϊνικούς εκπροσώπους στους πολυμορφισμούς του DNA σηματοδότησε την έναρξη μελέτης του γονιδιώματος. Το 1980 επιχειρείται η κατασκευή ενός γενετικού χάρτη σύνδεσης (ανάλυση Southern Blot) με τη χρήση πολυμορφισμών περιορισμένου μήκους τεμαχίου του DNA (Restriction Fragment Length Polymorphisms). Αυτό αποτυπωνόταν σε ακτινολογικό φιλμ και μετατρεπόταν σε γονιδιακό σκορ για τον έλεγχο σύνδεσης της νόσου.¹² Η μέθοδος αυτή βοήθησε να χαρτογραφηθεί η γενετική βάση για σπάνιες νόσους. Κατά τη δεκαετία 1980 γίνεται αντικατάσταση της ανά-

λυσης Southern Blot με την επαναστατική τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης του DNA (PCR), η οποία επέτρεπε μικρές στοχευμένες αλληλουχίες DNA να αντιγράφονται δισεκατομμύρια φορές σε ένα δοκιμαστικό σωληνάριο. Η άφιξη της PCR διευκόλυνε την ανάλυση των πολυμορφισμών και των μεταλλάξεων, μείωσε το χρόνο και το κόστος των γενετικών μελετών και παραμένει μια θεμελιώδης εργαστηριακή μέθοδος.¹³

Η τεχνολογική πρόοδος έφερε το 2000 τη μέθοδο της μικροδιάταξης του DNA, που επίσης αποκαλείται «SNP chip», η οποία επέτρεπε την ταυτόχρονη εξέταση εκατομμυρίων πολυμορφισμών δια μέσου του γονιδιώματος. Πολυεθνικές μελέτες, όπως το International Hap Map Project κατέγραψαν γονιδιακά πάνω από 2 εκατομμύρια πολυμορφισμούς σε πολυεθνικούς πληθυσμούς.¹⁴ Το 2005 παρουσιάστηκε η πρώτη μικροδιάταξη του DNA με τη χρήση των υπολογιστών (computerized) με συνεχιζόμενη εξέλιξη έκτοτε. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με πλατφόρμες υψηλής διείσδυσης πέτυχε την ανάλυση του DNA σε δείγματα εκατοντάδων χιλιάδων ασθενών και μη ατόμων.¹⁵

Γενετική στεφανιαίας νόσου

Τα τελευταία 20 χρόνια διάφοροι μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί αναπτυσσόμενες με τη βελτίωση της γονοτυπικής ανάλυσης, για να συνδέσουν την επίδραση ενός γενετικού πολυμορφισμού με ένα φαινοτυπικό αποτέλεσμα. Θεωρώντας τη γενετική βάση της στεφανιαίας νόσου είναι αναγκαία η διάκριση μεταξύ των σπάνιων μονογονικών αιτιών και του κοινού τύπου, αποκαλούμενου επίσης πολυγονικού, του οποίου η παθογένεση εμπερικλείει διάφορους παράγοντες. Η πολυγονική στεφανιαία νόσος παρουσιάζει μείζον ενδιαφέρον λόγω του σπουδαίου ρόλου, που παίζει στη δημόσια υγεία. Όμως πολλά στοιχεία κατανόησης του κοινού τύπου γενετικής παραλλαγής έχουν προέλθει από την έρευνα των μονογονικών νόσων, που χαρακτηρίζονται από χαμηλή συχνότητα εμφάνισης γενετικών μεταβολών και με σημαντικό φαινοτυπικό αποτέλεσμα. Στα τελευταία αυτά περιλαμβάνονται παραδείγματα, όπως υπερτροφική ή διατακτική μυοκαρδιοπάθεια, καναλοπάθειες (σύνδρομο Brugada και σύνδρομο QT), καθώς και οικογενείς δυσλιπιδαιμίες.¹⁶ Και πράγματι η έρευνα της μονογονικής στεφανιαίας νόσου προηγήθηκε αυτής της πολυγονικής κάποιες δεκαετίες.

Δύο κυρίως μέθοδοι αναπτύχθηκαν στο πέρασμα του χρόνου και αναφέρονται παρακάτω.

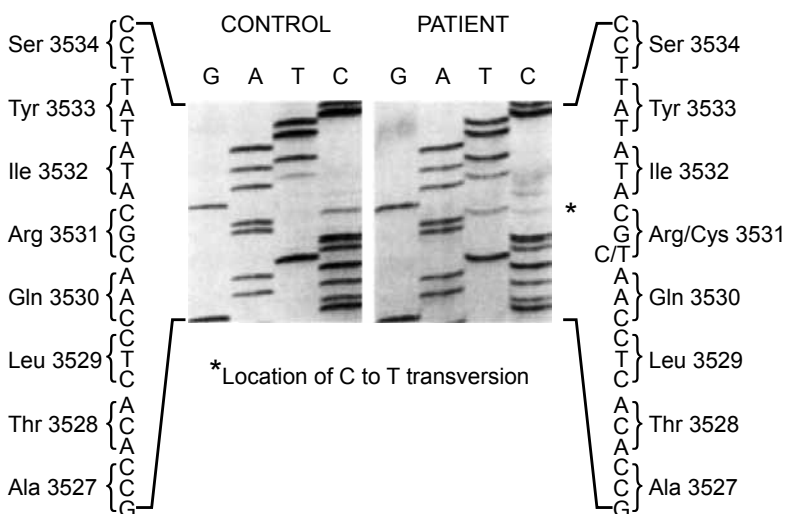
Μέθοδος υποψήφιου γονιδίου («candidate gene»)

Η μέθοδος του υποψήφιου γονιδίου ήταν η πρώτη και απλούστερη, που χρησιμοποιήθηκε. Στηρίχθηκε στην εκ προοιμίου παραδοχή της υπόθεσης ότι ένα γονίδιο εμπλέκεται στους μηχανισμούς και παίζει ένα ρόλο στον προσδιορισμό ενός ενδιάμεσου φαινότυπου, όπως σε μια μοριακή και κυτταρική λειτουργία δια μέσου πρωτεϊνών, ή σε ένα κλινικά προφανές αποτέλεσμα. Στο γονίδιο αυτό παρατηρούνται γενετικές μεταβολές, που επηρεάζουν τις παραπάνω λειτουργίες και τελικά δημιουργούν αυξημένο κίνδυνο στεφανιαίας νόσου. Οι πρώτες μελέτες εστιάστηκαν σε μονούς πολυμορφισμούς και σε μονά γονίδια για την έρευνα και τον προσδιορισμό των λειτουργικών αλλαγών στις πρωτεΐνες, που αναφέρονταν. Οι συχνότητες εμφάνισης ενός μικρού αριθμού επιλεγμένων γενετικών παραλλαγών συγκρίνονταν μεταξύ ομάδων ασθενών (cases) και υγιών (controls) (Εικόνα 1).⁴⁸

Η πρώτη μελέτη υποψήφιου γονιδίου στην καρδιαγγειακή νόσο δημοσιεύθηκε το 1992. Αυτή έδειξε ότι οι ομοζυγώτες, που έφεραν μια διαγραφή στην περιοχή του γονιδίου του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης και για τους οποίους γνωρίζαμε από πριν ότι συνοδεύονταν με υψηλότερα επίπεδα του κυκλοφορούντος ενζύμου, βρίσκονταν σε υψηλότερο κίνδυνο για έμφραγμα μυοκαρδίου. Η συσχέτιση αυτή ήταν περισσότερο προφανής σε άτομα χωρίς άλλους τεκμηριωμένους (μη γενετικούς) παράγοντες κινδύνου και συνηγορούσαν για τη σπουδαιότητα της μελέτης των γενετικών παραγόντων.¹⁷ Στη συνέχεια παρουσιάστηκαν μελέτες με γονοτυπική έρευνα σε περισσότερους από ένα πολυμορφισμούς στο ίδιο γονίδιο. Η πρώτη δημοσιευθείσα αφορούσε δύο πολυ-

μορφισμούς σε μακρινές περιοχές του γονιδίου, που κωδικοποιεί τον παράγοντα VII της πήξης. Τα αποτελέσματα έδειξαν, ότι οι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί σε άτομα, που τους φέρουν, αυξάνουν τον κίνδυνο εμφράγματος μυοκαρδίου πιθανόν δια μέσου της θρομβωτικής δραστηριότητας των αυξημένων επιπέδων του παράγοντα VII και των αντιγόνων του, που καταγράφονται.¹⁸ Στην περίπτωση αυτή, όπως και στην προηγούμενη, υπάρχουν ενδιάμεσοι παράμετροι, που ενεργούν σαν σύνδεσμος μεταξύ του γονότυπου και της νόσου. Ένα σπουδαίο και φωτεινό παράδειγμα μονογονικής νόσου, που προδιαθέτει σε πρώιμη στεφανιαία νόσο, είναι η οικογενής υπερχοληστερολαιμία. Χαρακτηρίζεται από πολύ υψηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα της χοληστερόλης LDL και πρώιμη εμφάνιση εμφράγματος μυοκαρδίου. Προκαλείται από μεταλλάξεις στα γονίδια, που κωδικοποιούν τους μηχανισμούς λειτουργιών των πρωτεϊνών των ρυθμιστικών των επιπέδων της LDL στο πλάσμα.¹⁹ Άτομα με οικογενή υπερχοληστερολαιμία εμφανίζουν 8 φορές αυξημένη θνητότητα σε σχέση με το γενικό πληθυσμό στις ηλικίες 20-59 ετών.²⁰ Αυτό οφείλεται κύρια στη στεφανιαία νόσο και ο κίνδυνος μπορεί να μειωθεί στα επίπεδα του γενικού πληθυσμού με εντατική θεραπεία στατινών από νωρίς.²¹ Οι συγγενείς των ασθενών αυτών πρέπει να ελέγχονται και αν βρεθούν φορείς πρέπει να έπονται συστάσεις για αλλαγή του τρόπου ζωής και πρώιμη έναρξη θεραπείας με στατίνες.

Διάφοροι περιορισμοί παρουσιάστηκαν κατά την εφαρμογή της μεθόδου του υποψήφιου γονιδίου. Ένας από αυτούς ήταν ο έλεγχος ενός ή λίγων πολυμορφισμών σε ένα δεδομένο γονίδιο, ενώ πιθανώς πολλοί άλλοι εδραζόμενοι ακόμη και χιλιάδες ζεύ-



Εικόνα 1. Αλληλουχία του DNA που δείχνει την αλλαγή ενός μονονουκλεοτιδίου που οδηγεί στην αντικατάσταση της Cys από την Arg. Ο απερίσκπος υποδεικνύει το T που αντικαθιστά C στο σημείο 3531. Μονοκλωνικό DNA το οποίο παρασκευάστηκε με PCR. (United States Biochemical Corp., Cleveland) 48

γη βάσης μακράν του γονιδίου μπορούσαν να επιδρουν στο παρατηρούμενο αποτέλεσμα. Ως εκ τούτου, δεδομένης της τεράστιας μεταβλητότητας του ανθρώπινου γονιδιώματος, γενετικές μεταβλητές με ισχυρή δράση στη διαμόρφωση της δομής και λειτουργίας των πρωτεϊνών μπορούν να διαφύγουν τον έλεγχο της σύνδεσης με τη νόσο. Επί πλέον τα μικρά δείγματα ατόμων, που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες αυτές και η ετερογένειά τους εμφάνισαν έναν αριθμό ψευδώς θετικών ευρημάτων και οδήγησαν σε μειωμένη στατιστική ισχύ και αμφίβολες δημοσιεύσεις. Από το 1980 χιλιάδες μελέτες δημοσιεύθηκαν με τη μέθοδο του υποψήφιου γονιδίου χωρίς σταθερή συνέπεια ευρημάτων.²² Πολλοί από αυτούς τους πρώτους συσχετισμούς δεν αναπαράχθηκαν και δεν επιβεβαιώθηκαν από άλλους ερευνητές. Όμως γενετικές παραλλαγές σε ένα περιορισμένο μόνο αριθμό γονιδίων με δράση κυρίως στην LDL χοληστερόλη αναπαράχθηκαν και έδειξαν αξιόπιστα να σχετίζονται με τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου.²³ Πάντως από τη θέση της γενικής ανασκόπησης θεωρώντας το αποτέλεσμα δεν ήταν έκπληξη η περιορισμένη επιτυχία της μεθόδου του υποψήφιου γονιδίου, η οποία όμως έδωσε το έναυσμα για την περαιτέρω διερεύνηση του DNA.

Μέθοδος μελέτης σύνδεσης ευρέως γονιδιώματος (Genome-Wide Association Study) ή GWAS

Μια μελέτη σύνδεσης του ευρέως γονιδιώματος είναι μια εξέταση ανίχνευσης γενετικών παραλλαγών δια μέσου ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος, που ερευνά να προσδιορίσει γενετικές συσχετίσεις με παρατηρούμενα χαρακτηριστικά ή νόσους. Η μέθοδος αυτή δεν προϋποθέτει τον έλεγχο κάποιου προεπιλεγμένου γονιδίου, αλλά έχει ελεύθερη διερεύνηση πολύ μεγάλου αριθμού πολυμορφισμών για την πιθανότητα σύνδεσης κάποιων εξ αυτών με διάφορους φαινότυπους. Επιτυγχάνεται γονοτυπική καταγραφή σε εκατοντάδες χιλιάδες άτομα με ταχεία και αποτελεσματική διαδικασία. Τα τελευταία χρόνια έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί στη μελέτη παραλλαγών ή γονιδίων πολλών σύνθετων νόσων συμπεριλαμβανομένης και της στεφανιαίας νόσου.

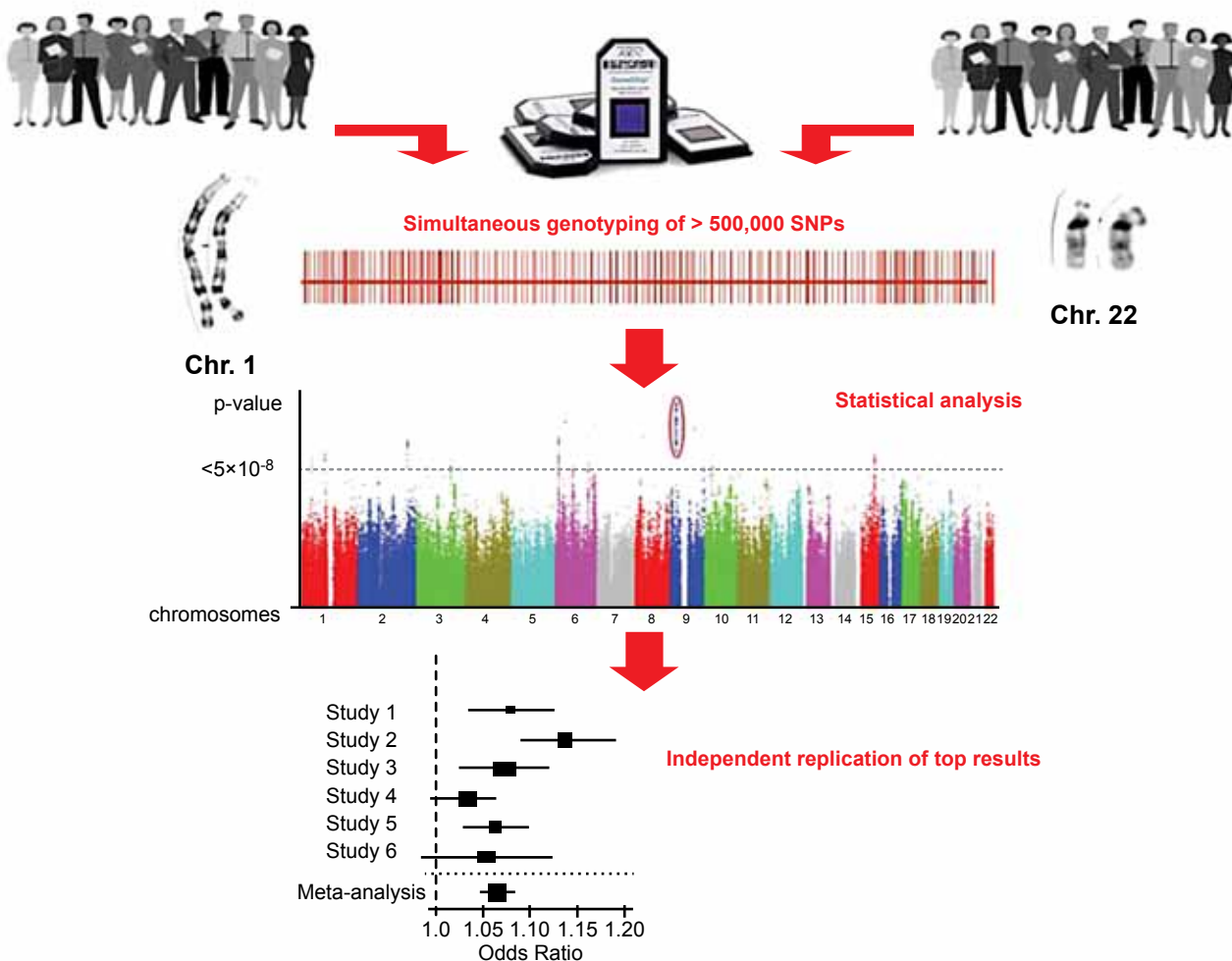
Η GWAS υιοθετεί κλασικές μεθόδους σχεδιασμού. Συγκρίνονται άτομα με νόσο σε σχέση με άτομα-ελέγχου χωρίς νόσο (case-control studies). Υπολογίζεται η συχνότητα ή η ένταση εμφάνισης ενός γενετικού πολυμορφισμού (δυαλληλόμορφο γονίδιο) στα άτομα με νόσο και σαυτά του ελέγχου. Η στατιστικά υψηλότερη εμφάνισή του στα άτομα με νόσο το

χαρακτηρίζει σαν αλληλόμορφο γονίδιο κινδύνου. Ο κίνδυνος αυτός εκτιμάται με τον υπολογισμό του πιθανού λόγου (odd ratio) (Εικόνα 2).³⁵ Στο δεύτερο τύπο σχεδιασμού της GWAS περιλαμβάνεται η ποσοτική συσχέτιση ενός χαρακτηριστικού, όπως χοληστερόλη ή αρτηριακή πίεση, που μετράται συνεχώς μέσα σε ένα δείγμα του γενικού πληθυσμού. Τα άτομα του δείγματος διαστρωματώνονται σε γενετικές κατηγορίες ως προς το αλληλόμορφο γονίδιο (ομοζυγώτες ή ετεροζυγώτες). Η μέση τιμή του ποσοτικού χαρακτηριστικού συγκρίνεται στατιστικά (γραμμικά ή με συντελεστή συσχέτισης β) σε κάθε γενετικά καθορισμένη ομάδα. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός είναι η ανεξάρτητη μεταβλητή και το χαρακτηριστικό η εξαρτημένη. Η συσχέτιση του γονοτυπικού πολυμορφισμού και της μέτρησης του ποσοτικού χαρακτηριστικού παρέχει μια εκτίμηση του μεγέθους του αποτελέσματος.¹¹ Όταν προσδιορίζεται η σύνδεση ενός πολυμορφισμού με μια νόσο ή ένα χαρακτηριστικό νόσου, τότε μελετάται η θέση της μεταβλητής αυτής μέσα στο γονιδίωμα καθώς και το γειτνιαζόν γονιδιακό τοπίο, το οποίο αναφέρεται ως τόπος (locus).

Οι πρώτες μελέτες GWAS στη στεφανιαία νόσο δημοσιεύθηκαν ανεξάρτητα και ταυτόχρονα το 2007. Όλες αυτές οι μελέτες προσδιόρισαν λίγους πολυμορφισμούς συνδεδεμένους με στεφανιαία νόσο, που όλοι τοποθετούνται στην περιοχή 9p21.3 του γονιδιώματος.²⁴⁻²⁶ Σε σύντομο χρονικό διάστημα αρκετές ομάδες παγκοσμίως επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα στην περιοχή 9p21, ενώ επί πλέον χαρτογραφήθηκαν 11 νέες γενετικές παραλλαγές με αυξημένο κίνδυνο για στεφανιαία νόσο. Από τις μελέτες έγινε προφανές, ότι κάθε μια από το πλείστο των γενετικών αυτών μεταβλητών μπορούσε να επιφέρει ένα μέτριο έως ελάχιστο αποτέλεσμα κινδύνου. Εξάλλου το μέγεθος του δείγματος για την αξιόπιστη ανίχνευση των περισσότερων εξ αυτών των μεταβλητών θεωρήθηκε από τους στατιστικολόγους, ότι έπρεπε να είναι μεγαλύτερο του αρχικά σχεδιασθέντος.²⁷ Σε απάντηση αυτής της παρατήρησης ερευνητές, που προηγουμένως είχαν καταγράψει επιτυχή αποτελέσματα, συνένωσαν τις πηγές και τα δεδομένα τους σε διεθνείς σχηματισμούς. Η σύμπραξη αυτή αποτέλεσε τη μεγαλύτερη συνεργασία στην καρδιολογία, αφού το CARDIOGRAM²⁸ αφορούσε δείγμα 86995 ατόμων (22233 cases και 64762 controls) και δείγμα αναπαραγωγής 56682 άτομα, ενώ το IBC50K CAD Consortium²⁹ περιελάμβανε 57.594 άτομα (15596 cases και 34992 controls) και αναπαραγωγή σε δείγμα 57.594 ατόμων. Κατά αυτόν τον τρόπο ανιχνεύθηκαν νέες γε-

Large patient sample

Large control sample



Εικόνα 2. Αρχή εφαρμογής GWAS.³⁵ Συγκρίνονται μια μεγάλη ομάδα ασθενών (large patient sample) και μια μεγάλη ομάδα υγιών (large control sample) με ταυτόχρονη γονοτυπική καταγραφή >500.000 πολυμορφισμών (SNPs) δια μέσου ολόκληρου του γονιδιώματος (άνω μέρος εικόνας). Η στατιστικά υψηλότερη εμφάνιση ενός γενετικού πολυμορφισμού στα άτομα με νόσο τον χαρακτηρίζει ως πολυμορφισμό κινδύνου (μέσον εικόνας). Αυτός ο πολυμορφισμός μελετάται ανεξάρτητα (independent replication of top results) σε άλλα μεγάλα δείγματα απόμων και ο κίνδυνος εκτιμάται με τον υπολογισμό του πιθανού λόγου (odd ratio, κάτω μέρος εικόνας).

νετικές μεταβλητές κινδύνου και επιβεβαιώθηκαν άλλες προηγούμενες και σε μικρό χρονικό διάστημα 5 ετών προσδιορίστηκαν συνολικά 36 γενετικές μεταβλητές κινδύνου σχετιζόμενες με αυξημένο κίνδυνο στεφανιαίας νόσου. Από αυτές επτά διοχετεύουν τον κίνδυνο τους δια μέσου των λιποπρωτεϊνών, δύο δια μέσου της αρτηριακής υπέρτασης και μια στο έμφραγμα μυοκαρδίου, ενώ 23 γενετικοί τόποι ενεργούν ανεξάρτητα από γνωστούς παράγοντες κινδύνου.³⁰ Οι μεταβλητές αυτές είναι περισσότερο κοινές από όσο αναμενόταν, αφού πάνω από τις μισές εμφανίζονται σε >50% του πληθυσμού και δέκα από αυτές εμφανίζονται σε >75% του πληθυσμού. Το πλείστο των γενετικών μεταβλητών εκδηλώνουν ελά-

χιστο κίνδυνο, που κυμαίνεται από 6% έως 17%, ενώ >66% εξ αυτών εμφανίζουν τον κίνδυνο τους ανεξάρτητα από άλλους γνωστούς παράγοντες κινδύνου π.χ. χοληστερόλη. Το γεγονός, ότι 23 από τις 36 μεταβλητές κινδύνου για στεφανιαία νόσο δεν ενεργούν δια μέσου κάποιου από τους γνωστούς παράγοντες κινδύνου, παραπέμπει σε μηχανισμούς άγνωστους, που πρέπει να διαφωτιστούν.³⁰ Σε μια άλλη ανασκόπηση για 35 κοινές μεταβλητές, που επηρεάζουν τη στεφανιαία νόσο, ο κίνδυνος για τη νόσο δεν υπερβαίνει το 13% της συνολικής κληρονομικότητας της στεφανιαίας νόσου.³¹ Όλα αυτά συνηγορούν, ότι έχουμε πολλά ακόμα να ανακαλύψουμε. Όμως προληπτική αντιμετώπιση της στεφανιαίας νόσου είναι

απίθανο να επιτευχθεί, χωρίς πλήρη διαλεύκανση, συνυπολογισμό και πρόληψη των γενετικών προδιαθεσικών παραγόντων. Το πλεονέκτημα των μεταβλητών κινδύνου του DNA έναντι των βιοδεικτών αίματος είναι ότι δεν μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου, ούτε με την ηλικία, τα γεύματα, τα φάρμακα ή τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Κατά συνέπεια ο γονότυπος του DNA κατά τη γέννηση είναι σταθερός και μπορεί να χρησιμοποιείται για όλη τη διάρκεια της ζωής.

Σε όλες τις μελέτες GWAS για στεφανιαία νόσο γινόταν χρήση εναλλακτικά του φαινότυπου είτε βλάβης $\geq 50\%$ σε ένα ή περισσότερα στεφανιαία αγγεία προσδιορισμένα από τη στεφανιογραφία, είτε αποδεδειγμένου εμφράγματος του μυοκαρδίου. Όμως μερικά γονίδια προδιαθέτουν ειδικά στη διαδικασία της αθηροσκλήρωσης και άλλα στο έμφραγμα μυοκαρδίου. Από τις γενετικές μεταβλητές ο 9p21, που έχει διερευνηθεί περισσότερο, ενεργεί στο αγγειακό τοίχωμα και συμβάλλει στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης χωρίς να εμπλέκεται στην επιτάχυνση και επέλευση του εμφράγματος μυοκαρδίου.³²⁻³⁴ Από 11 πολυμορφισμούς, που σχετίζονται με το έμφραγμα μυοκαρδίου, 2 μόνο ενεργούν σε γνωστούς παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου και αφορούν τη χοληστερόλη LDL και τη λιποπρωτεΐνη Lp(a).³⁵ Όμως μια μεταβλητή κινδύνου αποδείχθηκε σε μια τελευταία μελέτη, ότι συνδέεται με το έμφραγμα μυοκαρδίου και αφορά τη θέση στο DNA της ομάδας αίματος ABO. Μελέτες GWAS βρίσκουν σταθερά, ότι τα γονίδια των ομάδων A και B σχετίζονται με το έμφραγμα του μυοκαρδίου χωρίς σύνδεση με τη στεφανιαία αθηροσκλήρωση.³⁶ Αυτό θέτει ένα προβληματισμό στο μέλλον κατά πόσον τα άτομα με ομάδες αίματος A, B, ή AB πρέπει να λαμβάνουν προφυλακτικά αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία, ιδιαίτερα όταν έχει διαπιστωθεί στεφανιαία νόσος ή μετά από καρδιοχειρουργική επέμβαση. Ασφαλώς απαιτούνται κλινικές μελέτες, για να εκτιμήσουν το μέγεθος του προβλήματος και τη δυνατότητα αναστροφής του αποτελέσματος με τη θεραπεία αυτή.

Κλινική αξιολόγηση και χρησιμότητα

Η κλινική αξιολόγηση και χρησιμότητα των ευρημάτων από τις μελέτες γενετικής στη στεφανιαία νόσο είναι ακόμη δύσκολη και υπολείπεται αρκετά του επιθυμητού αποτελέσματος. Ο κύριος λόγος είναι η αντίφαση, που υπάρχει ανάμεσα στην υψηλή σημαντικότητα και τη συσχέτισή τους με τη στεφανιαία νόσο των γενετικών μεταβλητών στις μετα-

ναλύσεις μεγάλων δειγμάτων ατόμων και στο πολύ μικρό πραγματικό αποτέλεσμα κινδύνου της κάθε μιας, όπως αυτό μετράται με το λόγο πιθανότητας (odd ratio). Κλασικό παράδειγμα ο πλέον μελετημένος γενετικός τόπος 9q21.3, ο οποίος είναι στατιστικά σημαντικός σε μεγάλους πληθυσμούς και εμφανίζει ένα σχεδόν ασήμαντο αποτέλεσμα κινδύνου για τον ασθενή ατομικά (ομοζυγώτης του αλληλόμορφου γονιδίου 9q21.3 εμφανίζει περίπου 1,5 κίνδυνο στεφανιαίας νόσου). Εκτός αυτού οι υπολογισμοί, που περικλείουν το γονότυπο 9q21.3, δεν μεταβάλλουν το βαθμό κινδύνου των κλασικών αλγόριθμων.³⁷ Όμως με τη χρήση του γενετικού τύπου κινδύνου 9q21.3 η ικανότητα πρόβλεψης της θνητότητας βρέθηκε σημαντικά βελτιωμένη σε ασθενείς μετά από χειρουργική επέμβαση αορτοστεφανιαίας παράκαμψης.³⁸ Αντίθετα από άλλες μελέτες διαπιστώθηκε, ότι ο συνδυασμός πολλαπλών γονοτύπων σε ένα άτομο γενετικού σκορ κινδύνου απέτυχε να προσθέσει περισσότερα στους παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου.³⁹⁻⁴¹ Αλλά και οι μετααναλύσεις για την αποτελεσματικότητα του σχετιζόμενου με την καρδιαγγειακή νόσο γενετικού σκορ κινδύνου εμφάνισαν αμφιλεγόμενα ευρήματα.^{42,43}

Η έννοια του γενετικού σκορ κινδύνου στοχεύει να προσδιορίσει στα άτομα τον πρόσθετο κίνδυνο, που δεν έχει αποκαλυφθεί με τους αλγόριθμους των παραδοσιακών παραγόντων κινδύνου. Στην παρούσα φάση θεωρείται από όλους τους ερευνητές δεδομένο, ότι στον υπολογισμό της κληρονομικότητας συμμετέχουν πολλαπλοί παράγοντες, που δεν έχουν ακόμη ανακαλυφθεί, ενώ και ο μηχανισμός των περισσότερων από τους ήδη γνωστούς παραμένει ακόμη ανεξιχνίαστος. Η απάντηση σ αυτό το θέμα θα απαιτήσει περαιτέρω εφαρμογή μεγάλης κλίμακας γονιδιωματικών μελετών και μετααναλύσεων, καθώς και στοχευμένων πολυμορφισμών με υψηλής πιστότητας χαρτογράφηση σε ειδικούς γενετικούς τόπους και συνεχίζει να αποτελεί μια πρόκληση για όλους τους ερευνητές-γενετιστές.

Μελλοντικές προοπτικές

Οι μελέτες GWAS παρουσίασαν αξιοσημείωτο ενδιαφέρον προσδιορίζοντας νέους γενετικούς τόπους για τη στεφανιαία νόσο και το έμφραγμα μυοκαρδίου, ενώ τα υπόλοιπα γονίδια παρείχαν νέες πτυχές στη γενετική αρχιτεκτονική των νόσων αυτών. Όμως οι αρχικές προσδοκίες των μελετών αυτών για ανάδειξη ισχυρών δεικτών και την άμεση βελτίωση στον προσδιορισμό του κινδύνου των

ασθενών για στεφανιαία νόσο έχουν επί του παρόντος αναχαιτισθεί. Από τα μέχρι στιγμής ευρήματα οι περιορισμοί βασίζονται στο μικρό ποσοστό κινδύνου για τη νόσο, στους άγνωστους μηχανισμούς δράσης των περισσοτέρων μεταβλητών, στις ενδεχόμενες αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, καθώς και στην ανακάλυψη νέων και αφήνουν σαφώς να εννοηθεί, ότι δεν έχουν συμπληρωθεί όλα τα στοιχεία του γρίφου της κληρονομικότητας. Μετά από 5 χρόνια και πλέον κυτταρικά και μοριακά πειράματα υψηλού προφίλ ο μηχανισμός, που ο γενετικός τόπος 9q21.3 αυξάνει τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου, παραμένει ακαθόριστος.^{44,45} Απάντηση σε πολλά από αυτά και σημαντικές πληροφορίες αναμένονται από τη χρησιμοποίηση επόμενης γενιάς τεχνικών αλληλούχισης του DNA (next-generation sequencing).^{46,47} Σε αυτές τις πλατφόρμες αλληλούχισης του γονιδιώματος, ολόκληρο το γονιδίωμα ή επιλεγμένες περιοχές αυτού τεμαχίζονται σε μικρά τμήματα και παρέχουν έτσι τη δυνατότητα πολλών διαφορετικών αναγνώσεων. Η νέα αυτή στρατηγική καθιστά αναγκαία την ανάπτυξη νέων εργαλείων βιοπληροφορικής, για να μπορεί να αναλυθεί ο μεγάλος όγκος δεδομένων, που προκύπτει από την τεχνική αυτή. Στις μέρες μας έχουν δημιουργηθεί πολλά προγράμματα βιοπληροφορικής για διαφορετικές πλατφόρμες αλληλούχισης.

Γενικά η εκτίμηση της γενετικής στη στεφανιαία νόσο αποτελεί επί του παρόντος δύσκολη εξίσωση, αλλά πολλά υποσχόμενη. Η συνεχώς προσιθέμενη αξία δια μέσου των ερευνών και της εξέλιξης θα επιτρέψει το γενετικό έλεγχο ρουτίνας στην πορεία του χρόνου με απώτερο στόχο την προσπάθεια μείωσης του κινδύνου της στεφανιαίας νόσου με φαρμακευτικές ή άλλες προσεγγίσεις.

Πίνακας 1. Εννοιολογικό γλωσσάρι όρων που αναφέρονται στο κείμενο.

Γονίδιο (Gene): τμήμα του DNA. Σε αυτό υπάγονται τα παρακάτω:
Πολυμορφισμός (μονονουκλεοτιδικός) (SNP, single-nucleotide polymorphism): η πιο απλή μορφή παραλλαγής της αλληλουχίας του DNA.
Γενετική Μεταβλητή (Genetic Variant): παραλλαγή αλληλουχίας του DNA.
Αλληλόμορφο γονίδιο (Allele): εναλλακτική μορφή γονιδίου (σε ζευγάρια).
Τόπος ή θέση (Locus): ειδική θέση του γονιδίου ή μιας αλληλουχίας DNA στο χρωμόσωμα.
Μετάλλαξη (Mutation): μια μεταβολή (πολύ σπάνια) στην αλληλουχία του DNA.

Βιβλιογραφία

1. Lopez A, Mathers C, Ezzati M, et al. Global Burden of Disease and Risk Factors. World Health Organisation, 2008.
2. Roger v, Go A, Lloyd-Jones D, et al. Heart disease and stroke statistics-2013 update; a report from the American Heart Association. Circulation 2013.
3. Schildkraut J, Myerw R, Cupples L, et al. Coronary risk associated with age and sex of parental heart disease in the Framingham study. Am J Cardiol. 1989; 64: 555.
4. Hopkins P, Williams R, Kuida H, et al. Family history as an independent risk factor for incident coronary artery disease in a high-risk cohort in Utah. Am J Cardiol. 1988; 62: 703.
5. Colditz G, Rimm E, Giovannucci E, et al. A prospective study of parental history of myocardial infarction and coronary artery disease in men. Am J Cardiol 1991, 67: 933.
6. Allen G, Harvald B, Shields J. Measures of twin concordance. Acta Genet Stat Med 1967, 17: 475.
7. Marenberg M, Rsch N, Berkman L, et al. Genetic susceptibility to death from coronary artery disease in a study of twins. N Eng J Med. 1994; 330: 1041.
8. Zdravkovic S, Wienke A, Pedersen N, et al. Heritability of death from coronary artery disease: a 36-year follow-up of 20966 Swedish twins. J Intern Med. 2002; 252: 247.
9. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, et al. INTERHEART Study Investigators. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART Study): case-control study. Lancet. 2004; 364: 967.
10. Cooper J, Miller G, Humphries S. A comparison of the PROCAM and Framingham point-scoring systems for estimation of individual risk of coronary artery disease in the Second Northwick Park Heart Study. Atherosclerosis. 2005, 181: 93.
11. Dubi J, Hegele R. Genetics 100 for cardiologists: Basics of Genome-Wide Association Studies. Can J Cardiol. 2013; 29: 10.
12. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet. 1980, 32: 314.
13. Mullis K, Faloona F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 1987; 155: 335.
14. International Hap Map Consortium. The International Hap Map Project. Nature. 2003, 426: 789.
15. Roberts R, Stewart AF, Wells GA, et al. Identifying genes for coronary artery disease: an idea whose time has come. Can J Cardiol 2007, 23 (suppl A): 7A.
16. Danani SB, Topol EJ. Future use of genomics in coronary artery disease. J Am Coll Cardiol. 2007, 50: 1933.
17. Camien F, Poirier O, Lecerc L, et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. Nature. 1992; 359: 641.
18. Iacoviello L, DiCastelnuovo A, DeKnijff P, et al. Polymorphisms in the coagulation factor VII and the risk of myocardial infarction. N Engl J Med. 1998; 338: 79.
19. Swerdlow D, Holmes M, Harrison S, Humphries S. The genetics of coronary heart disease. Br ed Bull. 2012; 102: 59.
20. Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group. Mortality in treated heterozygous familial hypercholesterolaemia: implications for clinical management. Atherosclerosis. 1999; 142: 105.
21. Neil A, Cooper J, Betteridge J, et al. Reductions in all-cause, cancer and coronary mortality in statin-treated patients with

- heterozygous familial hypercholesterolaemia: a prospective registry study. *Eur Heart J*. 2008; 29: 2625.
22. Hegele RA. SNP judgements and freedom of association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002, 22: 1058.
 23. Mayer B, Erdmann J, Schunkert H. Genetics and heritability of coronary artery disease and myocardial infarction. *Clin Res Cardiol*. 2007, 96: 1.
 24. McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, et al. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science*. 2007, 316: 1488.
 25. Helgadottir A, Thorleifsson G, Manolescu A, et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science*. 2007, 316: 1491.
 26. Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, et al. WTCCC and the Cardiogenics Consortium. Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2007, 357: 443.
 27. Roberts R, Stewart A. Genes and Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol*. 2012, 60: 1715.
 28. CARDIoGRAM Consortium. Design of the Coronary Artery Disease Genome-Wide Replication and Meta-Analysis (CARDIoGRAM) Study: a genome-wide association meta-analysis involving more than 22000 cases and 60000 controls. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010, 3: 475.
 29. The IBC 50K CAD Consortium. Large-scale gene-centric analysis identifies novel variants for coronary artery disease. *PLoS Genet*. 2011, 7:e1002260.
 30. Roberts R, Stewart A. Genetics of Coronary Artery Disease in the 21st Century. *Clin Cardiol*. 2012, 35: 536.
 31. Peden J, Farrall M. Thirty-five common variants for coronary artery disease: the fruits of much collaborative labour. *Hum Mol Genet*. 2011; 20: R198
 32. Dandona S, Stewart AF, Chen I, et al. Gene dosage of the common variant 9p21 predicts severity of coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 56: 479.
 33. Patel RS, Su S, Neeland IJ, et al. The chromosome 9p21 risk locus is associated with angiographic severity and progression of coronary artery disease. *Eur Heart J*. 2010; 31: 3017.
 34. Ardissino D, Berzuini C, Merlini PA, et al. Influence of 9p21.3 genetic variants on clinical and angiographic outcomes in early-onset myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2011; 58: 426.
 35. Schunkert H, Erdmann J, Samani N. Genetics of myocardial infarction: a progress report. *Eur Heart J*. 2010; 31: 918.
 36. Reilly MP, Li M, He J, et al. Identification of ADAMST7 as a novel locus for coronary atherosclerosis and association of ABO with myocardial infarction in the presence of coronary atherosclerosis: two genome-wide association studies. *Lancet*. 2011, 377: 383.
 37. Paynter NP, Chasman DI, Buring JE, et al. Cardiovascular disease risk prediction with and without Knowledge of genetic variation at chromosome 9p21.3. *Ann Intern Med*. 2009, 150: 65.
 38. Muehlschlegel JD, Liu KY, Perry TE, et al. Chromosome 9p21 variant predicts mortality after coronary artery bypass graft surgery. *Circulation*. 2010; 122: S60.
 39. Paynter NP, Chasman DI, Pare G, et al. Association between a literature-based genetic risk score and cardiovascular events in women. *JAMA*. 2010, 303: 631.
 40. Ripatti S, Tikkanen E, Orho-Mclander M, et al. A multilocus genetic risk score for coronary heart disease: case-control and prospective cohort analyses. *Lancet*. 2010; 376: 1393.
 41. Thanassoulis G, Peloso GM, Pencina MJ, et al. A genetic risk score is associated with incident cardiovascular disease and coronary artery calcium: the Framingham Heart Study. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012; 5: 113.
 42. Brautbar A, Pompeii LA, Dehghan A, et al. A genetic risk score based on direct associations with coronary heart disease improves coronary heart disease risk prediction in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC), but not in the Rotterdam and Framingham Offspring, Studies. *Atherosclerosis*. 2012; 223: 421.
 43. Lluís-Ganella C, Subirana I, Lucas G, et al. Assessment of the value of a genetic risk score in improving the estimation of coronary risk. *Atherosclerosis*. 2012; 222: 456.
 44. Visel A, Zhu Y, May D, et al. Targeted deletion of the 9 p21 non-coding coronary artery disease risk interval in mice. *Nature*. 2010; 464: 409.
 45. Harismendy O, Notani D, Song X, et al. 9p21 DNA variants associated with coronary artery disease impair interferon-gamma signaling response. *Nature*. 2011, 470: 264.
 46. Maouche S, Schunkert H. Strategies beyond genome-wide association studies for atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012, 32: 170.
 47. Fajta F, Vecoli C, Foffa I, Andreassi MG. Next generation sequencing in cardiovascular diseases. *World J Cardiol* 2012, 4: 288.
 48. Pullinger C R, Hennessy L K, Chatterton JE, et al. Familial Ligand-Defective Apolipoprotein B. Identification of a New Mutation That Decreases LDL Receptor Binding Affinity. *J Clin Invest*. 1995; 95: 1225-1234.