

Αυξημένη έκφραση του ιστικού αναστολέα των μεταλλοπρωτεασών TIMP-2 σε ασθενείς με νευροϊνωμάτωση τύπου 1

Σπύρος Π. Μπάτζιος,^{1,2} Ελένη Παπακωνσταντίνου,² Ευθυμία Βαργιάμη,¹
Γεώργιος Καρακιουλάκης,² Δημήτριος Ι. Ζαφειρίου.¹

¹: Α' Παιδιατρική Κλινική Α.Π.Θ., Ιπποκράτειο Γενικό Νοσοκομείο, Θεσσαλονίκη

²: Εργαστήριο Φαρμακολογίας Α.Π.Θ., Ιατρική Σχολή, Θεσσαλονίκη

Increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 in patients with neurofibromatosis type 1

Batzios S,^{1,2} Papakonstantinou E,² Vargiami E,¹ Karakioulakis G,² Zafeiriou D.¹

¹: 1st Paediatric Department, Aristotle University of Thessaloniki, Hippokration General Hospital, Thessaloniki, Greece

²: Department of Pharmacology, Medical School, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

Paediatr N Gr 2013, 25: 98 - 105

Περίληψη: Η Νευροϊνωμάτωση τύπου 1 (NF1) αποτελεί μία γενετική πολυσυστηματική διαταραχή με ποικίλη προσβολή διαφόρων ιστών και οργάνων. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της έκφρασης των μεταλλοπρωτεασών του συνδετικού ιστού (MMPs) και των ιστικών αναστολέων τους (TIMP-1, TIMP-2), σε ασθενείς με NF1. Ασθενείς και Μέθοδοι: Μελετήθηκαν 34 ασθενείς (μέση ηλικία±SD: 7.99±5.01 έτη). Τα επίπεδα των MMPs και TIMPs ελέγχθηκαν για πιθανή διαφορική έκφραση μετά από κατηγοριοποίηση των ασθενών με βάση την ύπαρξη των διαγνωστικών κριτηρίων αλλά και τα αποτελέσματα του παρακλινικού ελέγχου. Αποτελέσματα: Συνολικά, φάνηκε πως υπάρχει αυξημένη συγκέντρωση του TIMP-2 χωρίς στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα των MMP-1, MMP-3, MMP-9 και TIMP-1. Παράλληλα, βρέθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της MMP-3 στους ασθενείς που είχαν οζίδια του Lisch σε σχέση με αυτούς χωρίς παθολογικά ευρήματα κατά τον οφθαλμολογικό έλεγχο. Επιπρόσθετα, βρέθηκε σημαντική ελάττωση της συγκέντρωσης του TIMP-2 στους ασθενείς με αμαρτώματα εγκεφάλου σε σχέση με αυτούς με φυσιολογική νευροαπεικόνιση. Τέλος, οι ασθενείς με παθολογικό ηλεκτροεγκεφαλογράφημα παρουσίασαν μία στατιστικά σημαντική αύξηση της MMP-3 σε σχέση με τους πάσχοντες με φυσιολογικό εγκεφαλογράφημα. Συμπεράσματα: Οι παρατηρούμενες μεταβολές στην έκφραση των MMPs και TIMPs ενδέχεται να οδηγήσουν στην ανακάλυψη νέων βιοδεικτών για τη διάγνωση και παρακολούθηση της εξέλιξης των ασθενών με NF1.

Abstract: Neurofibromatosis type 1 represents a multisystemic disorder with multiple tissue and organ involvement. The aim of this study is to elucidate the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and of their tissue inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in patients with NF1. Patients and Methods: Thirty four patients formed the study group (mean age±SD: 7.99±5.01 years). Serum levels of the studied molecules have been correlated with the presence of the known NF1 diagnostic criteria and the results of the laboratory and radiological assessment. Results: Protein levels of TIMP-2 were significantly increased in NF1 patients while no statistically significant differences were found in relation to MMP-1, MMP-3, MMP-9 and TIMP-1. NF1 patients with Lisch nodules demonstrated a significant increase in the circulating levels of MMP-3. In addition, TIMP-2 serum concentration was significantly reduced in patients who demonstrated UBOs in their brain MRI in relation to NF1 patients with normal neuroradiological findings. Finally patients with an abnormal pattern in their EEG have shown a statistically significant increase in MMP-3 circulating levels. Conclusions: The reported alterations in the expression of MMPs and TIMPs suggest that these molecules may be used as potential biomarkers for the diagnosis and follow-up in NF1 patients.

Λέξεις-Κλειδιά: νευροϊνωμάτωση τύπου 1, εξωκυττάριος χώρος, μεταλλοπρωτεάσες του συνδετικού ιστού, ιστικοί αναστολείς των μεταλλοπρωτεασών, βιοδείκτες

Key-words: neurofibromatosis type 1, extracellular matrix, matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, biomarkers.

Εισαγωγή

Η Νευροϊνωμάτωση τύπου 1 (NF1) αποτελεί μία γενετική πολυσυστηματική διαταραχή η οποία ανήκει στα λεγόμενα νευροδερματικά νοσήματα ή φακωμάτωσις¹. Αιτιοπαθογενετικά, οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου της νευροϊνωματίνης, μίας κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης, που κωδικοποιείται από το μακρό σκέλος του χρωμοσώματος 17 [17q11.2]². Μετά την ταυτοποίηση του γονιδίου της νευροϊνωματίνης έχουν προταθεί πολυάριθμες θεωρίες σε σχέση με την αιτιοπαθογένεια της νόσου αν και μέχρι σήμερα οι ακριβείς μηχανισμοί μέσω των οποίων οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις οδηγούν στην εκδήλωση της NF1 δεν είναι πλήρως γνωστοί.

Η NF1 αποτελεί πάθηση με ποικίλες κλινικές εκδηλώσεις στη διαχείριση της οποίας πέρα από τον παιδίατρο, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει μία πληθώρα ειδικοτήτων. Η πολυσυστηματική αυτή φύση της νόσου καθιστά κάποιες φορές την αξιολόγηση των ασθενών με τη χρήση των κοινών κλινικών, εργαστηριακών και απεικονιστικών μεθόδων, δύσκολη στην καθημερινή πράξη. Ως εκ τούτου πραγματοποιείται σημαντική προσπάθεια για την ανεύρεση μορίων που να αντικατοπτρίζουν τις ενδοκυττάριας διεργασίες που συντελούνται στα πλαίσια της NF1, ειδικών δηλαδή βιοδεικτών. Η διάγνωση της νόσου είναι κατά κύριο λόγο κλινική και στηρίζεται στη χρήση των κριτηρίων του National Institutes of Health (NIH), τα οποία καθιερώθηκαν το 1987 και συνεχίζουν να ισχύουν έως και σήμερα³. Τα διαγνωστικά αυτά κριτήρια αποτελούν ταυτόχρονα τα κυριότερα κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου, παρά το γεγονός πως η NF1 χαρακτηρίζεται από μεγάλη φαινοτυπική ετερογένεια, ακόμη και μεταξύ ασθενών της ίδιας οικογένειας⁴.

Ο συνδετικός ιστός και συγκεκριμένα ο εξωκυττάριος χώρος, αναπαριστά ένα πολύπλοκο σύμπλεγμα μακρομορίων, ένα μικροπεριβάλλον που επηρεάζει πλήθος κυτταρικών διεργασιών του οποίου τα μόρια αποτελούν στόχους στην ανακάλυψη βιοδεικτών σε πλήθος παθήσεων. Ανάμεσα σε αυτά τα μόρια ανήκουν οι μεταλλοπρωτεάσες

του συνδετικού ιστού (Matrix Metalloproteinases, MMPs)⁵ οι οποίες αποτελούν ένζυμα-κλειδιά στην αποδόμηση του εξωκυττάρου χώρου⁶ και έχει αποδειχθεί πως συμμετέχουν σε πλήθος κυτταρικών διεργασιών, τόσο φυσιολογικών όσο και παθολογικών, που συνήθως συνδέονται με την φλεγμονή και τον κυτταρικό θάνατο⁷. Η σύνθεση των μορίων αυτών ρυθμίζεται κυρίως στο επίπεδο της μεταγραφής, ενώ η δραστηριότητά τους ελέγχεται τόσο μέσω πρωτεολυτικής ενεργοποίησης της δραστηριοποίησης των προενζύμων ή ζυμογόνων, όσο και μέσω της αναστολής των ενεργών ενζύμων από τους ιστικούς αναστολείς των μεταλλοπρωτεασών (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases, TIMPs)⁸.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μία προοπτική έρευνα ασθενών-μαρτύρων με σκοπό τη διερεύνηση της έκφρασης κάποιων μελών της οικογένειας των MMPs (MMP-1, MMP-3 και MMP-9) αλλά και της έκφρασης των ιστικών αναστολέων τους (TIMP-1 και TIMP-2), σε μία ομάδα παιδιατρικών ασθενών με NF1. Τα αποτελέσματα της έρευνας ενδέχεται να αποσαφηνίσουν έως ένα βαθμό ορισμένους από τους αιτιοπαθογενετικούς μηχανισμούς που ενέχονται στην εκδήλωση της NF1 και μπορεί να οδηγήσουν στην ανακάλυψη βιοδεικτών χρήσιμων για τη διάγνωση και την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου.

Μέθοδοι

Ασθενείς

Στη μελέτη συμμετείχαν ασθενείς με NF1 οι οποίοι παρακολουθούνται στο Κέντρο Αναπτυξιακής Ιατρικής «Απόστολος Φωκάς» της Α' Παιδιατρικής Κλινικής του Ιπποκρατείου ΓΝΘ. Κριτήριο εισόδου στη μελέτη θεωρήθηκε η διάγνωση της νόσου, η οποία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των διαγνωστικών κριτηρίων του National Institutes of Health (NIH). Ως κριτήρια αποκλεισμού θεωρήθηκαν η ταυτόχρονη παρουσία οξείας ή χρόνιας πάθησης στην αιτιοπαθογένεια της οποίας συμμετέχει ο μηχανισμός της φλεγμονής και δεν δικαιολογείται από την παρουσία της NF1, καθώς και

η λήψη φαρμακευτικής αγωγής που καταστέλλει τον μηχανισμό της φλεγμονής και θα μπορούσε να επηρεάσει την έκφραση των υπό εξέταση μορίων. Η ομάδα των μαρτύρων αποτελούνταν από ένα ισάριθμο πλήθος υγιών ατόμων ίδιου φύλου και ίδιας ηλικίας. Έπειτα από την ενυπόγραφη συγκατάθεση των γονέων ή κηδεμόνων των ασθενών και μαρτύρων που συμμετείχαν στη μελέτη, πραγματοποιήθηκε φλεβοκέντηση με σκοπό την λήψη αίματος. Η δειγματοληψία έγινε σε κάθε περίπτωση με τη χρήση συστήματος πεταλούδας και το ολικό αίμα φυγοκεντρήθηκε επί 10 λεπτά, στους 4 °C και σε 1750 g. Η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε φυγόκεντρο τύπου Neofuge 15R (High Speed Refrigerated Bench-top Centrifuge, Shanghai Lishen Scientific Equipment Co., Ltd, China) και μετά το πέρας αυτής, απομονώθηκε δείγμα ορού το οποίο καταψύχθηκε στους -80 °C, μέχρι τη χρήση του. Το σύνολο των ερευνητικών διαδικασιών της παρούσας μελέτης, διενεργήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ.

Παράλληλα σε κάθε ασθενή με NF1 καταγράφηκε το φύλο, η ηλικία, το οικογενειακό ιστορικό, και ο αριθμός των κριτηρίων που πληρεί για τη διάγνωση. Από τον εργαστηριακό και απεικονιστικό έλεγχο καταγράφηκε η ύπαρξη οστικής συμμετοχής με τη διενέργεια α/α μακρών οστών και σπονδυλικής στήλης, η ύπαρξη συμμετοχής από τους οφθαλμούς μετά από οφθαλμολογική εκτίμηση σε σχισμοειδή λυχνία, τα ευρήματα του νευροαπεικονιστικού ελέγχου με τη διενέργεια μαγνητικής τομογραφίας εγκεφάλου/σπονδυλικής στήλης και μαγνητικής αγγειογραφίας εγκεφάλου, η ύπαρξη συμμετοχής από την καρδιά με τη διενέργεια υπερηχογραφήματος, η ύπαρξη συμμετοχής από το ήπαρ και τον σπλήνα με τη διενέργεια υπερηχογραφήματος κοιλίας, καθώς και τα αποτελέσματα του νευροφυσιολογικού ελέγχου (HEG, οπτικά και ακουστικά προκλητά δυναμικά).

Ποσοτικός προσδιορισμός των MMPs και TIMPs με ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των MMP-1, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 και TIMP-2 (σε ng/ml ορού) πραγματοποιήθηκε εις διπλούν με την ένζυμο-ανοσοπροσοφνητική μέθοδο ELISA (R&D Systems Europe, Abingdon, UK), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Η μέθοδος σε σχέση

με τις MMPs αξιολογεί την συνολική ποσότητα των υπό εξέταση μορίων (προένζυμα και ενεργές μορφές). Η ευαισθησία της μεθόδου ήταν: MMP-1: 0.006 ng/ml, MMP-3: 0.045 ng/ml, MMP-9: 0.156 ng/ml, TIMP-1: 0.08 ng/ml, and TIMP-2: 0.011 ng/ml. Η αρχική διερεύνηση με τη χρήση των δειγμάτων των ασθενών καθόρισε την κατάλληλη αραίωση για κάθε ένα από τα υπό εξέταση μόρια, η οποία ορίστηκε ως εξής: MMP-3: 1/10; MMP-9: 1/40, TIMP-1: 1/100, TIMP-2: 1/50. Για την αξιολόγηση της MMP-1 δεν απαιτήθηκε αραίωση. Οι μετρήσεις της απορρόφησης πραγματοποιήθηκαν στα 450 nm (με μήκος κύματος αναφοράς τα 540 nm) σε κατάλληλη συσκευή ανάγνωσης μικροπλακιδίων ELISA (ELISA Reader, das SRL, Roma, ITALY).

Στατιστική επεξεργασία

Η περιγραφή των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με περιγραφικές στατιστικές μεθόδους για τις ποσοτικές μεταβλητές και συχνότητες για τις ποιοτικές. Για τη σύγκριση μεταξύ των ανεξάρτητων δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικές και μη παραμετρικές δοκιμασίες, ανάλογα με την κατανομή των ποσοτικών μεταβλητών (Student's t-test, Mann-Whitney U test). Για τη συσχέτιση μεταξύ των ποσοτικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης Spearman's rho. Η σχέση μεταξύ των ποιοτικών μεταβλητών διερευνήθηκε με πίνακες συνάφειας με τη δοκιμασία χ^2 . Η διερεύνηση του λόγου των αναλογιών των μετρούμενων παραμέτρων πραγματοποιήθηκε με μονοπαραγοντικό λογαριθμιστικό μοντέλο. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές όταν $p \leq 0.05$. Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έγινε με τη χρήση του βιοστατιστικού πακέτου «SPSS version 20.0 for Windows».

Αποτελέσματα

Στη μελέτη συμμετείχαν 34 ασθενείς με NF1, ηλικίας 6 μηνών έως 18 ετών (μέση ηλικία \pm σταθερά απόκλιση: 7.99 ± 5.01 έτη). Το 41.2% των συμμετεχόντων ήταν άρρενος φύλου (μέση ηλικία \pm σταθερά απόκλιση: 9.86 ± 5.47 έτη) ενώ το 58.8% ήταν θήλεα άτομα (μέση ηλικία \pm σταθερά απόκλιση: 6.68 ± 4.34 έτη). Η ομάδα των υγιών μαρτύρων ίδιου φύλου και ίδιας ηλικίας αποτελούνταν επίσης από 34 συμμετέχοντες (μέση ηλικία \pm σταθερά απόκλιση: 8.07 ± 4.77 έτη). Σε σχέση με τα διαγνωστικά κριτήρια της NF1, 15 ασθενείς πληρούσαν

Πίνακας 1. Περιγραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών με NF1 κατηγοριοποιημένα κατά φύλο

Μεταβλητές	Αγόρια	Κορίτσια	p	Σύνολο
N	14 (41.2%)	20 (58.8%)		34 (100%)
Ηλικία (έτη)	9.86 ± 5.47	6.68 ± 4.34	0.068	7.99 ± 5.01
Café au lait κηλίδες	14 (100%)	20 (100%)	-	34 (100%)
Νευρινώματα	5 (35.7%)	4 (20%)	0.307	9 (26.5%)
Πλεγματοειδή νευρινώματα	2 (14.3%)	0 (0%)	0.162	2 (5.9%)
Φακίδωση	11 (78.6%)	10 (50%)	0.092	21 (61.8%)
Όγκος οπτικής οδού	1 (7.1%)	2 (10%)	1.000	3 (8.8%)
Οζίδια του Lisch	5 (35.7%)	9 (45%)	0.588	14 (41.2%)
Οστική αλλοίωση	1 (7.1%)	1 (5%)	1.000	2 (5.9%)

Οι τιμές αναπαριστούν μέσο όρο ± απόκλιση ή απόλυτες τιμές (%)

2 κριτήρια, 10 ασθενείς 3 κριτήρια, 3 ασθενείς 4 κριτήρια, 5 ασθενείς 5 κριτήρια και μόλις ένας ασθενής 6 κριτήρια. Το σύνολο των ασθενών έφερε >6 café au lait κηλίδες, ενώ δεύτερο σε σειρά συχνότητας κριτήριο ήταν η παρουσία βουβωνικής ή μασχαλιαίας φακίδωσης. Τα περιγραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών που αφορούν στα διαγνωστικά κριτήρια κατηγοριοποιημένα κατά φύλο παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Στους ασθενείς με NF1 δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή των επιπέδων των MMPs που ποσοτικοποιήθηκαν (Πίνακας 2). Σε σχέση με την συγκέντρωση των ιστικών αναστολέων, δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή στα κυκλοφορούντα επίπεδα του TIMP-1, ενώ αντίθετα σημαντική ήταν η αύξηση της συγκέντρωσης του TIMP-2 στον ορό των ασθενών σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (Πίνακας 2). Παράλληλα δεν

ανευρέθησαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στους λόγους των MMPs/TIMPs ανάμεσα στους ασθενείς και τους υγιείς μάρτυρες με εξαίρεση του λόγου MMP-9/TIMP-2 που παρουσίασε στατιστική τάση για ελάττωση στους ασθενείς με NF1 (Πίνακας 2). Παράλληλα πραγματοποιήθηκε συσχέτιση των κυκλοφορούντων επιπέδων των υπό εξέταση μορίων με την ηλικία. Από τη στατιστική ανάλυση προέκυψε πως η συγκέντρωση της MMP-3 συσχετίζεται με την αύξηση της ηλικίας, εύρημα το οποίο δεν επιβεβαιώθηκε στην ομάδα των υγιών μαρτύρων (Πίνακας 3).

Η έκφραση των κυκλοφορούντων επιπέδων των MMPs και TIMPs εξετάστηκε στους ασθενείς με NF1 με βάση το φύλο. Από την στατιστική ανάλυση δεν ανευρέθησαν σημαντικές μεταβολές στις συγκεντρώσεις των MMPs και TIMPs ανάμεσα στους άρρενες και θήλεις ασθενείς (Πίνακας 4).

Πίνακας 2. Περιγραφικά στατιστικά της έκφρασης των MMPs και TIMPs σε ασθενείς με NF1 και σε υγιείς μάρτυρες

Παράμετρος	Ασθενείς (n=34)	Μάρτυρες (n=34)	p
MMP-1	3.40 ± 3.22*	1.87 ± 1.39*	0.834
MMP-3	4.66 ± 3.89*	7.53 ± 6.80*	0.459
MMP-9	340.38 ± 214.65*	311.08 ± 59.46*	1.000
TIMP-1	171.02 ± 42.48*	147.55 ± 13.23*	0.226
TIMP-2	103.25 ± 20.79*	56.64 ± 27.03*	0.000
MMP-9/TIMP-1	2.02 ± 1.23#	2.17 ± 1.07#	0.629
MMP-9/TIMP-2	3.51 ± 2.53#	6.95 ± 5.81#	0.051
MMP-1/TIMP-1	0.019 ± 0.016#	0.012 ± 0.008#	0.360
MMP-1/TIMP-2	0.034 ± 0.032#	0.040 ± 0.031#	0.449

Οι τιμές αναπαριστούν μέσο όρο ± σταθερά απόκλιση (σε ng/ml)* ή απόλυτη τιμή ± σταθερά απόκλιση#, στατιστική σημαντικότητα: p≤0.05

Πίνακας 3. Συσχέτιση μεταξύ της ηλικίας και της έκφρασης των MMPs και TIMPs σε ασθενείς με NF1 και υγιείς μάρτυρες

Παράμετρος	Ασθενείς (n=34)	Μάρτυρες (n=34)
MMP-1	r= -0.004, p= 0.982	r= 0.161, p= 0.678
MMP-3	r= 0.403, p= 0.018	r= 0.816, p= 0.053
MMP-9	r= 0.261, p= 0.135	r= -0.041, p= 0.922
TIMP-1	r= -0.159, p= 0.369	r= 0.268, p= 0.663
TIMP-2	r= -0.147, p= 0.408	r= 0.150, p= 0.809

Στατιστική σημαντικότητα: p≤0.05

Τα επίπεδα των υπό εξέταση μορίων ελέγχθηκαν για πιθανή διαφορική έκφραση μετά από κατηγοριοποίηση των ασθενών με βάση την ύπαρξη των διαγνωστικών κριτηρίων αλλά και τα αποτελέσματα του εργαστηριακού και απεικονιστικού ελέγχου. Σε σχέση με τα διαγνωστικά κριτήρια δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα κυκλοφορούντα επίπεδα των MMPs και TIMPs σε σχέση με την ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού, café au lait κηλίδων, νευρινωμάτων ή πλεγματοειδών νευρινωμάτων, φακίδωσης, όγκου της οπτικής οδού ή οστικών ανωμαλιών. Παράλληλα, δεν βρέθηκε διαφορά στην έκφραση των MMP-1, MMP-9, TIMP-1 και TIMP-2 με βάση την ύπαρξη ή όχι των οζιδίων του Lisch. Εντούτοις, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης της MMP-3 στους ασθενείς που είχαν οζίδια του Lisch σε σχέση με αυτούς που δεν είχαν παθολογικά ευρήματα κατά τον οφθαλμολογικό έλεγχο (μέσος όρος ± σταθερά απόκλιση: 5.43 ± 4.07

και 4.11 ± 3.76 αντίστοιχα, p= 0.047). Σε σχέση με τον εργαστηριακό και απεικονιστικό έλεγχο δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση των υπό εξέταση μορίων σε σχέση με τα ευρήματα από τη μαγνητική τομογραφία σπονδυλικής στήλης, τη μαγνητική αγγειογραφία εγκεφάλου, το υπερηχογράφημα καρδιάς και κοιλίας, και τα αποτελέσματα των προκλητών δυναμικών. Παρόλα αυτά βρέθηκε στατιστικά σημαντική ελάττωση της συγκέντρωσης του TIMP-2 στους ασθενείς με αμαρτώματα εγκεφάλου σε σχέση με αυτούς που είχαν φυσιολογική νευροαπεικόνιση (μέσος όρος ± σταθερά απόκλιση: 100.35 ± 24.57 και 105.11 ± 12.23 αντίστοιχα, p= 0.045). Τέλος οι ασθενείς με παθολογικό ηλεκτροεγκεφαλογράφημα παρουσίασαν μία στατιστικά σημαντική αύξηση της MMP-3 σε σχέση με τους πάσχοντες που είχαν φυσιολογικό εγκεφαλογράφημα (μέσος όρος ± σταθερά απόκλιση: 7.69 ± 6.04 και 3.72 ± 2.43 αντίστοιχα, p= 0.009). Μάλιστα σε μονοπα-

Πίνακας 4. Περιγραφικά στατιστικά της έκφρασης των MMPs και TIMPs σε ασθενείς με NF1 κατηγοριοποιημένα κατά φύλο

Παράμετρος	Αγόρια (n=14)	Κορίτσια (n=20)	p
MMP-1	3.68 ± 3.45*	3.20 ± 3.13*	0.569
MMP-3	5.79 ± 5.12*	3.89 ± 2.61*	0.569
MMP-9	339.60 ± 171.31*	340.92 ± 244.84*	0.666
TIMP-1	181.75 ± 42.36*	163.50 ± 41.98*	0.223
TIMP-2	99.30 ± 13.12*	106.01 ± 24.76*	0.500
MMP-9/TIMP-1	1.97 ± 1.35#	2.06 ± 1.35#	0.831
MMP-9/TIMP-2	3.57 ± 2.09#	3.47 ± 2.85#	0.569
MMP-1/TIMP-1	0.019 ± 0.017#	0.018 ± 0.015#	0.904
MMP-1/TIMP-2	0.037 ± 0.035#	0.031 ± 0.029#	0.522

Οι τιμές αναπαριστούν μέσο όρο ± σταθερά απόκλιση (σε ng/ml)* ή απόλυτη τιμή ± σταθερά απόκλιση#, στατιστική σημαντικότητα: p≤0.05

ραγοντικό λογαριθμιστικό μοντέλο βρέθηκε πως η πιθανότητα εμφάνισης παθολογικού ηλεκτροεγκεφαλογραφήματος αυξάνει με την αύξηση της συγκέντρωσης της MMP-3 (λόγος αναλογιών=1.275, $p=0.043$).

Συζήτηση

Η NF1 αποτελεί πάθηση η οποία σχετίζεται λειτουργικά με την κυτταρική μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση^{9,10}, λειτουργίες οι οποίες καθορίζονται ή επηρεάζονται σε σημαντικό βαθμό από διάφορα μόρια του εξωκυττάρου χώρου. Παράλληλα, αποτελεί εξ' ορισμού νόσο που σχετίζεται με τον εξωκυττάριο χώρο, αφού παθολογοανατομικά τα νευρινώματα, όπως φανερώνει και το όνομά τους, αποτελούν όγκους που αντιπροσωπεύουν μίγμα νευρικών στοιχείων και συνδετικού ιστού και χαρακτηρίζονται από υπέρμετρη εναπόθεση θεμέλιας ουσίας^{11,12}. Ειδικά η έκφραση των MMPs σε ασθενείς με NF1 θα μπορούσε να μεταβάλλεται δεδομένου ότι πολλά κύτταρα μέσα στα νευρινώματα εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας και ο αυξητικός παράγων των ινοβλαστών, οι οποίοι ρυθμίζουν την έκφραση των MMPs¹³. Όλα τα παραπάνω αποτελούν απόδειξη πως ο εξωκυττάριος χώρος μπορεί να εμπλέκεται στην αιτιοπαθογένεια της NF1 και γίνεται καθαρά αντιληπτό πως η αναζήτηση ενός πιθανού βιοδείκτη ανάμεσα στα μόριά του μπορεί να δικαιολογηθεί πολύ εύκολα.

Παρά τα ανωτέρω, ελάχιστα μέλη της οικογένειας των MMPs έχουν αποτελέσει στο παρελθόν "ερευνητικούς στόχους" σε ασθενείς με NF1. Κοινό χαρακτηριστικό αυτών των μελετών είναι η μεταβολή στην έκφραση διαφόρων μορίων της οικογένειας των MMPs και των TIMPs σε ιστούς κυρίως πλεγματοειδών νευρινωμάτων ή κακοήθων όγκων των ελύτρων των περιφερικών νεύρων¹⁴⁻¹⁷. Αντιφατικά είναι τα αποτελέσματα όσον αφορά στην έκφραση των MMPs και TIMPs ανάμεσα σε κύτταρα Schwann από ασθενείς με NF1 και υγιή άτομα^{18,19}. Παρά τα αποτελέσματα των μελετών αυτών η έκφραση των MMPs και των TIMPs δεν έχει μελετηθεί στον ορό των ασθενών με NF1, με εξαίρεση την έρευνα της Park και των συνεργατών της οι οποίοι διερεύνησαν τα κυκλοφορούντα επίπεδα των TIMP-1 και TIMP-2 χωρίς να καταλήξουν σε στατιστικά σημαντικές διαφορές²⁰. Κατ'αυτήν την έν-

νοια, η παρούσα έρευνα αποτελεί την πρώτη προσπάθεια μελέτης της έκφρασης των υπό εξέταση μορίων στον ορό ασθενών με NF1. Συνολικά, φάνηκε πως υπάρχει αύξηση της συγκέντρωσης του TIMP-2 χωρίς στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα των MMP-1, MMP-3, MMP-9 και TIMP-1. Δεδομένου πως οι MMPs συμμετέχουν ενεργά στην αποδόμηση του εξωκυττάρου χώρου και οι TIMPs μέσω της αναστολής των MMPs αποκαθιστούν την σύνθεσή του, η αύξηση αυτή στην έκφραση του TIMP-2 καθώς και η ελάττωση του λόγου MMP-9/TIMP-2 στους ασθενείς φανερώνει την στροφή της ισορροπίας προς την πλευρά της σύνθεσης. Τέλος, η συσχέτιση των τιμών της MMP-3 με την ηλικία μόνο στους ασθενείς και όχι στον υγιή πληθυσμό φανερώνει μία τάση αύξησης του μορίου αυτού με την πάροδο του χρόνου, οπότε η παρακολούθησή του θα μπορούσε να αναδείξει έναν πιθανό βιοδείκτη για την αξιολόγηση της εξέλιξης των ασθενών.

Παράλληλα βρέθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της MMP-3 στους ασθενείς που είχαν οζίδια του Lisch σε σχέση με αυτούς που δεν είχαν παθολογικά ευρήματα κατά τον οφθαλμολογικό έλεγχο. Διάφορα μόρια της οικογένειας των MMPs έχουν συσχετισθεί με πλήθος οφθαλμολογικών παθήσεων²¹⁻²³. Το εύρημα της παρούσας έρευνας θα μπορούσε να αποδοθεί σε μία πιθανή ενεργοποίηση του μηχανισμού αποδόμησης του εξωκυττάρου χώρου σε επίπεδο οφθαλμών λόγω της παρουσίας των οζιδίων του Lisch στους ασθενείς με NF1. Επιπρόσθετα βρέθηκε στατιστικά σημαντική ελάττωση της συγκέντρωσης του TIMP-2 στους ασθενείς με αμαρτώματα εγκεφάλου σε σχέση με αυτούς που είχαν φυσιολογική νευροαπεικόνιση. Το εύρημα αυτό θα μπορούσε να συσχετισθεί με την πρόσφατη ανακάλυψη πως οι ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση που λάμβαναν ιντερφερόνη-γ παρουσίασαν αύξηση των επιπέδων του TIMP-1 μετά τη θεραπεία²⁴. Η αύξηση αυτή συσχετίστηκε με την βελτίωση της νευροαπεικονιστικής κατάστασης των ασθενών φανερώνοντας την πιθανή νευροπροστατευτική δράση των TIMPs, σε συμφωνία και με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Τέλος οι ασθενείς με παθολογικό ηλεκτροεγκεφαλογράφημα παρουσίασαν μία στατιστικά σημαντική αύξηση της MMP-3 σε σχέση με τους πάσχοντες που είχαν φυσιολογικό εγκεφαλογράφημα. Ο παθογενετικός ρόλος της

MMP-3 διερευνάται σε διάφορες νευρολογικές καταστάσεις. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης ο Luckman και οι συνεργάτες του έδειξαν πως ένα ποσοστό των ασθενών με επιληψία παρουσιάζουν ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα MMP-3 στον ορό τους²⁵.

Συμπεράσματα

Η NF1 αποτελεί μία πολυσυστηματική πάθηση με ποικίλη προσβολή διαφόρων ιστών και οργάνων. Πρόσφατες έρευνες απέδειξαν πως διάφορα μόρια του εξωκυττάριου χώρου παρουσιάζουν μεταβολή στην έκφρασή τους στα άτομα που νοσούν. Η παρούσα μελέτη, αποτελεί ουσιαστικά την πρώτη προσπάθεια διερεύνησης της έκφρασης των MMPs και TIMPs σε παιδιατρικούς ασθενείς με NF1. Βρέθηκε πως οι ασθενείς που μελετήθηκαν παρουσιάζουν μεταβολή στην έκφραση του TIMP-2 σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό. Παράλληλα φάνηκε πως κάποια από τα υπό εξέταση μόρια παρουσιάζουν μεταβολή στα επίπεδά τους μετά από κατηγοριοποίηση των ασθενών με βάση τα ισχύοντα διαγνωστικά κριτήρια και τα αποτελέσματα του παρακλινικού ελέγχου. Με βάση αυτό, τα μόρια που εξετάστηκαν θα μπορούσαν ενδεχόμενα να προταθούν ως βιοδείκτες για τη διάγνωση και την παρακολούθηση των ασθενών. Παρόλα αυτά για να εφαρμοσθεί η χρήση τους σε ευρεία κλίμακα απαραίτητη είναι η επιβεβαίωση των ευρημάτων σε ένα μεγαλύτερο πληθυσμό ασθενών.

Βιβλιογραφία

1. *BR, Theos A.* Neurofibromatosis type 1. *J Am Acad Dermatol.* 2009;61(1):1-14.
2. *Korf BR.* Clinical Features and Pathobiology of Neurofibromatosis 1. *J Child Neurol* 2002;17:573-577.
3. *Gutmann D, Aylsworth A, Carey JC, Korf B, Marks J, Pyeritz RE, et al.* The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. *JAMA* 1997;278:51-57.
4. *Pinson S, Wolkenstein P.* Neurofibromatosis type 1 or Von Recklinghausen's disease. *Rev Med Interne.* 2005;26(3):196-215.
5. *Nagase H, Woessner JF Jr.* Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274: 21491-21494.
6. *Woessner JF Jr.* Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991;5:2145-2154.
7. *Rydlova M, Holubec L Jr, Ludvikova M Jr, Kalfert D, Franeckova J, Povysil C, et al.* Biological activity and clinical implications of the matrix metalloproteinases. *Anticancer Res* 2008;28:1389-1397.
8. *Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR.* The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:1362-1378.
9. *Ballester R, Marchuk D, Boguski M, Saulino A, Letcher R, Wigler M, et al.* The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. *Cell* 1990;63:851-859.
10. *Martin G, Viskochil D, Bollag G, McCabe P, Crosier W, Haubruck H, et al.* The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with Ras p21. *Cell* 1990;63:843-849.
11. *North KN.* Neurofibromatosis type 1 in childhood. *Semin Pediatr Neurol* 1998;5(4):231-242.
12. *Riccardi VM.* Neurofibromatosis: past, present, and future. *N Engl J Med* 1991;324:1283-1285.
13. *Munchhof AM, Li F, White HA, Mead LE, Krier TR, Fenoglio A, et al.* Neurofibroma-associated growth factors activate a distinct signaling network to alter the function of neurofibromin-deficient endothelial cells. *Hum Mol Genet.* 2006;15(11):1858-69.
14. *Hummel TR, Jessen WJ, Miller SJ, Kluwe L, Mautner VF, Wallace MR, et al.* Gene expression analysis identifies potential biomarkers of neurofibromatosis type 1 including adrenomedullin. *Clin Cancer Res* 2010;16(20):5048-5057.
15. *Lévy P, Bièche I, Leroy K, Parfait B, Wechsler J, Laurendeau I, et al.* Molecular profiles of neurofibromatosis type 1-associated plexiform neurofibromas: identification of a gene expression signature of poor prognosis. *Clin Cancer Res* 2004;10(11):3763-3771.
16. *Lévy P, Vidaud D, Leroy K, Laurendeau I, Wechsler J, Bolasco G, et al.* Molecular profiling of malignant peripheral nerve sheath tumors associated with neurofibromatosis type 1, based on large-scale real-time RT-PCR. *Mol Cancer* 2004;15:3:20.
17. *Holtkamp N, Atallah I, Okuducu AF, Mucha J, Hartmann C, Mautner VF, et al.* MMP-13 and p53 in the progression of malignant peripheral nerve sheath tumors. *Neoplasia.* 2007;9(8):671-677.
18. *Thomas SL, De Vries GH.* Angiogenic expression profile of normal and neurofibromin-deficient human Schwann cells. *Neurochem Res* 2007;32(7):1129-1141.
19. *Muir D.* Differences in proliferation and invasion by normal, transformed and NF1 Schwann cell cultures are influenced by matrix metalloproteinase expression. *Clin Exp Metastasis* 1995;13(4):303-314.
20. *Park SJ, Sawitzki B, Kluwe L, Mautner VF, Holtkamp N, Kurtz A.* Serum biomarkers for neurofibromatosis type 1 and early detection of malignant peripheral nerve-sheath tumors. *BMC Med* 2013;11:109.

-
21. Liang CL, Wang HS, Hung KS, Hsi E, Sun A, Kuo YH, et al. Evaluation of MMP3 and TIMP1 as candidate genes for high myopia in young Taiwanese men. *Am J Ophthalmol* 2006;142(3):518-520.
22. Agapova OA, Ricard CS, Salvador-Silva M, Hernandez MR. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human optic nerve head astrocytes. *Glia* 2001;33(3):205-216.
23. Agapova OA, Kaufman PL, Lucarelli MJ, Gabelt BT, Hernandez MR. Differential expression of matrix metalloproteinases in monkey eyes with experimental glaucoma or optic nerve transection. *Brain Res* 2003;967(1-2):132-143.
24. Avolio C, Filippi M, Tortorella C, Rocca MA, Ruggieri M, Agosta F, et al. Serum MMP-9/TIMP-1 and MMP-2/TIMP-2 ratios in multiple sclerosis: relationships with different magnetic resonance imaging measures of disease activity during IFN-beta-1a treatment. *Mult Scler* 2005;11(4):441-446.
25. Luckman SP, Gilhus NE, Romi F. Matrix metalloproteinase-3 in myasthenia gravis compared to other neurological disorders and healthy controls. *Autoimmune Dis* 2011;2011:151258.
-
- Αλληλογραφία**
Σπύρος Π. Μπάτζιος,
Κωνσταντινουπόλεως 93,
54642 Θεσσαλονίκη,
Τηλ. 2311-251088,
E-mail: spyros.batzios@gmail.com
- Corresponding author**
Spyros P. Batzios,
93 Konstantinoupoleos str,
54642 Thessaloniki,
Phone 2311-251088,
E-mail: spyros.batzios@gmail.com
-