



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
—ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837—

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Ιατρική Γενετική: Κλινική και Εργαστηριακή Κατεύθυνση»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη έκφρασης του miR-29a-3p και περιβαλλοντικών
παραγόντων σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο επεισόδιο**

Κωνσταντίνα Γ. Κελαϊδώνη

Επιβλέποντες:

Δεδούσης Γεώργιος, Καθηγητής Τμήματος Επιστήμης
Διαίτολογίας – Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τζέτη Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής, Ιατρική
Σχολή Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

**ΑΘΗΝΑ
ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2019**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη έκφρασης του miR-29a-3p και περιβαλλοντικών παραγόντων σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο επεισόδιο

Κωνσταντίνα Γ. Κελαϊδώνη

A.M.: 20160644

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ: **Δεδούσης Γεώργιος**, Καθηγητής Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο
Τζέτη Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής, Ιατρική Σχολή Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ **Δεδούσης Γεώργιος**, Καθηγητής Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο
Συνοδινού Traeger Ιωάννα-Ραχήλ, Καθηγήτρια Γενετικής, Ιατρική Σχολή Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
Τζέτη Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής, Ιατρική Σχολή Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Φεβρουάριος 2019

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή και σκοπός: Τα καρδιαγγειακά νοσήματα και ιδίως η στεφανιαία νόσος αποτελούν πρωταρχική αιτία θανάτου παγκοσμίως, όπως και στη χώρα μας. Ο συνδυασμός γενετικών, επιγενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων συμβάλλουν στην εμφάνιση και στην εξέλιξη της νόσου. Η παρούσα μελέτη είναι μία follow up μελέτη κι έχει σκοπό να διερευνήσει το ρόλο του miR-29a-3p στην εκδήλωση του εμφράγματος του μυοκαρδίου (myocardial infarction MI). Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε η έκφραση του microRNA μετά το έμφραγμα, ο τρόπος που αυτή μεταβάλλεται ένα εξάμηνο μετά την εμφάνιση του επεισοδίου, η πιθανή συσχέτισή της με περιβαλλοντικούς παράγοντες της νόσου, καθώς και άλλους βιοδείκτες όπως οι φλεγμονώδεις παράγοντες ιντερλευκίνη- 6 (interleukin -6, IL-6) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκου (tumor necrosis factor- α , TNF- α).

Υλικά και Μέθοδοι: Στη μελέτη εντάχθηκαν ασθενείς που νοσηλεύθηκαν για οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (OEM). Μέσω ερωτηματολογίου συλλέχθηκαν στοιχεία που αφορούσαν ανθρωπομετρικά δεδομένα, κλινικά δεδομένα, τον τρόπο ζωής, τις καπνιστικές συνήθειες και τη φυσική δραστηριότητα. Από κάθε ασθενή απομονώθηκαν βιολογικά δείγματα, από τα οποία έγινε η σχετική ποσοτικοποίηση του miR-29a-3p με τη μέθοδο της Real Time PCR. Επίσης υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις των κυτταροκινών με τη χρήση της τεχνικής ELISA.

Αποτελέσματα: Ανάμεσα στους ασθενείς βρέθηκε μεγάλο ποσοστό αντρών, σημαντική συννοσηρότητα σε υπερλιπιδαιμία, υπέρταση και σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2), σχετικά υψηλά επίπεδα υπέρβαρων-παχύσαρκων, μεγάλο ποσοστό καπνιστών κι ένα μικρό ποσοστό οικογενειακού ιστορικού καρδιαγγειακών νοσημάτων. Επίσης στο στάδιο του επανελέγχου, ένα ποσοστό κοντά στο 20% επανανοσηλεύθηκε μέσα στο πρώτο εξάμηνο, ενώ ένα σχετικά υψηλό ποσοστό διέκοψε το κάπνισμα και ασκούσαν σχεδόν καθημερινά. Τα επίπεδα έκφρασης του miR-29a-3p ήταν αυξημένα στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς χωρίς βέβαια να υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά, ενώ η έκφραση φάνηκε να μειώνεται έξι μήνες μετά το επεισόδιο. Η μεταβολή της έκφρασης συσχετίστηκε μέσω ελέγχου t-test με την άσκηση, χωρίς όμως να διατηρείται αυτή η συσχέτιση κατόπιν ανάλυσης γραμμικής παλινδρόμησης. Επιπλέον η έκφραση του miR-29a-3p τα πρώτα εικοσιτετράωρα μετά από την εκδήλωση του εμφράγματος βρέθηκε να συσχετίζεται αρνητικά με τα αυξημένα επίπεδα του φλεγμονώδους παράγοντα νέκρωσης όγκου (tumor necrosis factor- α , TNF- α). Τέλος οι παράγοντες φλεγμονής ήταν αυξημένοι μετά το επεισόδιο, ενώ μειώθηκαν έξι μήνες μετά από αυτό.

Συμπεράσματα: Το miR-29a-3p πιθανώς εμπλέκεται στην εξέλιξη του εμφράγματος και η μεταβολή στην έκφρασή του μετά από το επεισόδιο επηρεάζεται από το περιβάλλον. Ωστόσο θα πρέπει να αυξηθεί το μέγεθος του δείγματος, ώστε να αυξηθεί και η στατιστική ισχύ. Τέλος, το miR-29a-3p συσχετίζεται αρνητικά με τα επίπεδα του παράγοντα νέκρωσης όγκου (tumor necrosis factor- α , TNF- α) κατά την εκδήλωση του εμφράγματος.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Έκφραση του miR-29a-3p και Στεφανιαία Νόσος

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Καρδιαγγειακά νοσήματα, οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, στεφανιαία νόσος, microRNAs, κυτταροκίνες

ABSTRACT

Introduction and purpose: Cardiovascular diseases and especially coronary heart disease are the leading cause of death worldwide, as in our country. The combination of genetic, epigenetic and environmental factors contributes to the emergence and progression of the disease. This work is a follow-up study and it aims to investigate the role of mir-29a-3p in the onset of myocardial infarction (MI). More specifically, this study investigates the microRNA expression after the infarction and the way it alters its expression six months after the onset of the episode, its possible association with environmental factors of the disease, as well as other biomarkers such as the interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α).

Materials and methods: This study included patients that were hospitalized for MI. Through a questionnaire anthropometric, clinical, lifestyle, smoking habits, and physical activity data were collected. From each patient, biological samples were isolated, from which the relative quantification of mir-29a-3p was performed by the Real Time – PCR method. Assays of TNF- α and IL-6 were performed using high sensitivity ELISA.

Results: The patient cohort included a high percentage of men, hypertension, hyperlipidaemia, diabetes type 2, overweight-obese and smokers, a low percentage having CAD family history and the patients had reduced physical activity. A percentage of approximately 20% of the patients survived a second event during the follow up period. Mir-29a-3p expression levels were elevated in patients relative to healthy individuals, whereas expression appeared to decrease six months after the episode. The change in expression was correlated with exercise, but this correlation was not maintained after linear regression analysis. In addition, the expression of mir-29a-3p in the first 24 hours after the onset of infarction was found to be negatively correlated with increased levels of tumor necrosis factor- α , TNF- α . The inflammation factors were increased after the episode and decreased six months later.

Conclusions: Mir-29a-3p is probably involved in the development of the infarction. The expression of mir-29a-3p after the episode is influenced by environmental factors. However, the size of the sample should be increased in order to increase the statistical power. Mir-29a-3p correlates negatively with tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels at the onset of the infarction.

SUBJECT AREA: The expression of mir-29a-3p and Coronary Heart Disease

KEYWORDS: cardiovascular diseases, myocardial infarction, coronary heart disease, microRNAs, cytokines

Στους γονείς μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία βρίσκεται στα πλαίσια μίας ευρύτερης έρευνας της «Greek Recurrent Myocardial Infarction», η οποία αναπτύχθηκε και προετοιμάστηκε από τους Καθηγητές Γεώργιο Δεδούση, Πάνο Δελούκα και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Λουκιανό Ραλλίδη.

Πρώτο από όλους θέλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου καθηγητή, κ. Δεδούση Γεώργιο για την πολύτιμη καθοδήγησή του και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Στο σημείο αυτό θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τις υπεύθυνες μου καθηγήτριες από την Ιατρική Σχολή κα Τζέτη Μαρία και κα Συνοδινού-Traeger Ιωάννα Ραχήλ.

Επιπλέον θα ήθελα να εκφράσω την ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη μου στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ.Λουκιανό Ραλλίδη και στην ερευνητική του ομάδα για τη συνεργασία τους και την πολύτιμη βοήθειά τους στη στρατολόγηση των εθελοντών-ασθενών της έρευνας.Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Πάνο Δελούκα για τη συμβολή του στην έρευνα αυτή, ήδη από τα πρώτα χρόνια.

Είμαι ευγνώμων σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου, τα οποία έχουν αποτελέσει πηγή φιλίας και άριστης συνεργασίας σε όλη τη διάρκεια της δουλειάς μου στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου Γιώργο και Κατερίνα, καθώς και τον αδερφό μου Δημήτρη, που με υπομονή και κουράγιο πρόσφεραν την απαραίτητη ηθική συμπαράσταση για την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	14
1.1	Ανασκόπηση της λειτουργίας του καρδιαγγειακού συστήματος	14
1.2	Καρδιαγγειακά νοσήματα.....	15
1.3	Επιδημιολογία και Καρδιαγγειακή Νόσος	16
1.3.1	Παγκόσμια επιδημιολογικά δεδομένα της νόσου	16
1.3.2	Επιδημιολογικά δεδομένα της νόσου στην Ελλάδα	18
1.4	Παθοφυσιολογία και κλινική εκδήλωση της καρδιαγγειακής νόσου	18
1.5	Παράγοντες κινδύνου της καρδιαγγειακής νόσου	22
1.5.1	Μη τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου της καρδιαγγειακής νόσου	22
1.5.2	Τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου της καρδιαγγειακής νόσου	23
1.5.3	Γενετικοί παράγοντες της καρδιαγγειακής νόσου	26
1.6	Επιγενετική της καρδιαγγειακής νόσου: microRNAs ως πιθανοί βιοδείκτες	27
1.6.1	Η βιογένεση και ο ρόλος των microRNAs	27
1.6.2	Η συμβολή των microRNAs στην πρόγνωση και τη διάγνωση της καρδιαγγειακής νόσου	31
1.6.3	Αλληλεπίδραση των microRNAs και άλλων παραγόντων της καρδιαγγειακής νόσου.....	33
1.6.4	Το mir-29a-3p και η στεφανιαία νόσος	35
1.7	Σκοπός της εργασίας	39
2.	ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	41
2.1	Συμμετέχοντες	41
2.2	Σχεδιασμός της έρευνας	41
2.3	Τα μέσα συλλογής δεδομένων της έρευνας	42
2.3.1	Δεδομένα ερωτηματολογίου	42
2.3.2	Συλλογή δείγματος αίματος, ορού, πλάσματος και λευκοκυττάρων	43
2.3.3	Συλλογή δεδομένων για τα επίπεδα των κυτταροκινών TNF-α και IL-6.....	44
2.4	Διαδικασία της μελέτης έκφρασης του mir-29a-3p.....	44
2.4.1	Παράγοντες που επηρεάζουν τη συνολική διαδικασία	45
2.4.2	Ανάλυση πρωτοκόλλων.....	46
2.4.3	Ανάλυση των δεδομένων.....	55
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	57
3.1	Περιγραφικά στοιχεία του δείγματος	57
3.2	Συνοδά Νοσήματα κι Επανάνοσηλεία	58
3.3	Τρόπος ζωής των εθελοντών	58
3.3.1	Καπνιστικές συνήθειες.....	58
3.3.2	Φυσική δραστηριότητα	59
3.3.3	Ώρες ύπνου, τηλεθέασης και υπολογιστή.....	59
3.4	Αποτελέσματα της έκφρασης του mir-29a-3p.....	60
3.4.1	Αποτελέσματα της έκφρασης mir-29a-3p σε υγιείς και ασθενείς	60
3.4.2	Αποτελέσματα της έκφρασης του mir-29a-3p στις δύο χρονικές στιγμές	61
3.4.3	Περιβαλλοντικοί παράγοντες κι έκφραση του mir-29a-3p.....	61

3.4.4 Παράγοντες φλεγμονής κι έκφραση του miR-29a-3p.....	64
3.4.4.1Αποτελέσματα των επιπέδων των κυτταροκινών των ασθενών στις δύο χρονικές στιγμές....	64
3.4.4.2Αποτελέσματα ελέγχου συσχέτισης της έκφρασης του miR-29a-3p με τα επίπεδα των κυτταροκινών.....	66
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	67
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	70
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	71
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	72
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	74
ΠΙΝΑΚΕΣ.....	74
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ	80
ΕΙΚΟΝΕΣ.....	80
ΣΧΗΜΑΤΑ	87
ΑΝΑΦΟΡΕΣ	90

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Ρυθμός θανάτου από τη στεφανιαία νόσο σε άνδρες και γυναίκες ηλικίας 5-74 ετών.....	17
Σχήμα 2: Η έκφραση του miR-29a-3p σε RQ Units σε υγιείς και ασθενείς.....	60
Σχήμα 3: Μέσος όρος της έκφρασης του miR-29a-3p σε RQ Units κατά τις δύο χρονικές στιγμές μετά το επεισόδιο	61
Σχήμα 4: Σχέση της μεταβολής της έκφρασης του miR-29a-3p με την άσκηση	63
Σχήμα 5: Μέσος όρος των επιπέδων του TNF-α(pg/ml) κατά τις δύο χρονικές στιγμές μετά το επεισόδιο	65
Σχήμα 6: Μέσος όρος των επιπέδων της IL-6(pg/ml) κατά τις δύο χρονικές στιγμές μετά το επεισόδιο .	65

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1	Στάδια της διαδικασίας της αθηροσκλήρωσης	20
Εικόνα 2:	Στάδια βιογένεσης των microRNAs και η δράση τους στο m RNA	30
Εικόνα 3:	Ο ρόλος των microRNAs στη γονιδιακή ρύθμιση σε μεταφραστικό επίπεδο	30
Εικόνα 4:	Ο ρόλος των microRNAs στη ρύθμιση της έκφρασης σε γονιδιακό επίπεδο	31
Εικόνα 5:	Τα κυκλοφορούντα microRNAs, τα οποία έχουν συσχετιστεί με τη διάγνωση και πρόγνωση των καρδιαγγειακών νοσημάτων.Ειδικά τα microRNAs με μεγαλύτερου μεγέθους γραμματοσειρά είναι αυτά που έχουν συσχετιστεί με έμφραγμα μυοκαρδίου	32
Εικόνα 6:	A.Η προέλευση και η απελευθέρωση των microRNAs στην κυκλοφορία κατά το έμφραγμα μυοκαρδίου.Σε απόκριση του εμφράγματος τα τραυματισμένα κύτταρα του μυοκαρδίου επηρεάζουν την έκφραση των microRNAs, μέσω διαφόρων μηχανισμών που περιλαμβάνουν κι άλλους παράγοντες όπως εξωσωμάτια, αποπτωτικά σωμάτια, υψηλή πυκνότητα λιποπρωτεϊνών και άλλα πρωτεϊνικά συμπλέγματα. B.Η λίστα με κάποια από τα microRNAs που υποεκφράζονται ή υπερεκφράζονται μετά την εκδήλωση του εμφράγματος του μυοκαρδίου	34
Εικόνα 7:	Η ακριβής θέση του χρωμοσώματος 7 από την οποία μεταγράφεται το mir-29a έτσι όπως προκύπτει από την GRCh38 p12 Assembly.....	35
Εικόνα 8:	Τα καρδιακά κύτταρα υφίστανται φαινοτυπικές αλλαγές κατά τη διάρκεια του ισχαιμικού επεισοδίου και συγκεκριμένα microRNAs συμμετέχουν στη ρύθμιση του πεπρωμένου των κυττάρων μετά από το έμφραγμα του μυοκαρδίου.Η θεραπεία μετά το επεισόδιο στοχεύει στη ρύθμιση όλων των μοριακών μονοπατιών στους ινοβλάστες, στα κύτταρα του μυοκαρδίου και του ενδοθηλίου	37
Εικόνα 9:	Προτεινόμενο μοντέλο ρύθμισης της έκφρασης κάποιων miRNAs που εκφράζονται στους ινοβλάστες κατά την εκδήλωση εμφράγματος του μυοκαρδίου	38
Εικόνα 10:	Προτεινόμενο μοντέλο απόκρισης του mir-29 και του TGF-b ύστερα από το στρες του ισχαιμικού επεισοδίου	39
Εικόνα 11:	Προσθήκη της Poly-A ουράς στα microRNAs	49
Εικόνα 12:	Σύνδεση του adaptor στο microRNA με αντίδραση λιγάσης	50
Εικόνα 13:	Σύνδεση του Universal RT primer στην Poly-A ουρά.....	51
Εικόνα 14:	Σύνδεση των εκκινητών και των ανιχνευτών στους κλώνους c DNA	52
Εικόνα 15:	Αρχικός πολυμερισμός και διαχωρισμός της χρωστικής αναφοράς από τον ανιχνευτή	53
Εικόνα 16:	Ολοκλήρωση του πολυμερισμού	53
Εικόνα 17:	Προτεινόμενο μοντέλο απόκρισης του mir-29 και του TGF-b ύστερα από το στρες του ισχαιμικού επεισοδίου	84

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Μεταβολή της έκφρασης κάποιων microRNAs κατά την εκδήλωση εμφράγματος του μυοκαρδίου σε διαφορετικούς πληθυσμούς	33
Πίνακας 2: Ποσότητες για την παρασκευή του TURBO DNase	46
Πίνακας 3: Ποσότητες για την παρασκευή του PK Digestion Mix.....	46
Πίνακας 4: Ποσότητες για την παρασκευή του Lysis Binding Mix	47
Πίνακας 5: : Ποσότητες για την προετοιμασία του Poly-A Reaction Mix	50
Πίνακας 6: Ποσότητες για την προετοιμασία του Ligation Reaction Mix	50
Πίνακας 7: Ποσότητες για την προετοιμασία του Reverse Transcription Reaction Mix.....	51
Πίνακας 8: Ποσότητες για την προετοιμασία του miR-Amp Mix	52
Πίνακας 9: Ποσότητες για την προετοιμασία του Real-Time Reaction Mix	54
Πίνακας 10: Οι κύκλοι και οι θερμοκρασίες στο μηχανήμα της Applied Biosystems για τη Real-time PCR	54
Πίνακας 11: Περιγραφικά στοιχεία του δείγματος	57
Πίνακας 12: Δεδομένα για συνοδά νοσήματα, επανανοσηλεία και τον τρόπο ζωής των ασθενών	59
Πίνακας 13: Έλεγχος t-test για τη συσχέτιση της μεταβολής του miR-29a-3p με περιβαλλοντικούς παράγοντες	62
Πίνακας 14: Ανάλυση μοντέλων γραμμικής παλινδρόμησης για τη σχέση της μεταβολής της έκφρασης του miR-29a-3p με την άσκηση.....	64
Πίνακας 15: Αποτελέσματα της ανάλυσης των μοντέλων γραμμικής παλινδρόμησης για τον έλεγχο της σχέσης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του miR-29a-3p και των επιπέδων του TNF-α έως και τρεις ημέρες μετά το επεισόδιο.....	66
Πίνακας 16: Σύγκριση αποτελεσμάτων με τα αποτελέσματα της έρευνας HELIOS	68

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το θέμα το οποίο πραγματεύεται η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή είναι ο ρόλος του miR-29a-3p και των περιβαλλοντικών παραγόντων στην παθοφυσιολογία και την εξέλιξη της στεφανιαίας νόσου. Πιο συγκεκριμένα, στόχος της εργασίας είναι η μελέτη της έκφρασης του προαναφερθέντος microRNA έως τρεις μέρες μετά το στεφανιαίο επεισόδιο και έξι μήνες μετά από αυτό. Η έκφρασή του ελέγχθηκε για τη συσχέτισή της με άλλους βιοδείκτες της ασθένειας, την εκδήλωση ενός δεύτερου εμφράγματος έως και έξι μήνες μετά το πρώτο επεισόδιο, καθώς και άλλους παράγοντες του περιβάλλοντος, όπως ο τρόπος ζωής των ασθενών.

Η εκπόνηση της εργασίας έγινε στο Εργαστήριο Βιολογίας - Βιοχημείας - Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών, στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Αθηνών, στο Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής σε συνεργασία με το Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Νοσοκομείου Παιδών «Αγία Σοφία» του Τμήματος της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η καρδιά αποτελεί ένα πολύ σημαντικό όργανο του ανθρώπινου σώματος, το οποίο τροφοδοτεί ένα γιγαντιαίο σύστημα με αίμα και η λειτουργία της ξεκινά ήδη από την έκτη εβδομάδα της εγκυμοσύνης. Η ανατομία της καρδιάς και η νεύρωση της έχουν εξελιχθεί έτσι ώστε να επιτευχθεί το δύσκολο αυτό έργο της.

Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, η φυσική επιλογή έχει οδηγήσει σε θετικά αποτελέσματα για τη λειτουργία της καρδιάς, ωστόσο η κόπωση είναι παράγοντας που οδηγεί στη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα, ώστε τα προβλήματα καρδιακής λειτουργίας να κατέχουν την πρωταρχική θέση παγκοσμίως.

Υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που συμβάλλουν στην εμφάνιση των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Αυτοί οι παράγοντες θα μπορούσαν να διακριθούν σε τροποποιήσιμους και μη τροποποιήσιμους, ενώ ένας άλλος διαχωρισμός θα μπορούσε να είναι αυτός των περιβαλλοντικών, επιγενετικών και γενετικών παραγόντων. Πολλοί περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η κοινωνική θέση, το άγχος, η διατροφή, το κάπνισμα, η άσκηση και πολλοί βιοχημικοί δείκτες, οι οποίοι συνδέονται με προβλήματα της καρδιάς έχουν εξακριβωθεί. Ωστόσο, συνολικά η επιγενετική και η γενετική συσχέτιση με τη νόσο είναι πιο δύσκολο να συγκεκριμενοποιηθούν.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα τελευταία χρόνια αρκετές έρευνες έχουν διεξαχθεί με σκοπό τη μελέτη του ρόλου των microRNAs, μικρών non-coding RNAs, σε διάφορες ασθένειες. Αν και τα μόρια αυτά δεν έχουν ακόμα εισαχθεί στην κλινική πράξη, αποτελούν υποψήφιους βιοδείκτες για διάφορες νόσους μεταξύ των οποίων και της καρδιαγγειακής νόσου.

1.1 Ανασκόπηση της λειτουργίας του καρδιαγγειακού συστήματος

Η βασική λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος είναι η προμήθεια των ιστών με θρεπτικές ουσίες και η απομάκρυνση τελικών προϊόντων μεταβολισμού από αυτούς, μέσω της ροής του αίματος. Το αίμα ρέει μέσα στα αιμοφόρα αγγεία σε όλο το σώμα εξαιτίας της πίεσης που δημιουργείται από τη λειτουργία της καρδιάς ως αντλία. Τα αιμοφόρα αγγεία διακλαδίζονται σε μικρότερες διακλαδώσεις, τα τριχοειδή. Σε κάθε δεδομένη στιγμή περίπου το 5% του συνολικού αίματος που κυκλοφορεί, ρέει μέσω των τριχοειδών και είναι αρκετό αυτό το ποσοστό, ώστε να εκτελεστεί η βασική αυτή λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος.

Σύμφωνα με το Βρετανό φυσιολόγο William Harvey το καρδιαγγειακό σύστημα σχηματίζει έναν κύκλο. Υπάρχουν δύο κυκλώματα τα οποία ξεκινούν από την καρδιά και καταλήγουν πίσω σε αυτή. Στο ένα από αυτά τα κυκλώματα, την πνευμονική κυκλοφορία, το αίμα αντλείται από τη δεξιά κοιλία, κατόπιν φτάνει στους πνεύμονες και μετά στον αριστερό κόλπο. Στο συστηματικό κύκλωμα το αίμα από την αριστερή κοιλία περνά διαμέσου όλων των ιστών εκτός από τους πνεύμονες και επιστρέφει στην καρδιά καταλήγοντας στο δεξιό κόλπο. Οι αρτηρίες είναι τα αγγεία εκείνα τα οποία μεταφέρουν αίμα από την καρδιά, ενώ οι φλέβες μεταφέρουν το αίμα προς την καρδιά.

Στη συστηματική κυκλοφορία το αίμα αντλείται από την καρδιά μέσω μιας μεγάλης αρτηρίας της αορτής, από την οποία ξεκινούν οι συστηματικές αρτηρίες, οι οποίες διακλαδίζονται σε αρτηρίδια κι αυτά με τη σειρά τους στα τριχοειδή τα οποία συνενώνονται και δίνουν τα φλεβίδια. Στην πνευμονική κυκλοφορία το αίμα ξεκινά από τη δεξιά κοιλία μέσω μιας άλλης μεγάλης αρτηρίας του πνευμονικού στελέχους, το οποίο διαιρείται σε δύο πνευμονικές αρτηρίες που καθεμία προμηθεύει τον αριστερό και δεξή πνεύμονα αντίστοιχα. Στους

πνεύμονες οι αρτηρίες διακλαδίζονται δίνοντας τα τριχοειδή τα οποία συνενώνονται δίνοντας τα φλεβίδια και κατόπιν τις φλέβες. Οι φλέβες οδηγούν το αίμα από τους πνεύμονες στον αριστερό κόλπο.

Ο καρδιακός κύκλος χωρίζεται στη συστολή (κοιλιακή συστολή) και τη διαστολή (κοιλιακή χάλαση). Προκειμένου να ξεκινήσει η συστολή, δυναμικά ενέργειας πρέπει να δημιουργηθούν από τα μυοκαρδιακά κύτταρα. Κατά την έναρξη της συστολής η πίεση των κοιλιών υπερβαίνει γρήγορα την κολπική πίεση και οι κολποκοιλιακές βαλβίδες κλείνουν. Η εξώθηση του αίματος από τις κοιλίες γίνεται όταν η κοιλιακή πίεση υπερβαίνει την πίεση της αορτής και του πνευμονικού στελέχους. Κατόπιν η κοιλιακή πίεση είναι χαμηλότερη σε σχέση με αυτή της αορτής και της πνευμονικής αρτηρίας και τότε η πνευμονική και η αορτική βαλβίδα κλείνουν. Όταν η κοιλιακή πίεση γίνει μικρότερη από την πίεση των κόλπων τότε οι κολποκοιλιακές βαλβίδες ανοίγουν και αρχίζει η φάση της διαστολής και ακολουθεί η πλήρωση των αρτηριών, η οποία συμβαίνει πολύ γρήγορα έτσι ώστε η συστολή των κόλπων που συντελείται στο τέλος της διαστολής να προσθέτει μία πολύ μικρή ποσότητα αίματος στις κοιλίες. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι οι αρτηρίες είναι αυτές που λειτουργούν ως αγωγοί χαμηλών αντιστάσεων και ως δεξαμενές πίεσης για τη διατήρηση της αιματικής ροής στους ιστούς κατά τη χάλαση των κοιλιών. Η μέγιστη αρτηριακή πίεση είναι η συστολική πίεση, ενώ η λεγόμενη «μικρή πίεση» είναι η διαστολική. Τέλος να σημειωθεί ότι όλες οι αλλαγές των πιέσεων είναι οι όμοιες και στα δύο κυκλώματα, αλλά στην πνευμονική κυκλοφορία η πίεση έχει χαμηλότερες τιμές. [1]

1.2 Καρδιαγγειακά νοσήματα

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα (ΚΝ) είναι μια ευρεία ομάδα παθήσεων της καρδιάς και των αγγείων με κυριότερη εκπρόσωπο την στεφανιαία νόσο (ΣΝ). Τα καρδιαγγειακά νοσήματα (ΚΝ) αποτελούν πρωταρχική αιτία θανάτου παγκοσμίως, καθώς περισσότεροι άνθρωποι πεθαίνουν κάθε χρόνο από καρδιαγγειακές παθήσεις, παρά από οποιαδήποτε άλλη αιτία. Σύμφωνα με τα στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization, WHO) υπολογίζεται ότι 17,5 εκατομμύρια άνθρωποι απεβίωσαν από κάποιο καρδιαγγειακό νόσημα το 2012, αντιπροσωπεύοντας το 31% όλων των θανάτων παγκοσμίως. Από αυτούς τους θανάτους, εκτιμάται ότι περίπου 7,4 εκατομμύρια ήταν λόγω της ΣΝ και 6,7 εκατομμύρια θάνατοι οφείλονταν σε εγκεφαλικό επεισόδιο.

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα περιλαμβάνουν τις διαταραχές της καρδιάς και των αιμοφόρων αγγείων και τις αγγειακές παθήσεις του εγκεφάλου. Οι καρδιαγγειακές παθήσεις οφείλονται κυρίως στην αθηροσκλήρωση και περιλαμβάνουν την ισχαιμική καρδιοπάθεια, τη στεφανιαία νόσο (καρδιακή προσβολή), την αγγειακή εγκεφαλική νόσο (εγκεφαλικό επεισόδιο), την ασθένεια της αορτής και των αρτηριών, συμπεριλαμβανομένης της υπέρτασης και της περιφερικής αρτηριακής νόσου. Άλλα καρδιαγγειακά νοσήματα είναι οι συγγενείς καρδιακές παθήσεις (δυσπλασίες καρδιακής δομής), ρευματικές καρδιακές παθήσεις, καρδιομυοπάθειες και καρδιακές αρρυθμίες. [2]

Σύμφωνα με την Αμερικανική Ένωση Καρδιολογίας (American Heart Association, AHA), τα ποσοστά θανάτων από τα καρδιαγγειακά νοσήματα μειώθηκαν κατά 30,8%, από το 2001 έως το 2012. Ωστόσο, το 2011, ένας θάνατος από καρδιαγγειακά νοσήματα λαμβάνει χώρα κάθε 40 δευτερόλεπτα. Κατά τη διάρκεια του ίδιου έτους, η άμεση και έμμεση οικονομική επιβάρυνση της καρδιαγγειακής νόσου είναι τεράστια και αντιπροσωπεύει το 15% των συνολικών δαπανών για την υγεία. Σε απόλυτους αριθμούς, τα 320,1 δισεκατομμύρια δολάρια είναι το εκτιμώμενο κόστος της καρδιαγγειακής νόσου και του εγκεφαλικού επεισοδίου στις ΗΠΑ. [3]

Από τις παθήσεις του καρδιαγγειακού συστήματος η στεφανιαία νόσος (ΣΝ) καθώς και το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (ΑΕΕ), αποτελούν τις κύριες αιτίες θανάτου τόσο στον αναπτυγμένο, όσο και στον αναπτυσσόμενο κόσμο. Τις τελευταίες δεκαετίες πολλές διεθνείς επιδημιολογικές μελέτες έχουν διερευνήσει το αιτιολογικό σύμπλεγμα των καρδιαγγειακών νοσημάτων, αναδεικνύοντας διάφορους παράγοντες κινδύνου, όπως η ανθυγιεινή διατροφή, η παχυσαρκία, τα αυξημένα επίπεδα λιπιδίων, η αρτηριακή υπέρταση, ο σακχαρώδης διαβήτης, η έλλειψη φυσικής άσκησης, το ψυχοκοινωνικό άγχος και η κατάθλιψη, καθώς επίσης και το χαμηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο των ανθρώπων. Παράλληλα αρκετοί φλεγμονώδεις παράγοντες έχουν μελετηθεί και αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως προγνωστικοί δείκτες για αρκετές κατηγορίες των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Πρέπει να σημειωθεί ωστόσο, ότι δεν έχουν διερευνηθεί στον ίδιο βαθμό οι γενετικοί δείκτες (DNA/RNA βιοδείκτες αίματος) που συνδέονται με τα νοσήματα. [4]

1.3 Επιδημιολογία και Καρδιαγγειακή Νόσος

Η καρδιαγγειακή επιδημιολογία επικεντρώνεται στην καταγραφή της επίπτωσης και της επικράτησης της καρδιαγγειακής νόσου σε διάφορους πληθυσμούς, ενώ μελετά επίσης και τους παράγοντες που συμβάλλουν στην εμφάνιση της νόσου. Αξίζει να σημειωθεί ότι η πρόοδος στη σύγχρονη καρδιολογία οφείλεται σε μεγάλο ποσοστό σε ευρήματα ερευνών που αφορούν την επιδημιολογία των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Η έντονη ανάπτυξη της βιοστατιστικής επιστήμης έχει στρέψει το ενδιαφέρον των επιδημιολόγων στην εκτίμηση μοντέλων πρόβλεψης. [5]

1.3.1 Παγκόσμια επιδημιολογικά δεδομένα της νόσου

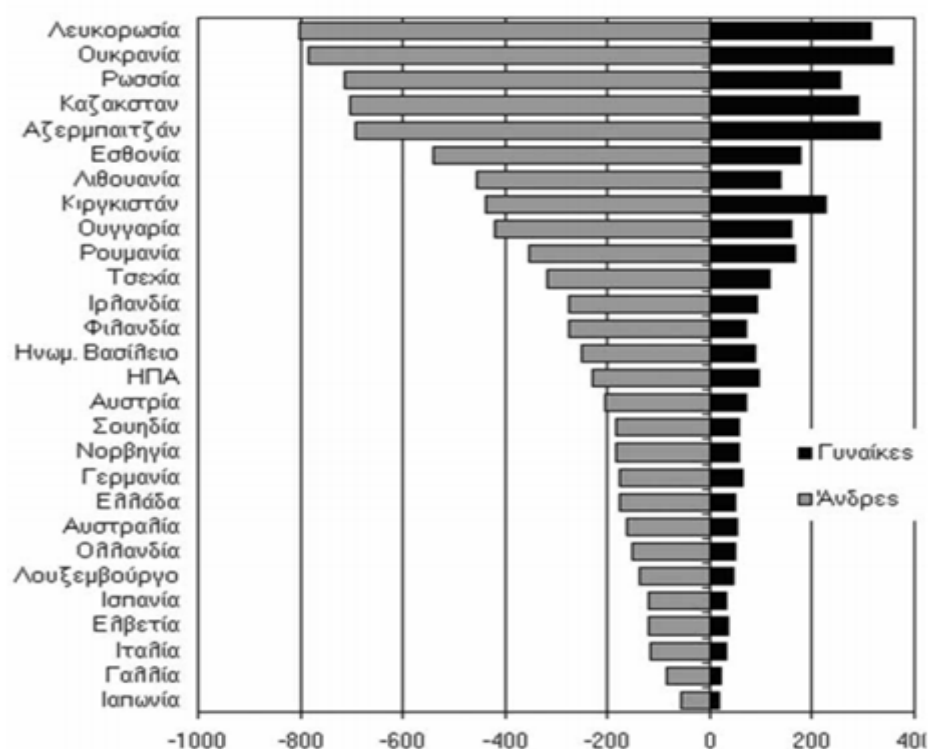
Η αθηροσκληρωτική νόσος αποτελεί πρωταρχική αιτία θανάτου και αρκετές επιδημιολογικές έρευνες έχουν διεξαχθεί με σκοπό τη μελέτη των παραγόντων αλλά και των επιπτώσεων της νόσου. Η πρώτη επιδημιολογική έρευνα για τη στεφανιαία νόσο πραγματοποιήθηκε στη Μινεσότα το 1946, στην οποία συμμετείχαν 281 άντρες ηλικίας κάτω από 55 ετών. Η συγκεκριμένη μελέτη άνοιξε το δρόμο για τη διεξαγωγή πολλών άλλων ερευνών.

Μία ιδιαίτερα σημαντική επιδημιολογική έρευνα ξεκίνησε το 1948 στη Μασαχουσέτη. Η Framingham Heart Study (FHS) περιλάμβανε αρχικά 5.209 συμμετέχοντες και συνέβαλε σημαντικά στην αποκάλυψη νέων παραγόντων κινδύνου της στεφανιαίας νόσου. Συγκεκριμένα η έρευνα κατέδειξε ότι παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο, το κάπνισμα, η χοληστερόλη του αίματος, η υπέρταση και ο διαβήτης σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου. Επιπλέον η μελέτη οδήγησε στη συσχέτιση της νόσου και με γενετικούς παράγοντες. Έτσι, στα πλαίσια αυτής της έρευνας περιγράφηκε για πρώτη φορά η συνύπαρξη πολλών παραγόντων, οι οποίοι συμβάλλουν στον κίνδυνο εμφάνισης της στεφανιαίας νόσου. Αξίζει να σημειωθεί ότι η FHS οδήγησε στην ανάπτυξη ενός προτύπου πρόγνωσης της στεφανιαίας νόσου, γνωστό ως Framingham score.

Η Έρευνα των Επτά Χωρών (Seven Countries Study, SCS), η οποία πραγματοποιήθηκε το 1958 συνέβαλε επίσης σημαντικά στη μελέτη διαφόρων παραγόντων της στεφανιαίας νόσου. Η συγκεκριμένη έρευνα συμπεριέλαβε 16 υπό-πληθυσμούς, οι οποίοι εξετάστηκαν κάτω από συγκεκριμένες οδηγίες της επιστημονικής ομάδας για πολλά έτη. Η έρευνα οδήγησε στην εξαγωγή σημαντικών συμπερασμάτων που αφορούσαν τις παρατηρηθείσες διαφορές τόσο στη συχνότητα της εμφάνισης της νόσου, όσο και στον κίνδυνο εκδήλωσης της υπό τη συμβολή διαφόρων παραγόντων, όπως η διατροφή και ο τρόπος ζωής.

Το 1979 ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας ανέπτυξε το έργο MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease), το οποίο στηρίχθηκε στις μελέτες Seven Countries Study (SCS) και Framingham Heart Study (FHS), στις μεθόδους έρευνας καρδιαγγειακών νοσημάτων και στο Ευρωπαϊκό Μητρώο που αφορούσε την εκδήλωση περιστατικών εμφράγματος του μυοκαρδίου. Το έργο επικεντρώθηκε στη μελέτη της νοσηρότητας και της θνησιμότητας της νόσου σε διαφορετικούς πληθυσμούς και διήρκεσε δέκα χρόνια. Στα πλαίσια της συγκεκριμένης έρευνας φάνηκε ότι η νοσηρότητα και η θνησιμότητα της νόσου ποικίλουν από πληθυσμό σε πληθυσμό. Η ανδρική καρδιαγγειακή θνησιμότητα ήταν μεταβλητή από 500/100000 άτομα στη Φινλανδία σε 200/100000 στις ΗΠΑ, σε 110/100000 στη Μεγάλη Βρετανία και σε 50/100000 στο Πεκίνο. Επιπλέον, αν και οι θάνατοι από καρδιαγγειακή νόσο υποδιπλασιάστηκαν στις ΗΠΑ κατά τα έτη 1950-1980, το 2010 ήταν συχνότεροι στον πληθυσμό το 2010. Αξίζει να σημειωθεί ότι μια προβολή για το έτος 2020 του προγνωστικού μοντέλου Global Burden of Disease, δίνει σαφώς το προβάδισμα, σαν αιτία θανάτου, στις νόσους της καρδιάς για τους πληθυσμούς του ανεπτυγμένου κόσμου. [6]

Το παρακάτω γράφημα απεικονίζει το ρυθμό θανάτου από στεφανιαία νόσο το 1999 σε άνδρες και γυναίκες ηλικίας 35-74 ετών σε επιλεγμένες χώρες. [7]



Σχήμα 1: Ρυθμός θανάτου από τη στεφανιαία νόσο σε άνδρες και γυναίκες ηλικίας 5-74 ετών. [7]

Διεθνείς επιδημιολογικές έρευνες συνέβαλαν σημαντικά στην πρόγνωση της καρδιαγγειακής νόσου. Η έρευνα Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM), διεξήχθη το 1979 και συμπεριλάμβανε άτομα γερμανικής καταγωγής. Οι βασικοί στόχοι της έρευνας ήταν η μελέτη των παραγόντων κινδύνου εκδήλωσης της νόσου καθώς και η πρόγνωσή της. Από τη

συγκεκριμένη μελέτη προέκυψε ένα σύστημα υπολογισμού του σκορ καρδιαγγειακού κινδύνου. [8]

Μία ακόμη σημαντική μελέτη ήταν η PREvención con Dieta MEDiterránea (PREDIMED), η οποία διεξήχθη στην Ισπανία το 2003. Η συγκεκριμένη έρευνα κατέδειξε ότι η μεσογειακή διατροφή αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την πρόγνωση της καρδιαγγειακής νόσου και το επιπλέον ελαιόλαδο συμβάλλει στη μείωση εμφάνισης της νόσου. [9]

1.3.2 Επιδημιολογικά δεδομένα της νόσου στην Ελλάδα

Στην Ελλάδα η πρώτη έρευνα που διεξήχθη με σκοπό τη μελέτη της στεφανιαίας νόσου συμπεριλάμβανε άντρες κατοίκους ορεινών χωριών της Κρήτης και της Κέρκυρας. Η διατροφή των συμμετεχόντων στηριζόταν στο μεσογειακό πρότυπο. Από τη μελέτη προέκυψε ότι η μεσογειακή διατροφή συνδέεται με χαμηλό ποσοστό εμφάνισης και θνησιμότητας της καρδιαγγειακής νόσου. Αν και το δείγμα δεν ήταν αντιπροσωπευτικό, η συγκεκριμένη έρευνα κατέδειξε επίσης την επικράτηση παραγόντων κινδύνου, οι οποίοι συμβάλλουν στην εκδήλωση της νόσου. [10]

Το 2000 διεξήχθη μία πολυκεντρική μελέτη η CARDIO2000, κατά την οποία εξετάστηκαν αρκετοί παράγοντες ως προς τη συσχέτισή τους με τη στεφανιαία νόσο. Η έρευνα συμπεριλάμβανε 1014 τυχαία δείγματα με πρώτη εκδήλωση της στεφανιαίας νόσου και 1117 μάρτυρες. Το πιο σημαντικό αποτέλεσμα της μελέτης ήταν το γεγονός ότι η υπερλιπιδαιμία, η υπέρταση, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (ΣΔ2), το οικογενειακό ιστορικό και ο καθιστικός τρόπος ζωής αυξάνουν την συχνότητα εμφάνισης της νόσου. Από την άλλη πλευρά, η προσήλωση στο μεσογειακό πρότυπο διατροφής και το υψηλό εκπαιδευτικό επίπεδο διαδραματίζουν προστατευτικό ρόλο στη στεφανιαία νόσο. [11]

Στις αρχές του 2001 ξεκίνησε μία πολύ σημαντική έρευνα για την καρδιαγγειακή νόσο, η ATTICA. Η μελέτη διεξήχθη στην Αθήνα, συμπεριλαμβανομένων 3042 ενηλίκων από αστικές και αγροτικές περιοχές (78% και 22% αντίστοιχα). Οι κύριοι στόχοι της μελέτης της ATTICA ήταν η μέτρηση της επικράτησης των παραγόντων κινδύνου της καρδιαγγειακής νόσου σε αντιπροσωπευτικό ελληνικό δείγμα και η εκτίμηση της προγνωστικής τους σημασίας μέσω των επακόλουθων εξετάσεων. Κατόπιν πενταετούς παρακολούθησης των ασθενών, η έρευνα κατέδειξε αύξηση του κινδύνου εκδήλωσης της καρδιαγγειακής νόσου στον ελληνικό πληθυσμό κι αυτό επιβεβαιώθηκε κατόπιν παρακολούθησης έως και δέκα έτη. Τα αποτελέσματα της μελέτης, αν και δεν μπορούν να γενικευθούν σε ολόκληρη τη χώρα, ενδεχομένως να υποδηλώνουν ότι η Ελλάδα είναι πλέον μια χώρα με υψηλά ποσοστά επίπτωσης και θνησιμότητας των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Η μελέτη της ATTICA παραμένει μία από τις σημαντικότερες έρευνες υγείας και διατροφής στην νόσο, η οποία διεξήχθη στον ελληνικό πληθυσμό. [12]

1.4 Παθοφυσιολογία και κλινική εκδήλωση της καρδιαγγειακής νόσου

Η βασική αιτία εμφάνισης της στεφανιαίας νόσου είναι η αθηρωμάτωση. Αθηρωμάτωση (αθηροσκλήρωση), είναι η δημιουργία πλάκας στα εσωτερικά τοιχώματα του αρτηριακού δικτύου με αποτέλεσμα την σταδιακή νέκρωση του εσωτερικού τους χιτώνα (ενδοθήλιο), την απώλεια της ελαστικότητας των αγγείων και την μείωση του εύρους του αγγειακού αυλού. Χαρακτηρίζεται ως νόσος των ανεπτυγμένων χωρών δεδομένου ότι συνδέεται άμεσα με τον σύγχρονο τρόπο ζωής και διατροφής στις χώρες αυτές. Η αθηρωμάτωση αποτελεί την βασική αιτία εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων, όπως

έμφραγμα και στηθάγχη. Η αθηρωμάτωση δεν επηρεάζει μόνο τα αγγεία της καρδιάς, όπως είναι γενικότερα γνωστό, αλλά επηρεάζει το σύνολο των αγγείων του σώματος και προκαλεί, ανάλογα με τα σημεία που έχουν υποστεί τις αθηρωματικές αλλοιώσεις, αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, διαλείπουσα χωλότητα, πόνο στα πόδια με το περπάτημα ακόμη και στυτική δυσλειτουργία.

Το χαρακτηριστικό γνώρισμα της αθηροσκλήρωσης είναι η συσσώρευση χοληστερόλης στο αρτηριακό τοίχωμα. Η συσσώρευση χοληστερόλης στον εσωτερικό χιτώνα των αρτηριών ξεκινά με την στρατολόγηση μονοκυττάρων από το αίμα. Τα μονοκύτταρα εισέρχονται στον εσωτερικό χιτώνα μέσω μορίων προσκόλλησης, όπου διαφοροποιούνται σε μακροφάγα. Τα μακροφάγα φέρουν τους ονομαζόμενους υποδοχείς αποκάθαρσης, στους οποίους συνδέεται και κατόπιν εσωτερικεύεται η κακή χοληστερόλη LDL, ιδίως στην οξειδωμένη μορφή της. Τα μακροφάγα φορτίζονται με χοληστερόλη και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα. Η συσσώρευση των αφρώδων κυττάρων στον έσω χιτώνα αποτελεί ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα της πλάκας. Τα κύτταρα αυτά ενδέχεται να υποστούν κυτταρικό θάνατο και ρήξη, οπότε η εξωκυτταρική χοληστερόλη συσσωρεύεται στην πλάκα. [13]

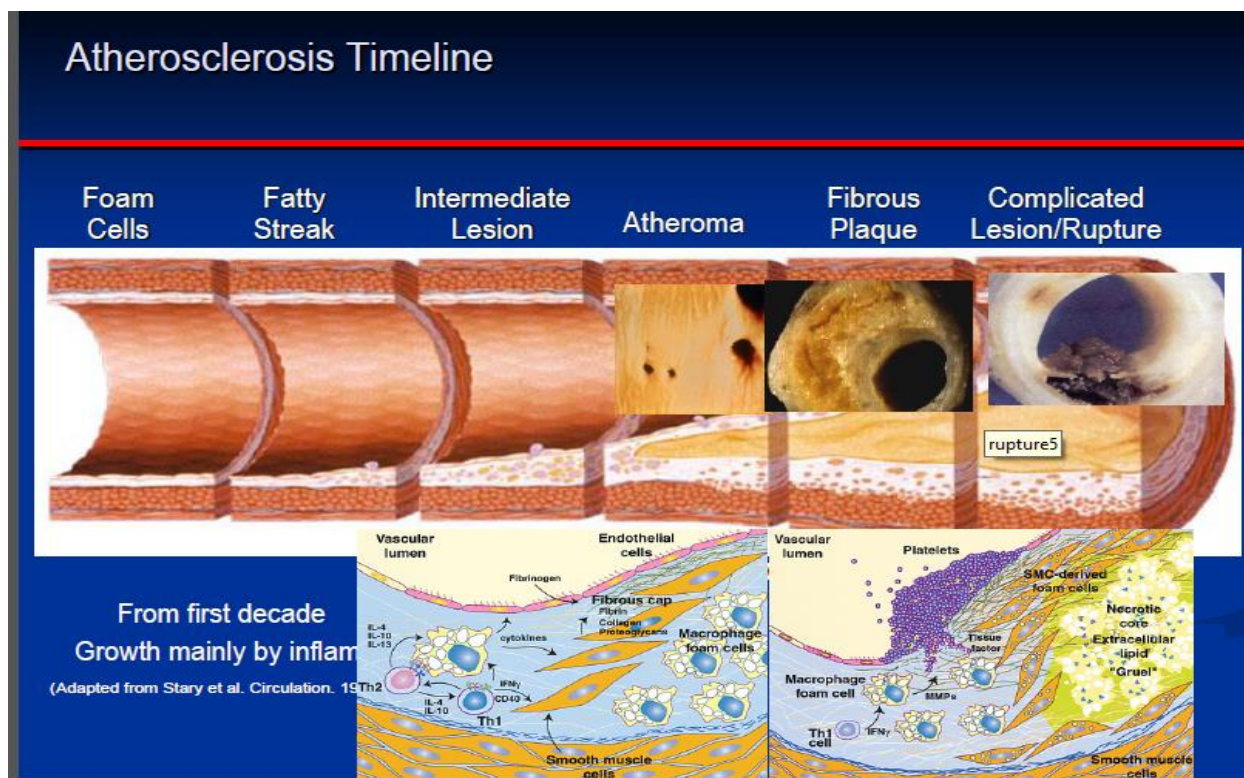
Οι αθηροσκληρωτικές βλάβες αναπτύσσονται στον εσωτερικό χιτώνα. Η αρχική βλάβη είναι η ονομαζόμενη λιπώδης γράμμωση, που εμφανίζεται στην παιδική ηλικία και αποτελείται κυρίως από μακροφάγα φορτισμένα με χοληστερόλη. Οι προχωρημένες αθηρωματικές βλάβες ονομάζονται ινώδεις πλάκες. Τα λιπίδια που επικρατούν σε αυτές τις πλάκες είναι η εστεροποιημένη και η ελεύθερη χοληστερόλη. Η πλάκα περιβάλλεται από μία ινώδη κάψα, που περιέχει λεία μυϊκά κύτταρα, μακροφάγα και T-λεμφοκύτταρα. Οι ινώδεις πλάκες προβάλλουν προς τον αυλό και μπορεί να εμποδίζουν τη ροή του αίματος.

Η διαδικασία της αθηροσκλήρωσης διακρίνεται γενικά σε τρεις φάσεις. Κατά τη Φάση I της αθηροσκλήρωσης (λιπώδεις γραμμώσεις) τα λιπώδη κύτταρα αυτοκαταστρέφονται και νεκρώνονται. Τα νεκρά λιπώδη κύτταρα αποτελούν ερεθίσματα για τον οργανισμό, ο οποίος πλέον προσπαθεί να αυτοπροστατευθεί. Τα μακροφάγα και τα λεία μυϊκά κύτταρα μεταναστεύουν προς τον αυλό του αγγείου, όπου εγκαθίστανται κάτω από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και πολλαπλασιάζονται.

Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, το ενδοθήλιο σταδιακά να προβάλλει μέσα στον αυλό και έτσι να χάνει την λεία του επιφάνεια. Αυτή η συνεχιζόμενη διαδικασία είναι γνωστή ως νεοενδοθηλίωση και αποτελεί τη φάση II. Ο αγγειακός αυλός στενεύει και παρακωλύεται η ροή του αίματος, η οποία καθίσταται στροβιλώδης και ερεθίζει το ενδοθήλιο. Εν τω μεταξύ, μειώνεται η αγγειακή ελαστικότητα, διατηρείται η υπέρταση και έτσι η καρδιά και τα αγγεία αποκτούν μεγαλύτερο φορτίο, μία κατάσταση γνωστή ως υπερτροφία καρδιάς, καθώς ο καρδιακός μυς αυξάνεται σε μέγεθος. Η αυξημένη διαταραχή στα αγγεία είναι γνωστή σαν αθηροσκλήρωση και καταλήγει σε βλάβη του οργάνου στόχου από την ισχαιμία και τον θρομβοεμβολισμό κατά τη φάση III.

Ο τραυματισμός του ενδοθελίου με τη συγκέντρωση των αιμοπεταλίων ή τη νέκρωση των μακροφάγων προάγει τον πολλαπλασιασμό των μονοκυττάρων και των λείων μυϊκών κυττάρων που μεταναστεύουν στην περιοχή της βλάβης. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται για πολλά χρόνια λόγω της μόνιμης μηχανικής φόρτισης που δέχεται το ενδοθήλιο, ή της λιπιδαιμικής φόρτισης. [14]

Η παρακάτω εικόνα παρουσιάζει συνοπτικά τα στάδια της αθηροσκλήρωσης.



Εικόνα 1: Στάδια της διαδικασίας της αθηροσκλήρωσης [15]

Η κλινική εικόνα της στεφανιαίας νόσου ποικίλει από την περίοδο χωρίς συμπτώματα μέχρι και τον αιφνίδιο θάνατο. Πιο συγκεκριμένα η νόσος εκδηλώνεται με τους εξής τρόπους:

1. Η περίοδος χωρίς συμπτώματα
2. Η σταθερή στηθάγχη
3. Η ασταθής στηθάγχη
4. Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου
5. Ο αιφνίδιος καρδιακός θάνατος

Η ασταθής στηθάγχη, το έμφραγμα και ο αιφνίδιος θάνατος περιλαμβάνονται στα οξέα στεφανιαία σύνδρομα. Στις περιπτώσεις αυτές η διαδικασία της αύξησης μιας αθηρωματικής πλάκας δεν οδεύει με βαθμιαία βήματα, αλλά με θορυβώδη άλματα και μια προϋπάρχουσα στένωση μπορεί να αποτελέσει το υπόβαθρο για πλήρη, ή σχεδόν πλήρη, απόφραξη του αγγείου με δημιουργία θρόμβου.

Πιο αναλυτικά:

1. Η περίοδος χωρίς συμπτώματα

Στην περίοδο χωρίς συμπτώματα, συνήθως υπάρχει κάποιος βαθμός στένωσης των στεφανιαίων αγγείων, όχι όμως σε τέτοιο βαθμό που να μην μπορεί να εξασφαλιστεί ικανοποιητική παροχή οξυγόνου στο μυοκάρδιο, ακόμα και σε συνθήκες αυξημένων απαιτήσεων, όπως η έντονη σωματική κόπωση. Σε αυτό το στάδιο όπως προαναφέρθηκε δεν υπάρχει εμφανή συμπτωματολογία και μοιραία θα εμφανιστούν οι βαθύτερες κλινικές μορφές της νόσου, αν δεν υπάρξει τροποποίηση των προδιαθεσιακών παραγόντων.

2. Η σταθερή στηθάγχη

Η σταθερή στηθάγχη χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση θωρακικού άλγους(στηθάγχης) κατά προβλέψιμο τρόπο. Συγκεκριμένα, το στηθαγχικό ενόχλημα εμφανίζεται κάθε φορά μετά από δεδομένη προσπάθεια, π.χ. μετά από ορισμένη απόσταση βάδισης. Βέβαια, με την πάροδο του χρόνου τα συμπτώματα επιδεινώνονται, γιατί η αρτηριοσκληρυντική πλάκα που στενεύει τον αγγειακό αυλό επεκτείνεται και εφόσον δεν υπάρξει αποφασιστική αντιμετώπιση των παραγόντων που ευθύνονται για την ανάπτυξη της αρτηριοσκληρυνσης, μετά από κάποια χρονική περίοδο η στενωμένη αρτηρία θα αποφραχθεί. Η σταθερή στηθάγχη γενικά αποτελεί μία σχετικά καλοήγη κλινική κατάσταση και αυτό διότι προειδοποιεί τον πάσχοντα και δεδομένου ότι εξελίσσεται αργά, προσφέρει τη δυνατότητα για την επιλογή και την εφαρμογή της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής. [16]

3. Η ασταθής στηθάγχη

Η ασταθής στηθάγχη αποτελεί μια πιο επικίνδυνη μορφή στεφανιαίας νόσου, γι' αυτό και έχει χαρακτηριστεί προεμφραγματική στηθάγχη. Το σύμπτωμα με το οποίο εκδηλώνεται είναι το κλασικό στηθαγχικό ενόχλημα, το οποίο όμως, δεν είναι προβλέψιμο, αλλά μπορεί να εμφανίζεται ανεξάρτητα από τη σωματική προσπάθεια, π.χ. στην ηρεμία ή ακόμη και να ξυπνάει τον ασθενή. Στην ασταθή στηθάγχη το εύρος του αγγειακού αυλού,μειώνεται απότομα σε αντίθεση με την προοδευτική ελάττωση που παρατηρείται κατά τη σταθερή στηθάγχη. Η αιφνίδια αυτή ελάττωση οφείλεται στη ρήξη της αρτηριοσκληρυντικής πλάκας, πάνω στην οποία επικάθεται ένα πήγμα αίματος με αποτέλεσμα τη δημιουργία θρόμβου. Το φαινόμενο αυτό οδηγεί σε στένωση υψηλού βαθμού.Είναι σαφές ότι μία τέτοια ασταθής κατάσταση πρέπει να αντιμετωπίζεται με εισαγωγή σε νοσοκομείο, ώστε με τη χορήγηση της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής να δοθεί η ευκαιρία στη «σπασμένη» αρτηριοσκληρυντική πλάκα να επουλωθεί και να αποφευχθεί η ανεπιθύμητη εξέλιξη προς έμφραγμα του μυοκαρδίου. [17]

4. Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου(OEM)

Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου μπορεί να οριστεί με βάση διάφορα κλινικά, ηλεκτροκαρδιογραφικά, βιοχημικά και παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά. Το έμφραγμα του μυοκαρδίου είναι διακοπή οξυγόνου συγκεκριμένου τμήματος,η οποία προκαλεί νέκρωση του καρδιακού μυός. Είναι η πιο συχνή μορφή της στεφανιαίας νόσου. [18]

Βασική αιτία του εμφράγματος θεωρείται η οξεία θρόμβωση των στεφανιαίων αρτηριών από ρήξη αθηροσκληρυντικής πλάκας ή σπανιότερα διάβρωση του ενδοθηλίου της. Πολύ πιο σπάνια η απόφραξη μπορεί να οφείλεται σε παρατεταμένο σπασμό των στεφανιαίων αρτηριών. Η διερεύνηση της διάγνωσης για OEM απαιτεί τον έλεγχο βιοχημικών δεικτών, όπως η τροπονίνη, ηλεκτροκαρδιογράφημα και υπερηχογράφημα.Τα κριτήρια της διάγνωσης εμφράγματος πληρούνται όταν παρατηρείται αύξηση ή και μείωση των καρδιακών βιοχημικών δεικτών, σε συνδυασμό με ένδειξη ισχαιμίας του μυοκαρδίου, μεταβολές στο ηλεκτροκαρδιογράφημα, απεικονιστικές ενδείξεις νέας απώλειας βιώσιμου μυοκαρδίου ή νέας ανώμαλης κίνησης περιφερικού τμήματος υπερηχογραφικά. Σύμφωνα με το ηλεκτροκαρδιογράφημα διακρίνονται δύο κατηγορίες εμφράγματος: το έμφραγμα του μυοκαρδίου χωρίς ανάρσπαση του ST (NSTEMI) και το έμφραγμα του μυοκαρδίου με ανάρσπαση του ST(STEMI). [19]

Υπάρχουν 4 είδη ασθενών με OEM ανάλογα με την καρδιακή παροχή και το πνευμονικό οίδημα:

- Φυσιολογική καρδιακή παροχή και απουσία πνευμονικού οιδήματος. Κανονική δραστηριότητα. Καλή εμφάνιση του ασθενούς ο οποίος δεν χρήζει θεραπείας για καρδιακή ανεπάρκεια.

- Φυσιολογική καρδιακή παροχή και πνευμονικό οίδημα: Συνήθως οφείλεται σε μέτριου βαθμού δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας. Ο ασθενής πρέπει να θεραπευτεί με διουρητικά και αγγειοδιασταλτικά φάρμακα.
- Μειωμένη καρδιακή παροχή και απουσία πνευμονικού οιδήματος: Συχνά οφείλεται σε συνδυασμό εμφράγματος της δεξιάς κοιλίας και υποογκαιμίας οφειλόμενης σε μειωμένη λήψη υγρών, εμέτους και απρόσφορη διουρητική αγωγή.
- Μειωμένη καρδιακή παροχή και πνευμονικό οίδημα: Συνήθως οφείλεται σε εκτεταμένη βλάβη της αριστερής κοιλίας και συνδυάζεται με πολύ φτωχή πρόγνωση. Ο ασθενής μπορεί να βοηθηθεί από τη χορήγηση διουρητικών, αγγειοδιασταλτικών και ινóτροπων παραγόντων.

5. Ο αιφνίδιος καρδιακός θάνατος

Ο αιφνίδιος καρδιακός θάνατος τέλος, αποτελεί την πλέον δραματική εκδήλωση από όλο το κλινικό φάσμα της στεφανιαίας νόσου. Αιφνίδιος καρδιακός θάνατος ορίζεται ο φυσικός θάνατος που επέρχεται εντός μίας ώρας από την εμφάνιση των οξέων συμπτωμάτων. Η Στεφανιαία νόσος (ΣΝ) αποτελεί την πιο συχνή αιτία αιφνίδιου θανάτου σε ασθενείς άνω των 35 ετών. [20]

1.5 Παράγοντες κινδύνου της καρδιαγγειακής νόσου

Η καρδιαγγειακή νόσος είναι μία πολυπαραγοντική νόσος και πολλοί παράγοντες προδιάθεσης περιλαμβάνονται στο αιτιολογικό της σκέλος. Από τους παράγοντες αυτούς ο καθένας συμμετέχει στη δημιουργία του συνολικού καρδιαγγειακού κινδύνου. Όσον αφορά την ομαδοποίηση και την κατάταξη των παραγόντων αυτών, η επικρατέστερη άποψη αφορά στην ταξινόμησή τους σε τροποποιήσιμους και μη τροποποιήσιμους παράγοντες.

1.5.1 Μη τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου της καρδιαγγειακής νόσου

1. Ηλικία

Η νοσηρότητα και η θνητότητα της στεφανιαίας νόσου αυξάνουν με την πάροδο της ηλικίας. Οι περισσότεροι θάνατοι που οφείλονται στη νόσο αφορούν ηλικίες άνω των 65 ετών. Συγκεκριμένα άνδρες ηλικίας μεγαλύτερης των 55 ετών και γυναίκες μεγαλύτερες των 65 ετών θεωρείται ότι βρίσκονται σε μεγαλύτερο κίνδυνο για την εκδήλωση της στεφανιαίας νόσου. Στο γυναικείο φύλο η διαφοροποίηση αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι τα οιστρογόνα, τα οποία δρουν προστατευτικά για την καρδιά, μειώνονται κατά την εμμηνόπαυση με αποτέλεσμα η γυναίκα να είναι πιο ευάλωτη στις παθήσεις της καρδιάς. [21]

2. Φύλο

Η στεφανιαία νόσος εκδηλώνεται πιο συχνά σε άντρες, ωστόσο αποτελεί κυρίαρχη αιτία θανάτου και στα δύο φύλα. Το 1/3 των θανάτων στις γυναίκες παγκοσμίως, οφείλεται στη νόσο. Σύμφωνα με πρόσφατα στοιχεία της Αμερικανικής Καρδιολογικής Εταιρείας, οι άνδρες φαίνεται να διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου ακόμα και από εκείνες τις γυναίκες, στις οποίες έχει επέλθει η εμμηνόπαυση. Η μελέτη CARDIOL 2000 αφορούσε τον έλεγχο διαφοροποιήσεων ως προς το φύλο και περιλάμβανε 748 ασθενείς που εισήχθησαν στο νοσοκομείο εκδηλώνοντας για πρώτη φορά οξύ στεφανιαίο επεισόδιο. Τα αποτελέσματα της μελέτης κατέδειξαν για τον ελληνικό πληθυσμό ότι ο λόγος των συχνотήτων μεταξύ ανδρών και γυναικών στο τυχαίο επιλεγμένο δείγμα στεφανιαίων

ασθενών ήταν 4:1, γεγονός που επιβεβαιώνει την προστατευτική επίδραση του γυναικείου φύλου στην πρώιμη εκδήλωση της νόσου. [21] [11]

3. Οικογενειακό ιστορικό

Τα τελευταία χρόνια αρκετές μελέτες έδειξαν ότι το οικογενειακό ιστορικό της στεφανιαίας νόσου αποτελεί έναν ανεξάρτητο από τους άλλους καρδιαγγειακούς, παράγοντα για την εκδήλωση της νόσου. Αυτό καταδεικνύει επίσης βιβλιογραφική έρευνα, στην οποία περιλαμβάνονται αρκετά άρθρα που αφορούν τη μελέτη του οικογενειακού ιστορικού, του αντιληπτού παράγοντα κινδύνου της νόσου αλλά και του τρόπου της σχετικά με την υγεία συμπεριφοράς του ατόμου που έχει ιστορικό στα καρδιαγγειακά νοσήματα. Έτσι το οικογενειακό ιστορικό φαίνεται να σχετίζεται θετικά με τον κίνδυνο της νόσου, ωστόσο δεν είναι ικανό να οδηγήσει στην αλλαγή της συμπεριφοράς και του τρόπου ζωής του ατόμου. [22]

4. Εθνικότητα

Το φορτίο των καρδιαγγειακών νοσημάτων, συμπεριλαμβανομένων της στεφανιαίας νόσου (ΣΝ) και του αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου(ΑΕΕ) εμφανίζει δυσαναλογία μεταξύ διαφορετικών εθνικοτήτων. Η επίπτωση της στεφανιαίας νόσου και των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων είναι υψηλότερη στους Αφρικανοαμερικανούς παρά το φυσιολογικό τους λιπιδαιμικό προφίλ τους. Οι Νοτιοασιάτες εμφανίζουν αυξημένα ποσοστά στεφανιαίας νόσου, ενώ φαίνεται να έχουν υψηλότερα ποσοστά σωματικού λίπους και ινσουλινοαντίστασης. Τέλος στον πληθυσμό των Κινέζων η στεφανιαία νόσος εμφανίζεται σε χαμηλότερα ποσοστά, ωστόσο είναι αυξημένη η επίπτωση αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων. [23]

1.5.2 Τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου της καρδιαγγειακής νόσου

Οι τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου αφορούν κυρίως το προσωπικό και κοινωνικό ιστορικό του ασθενούς, οπότε περιλαμβάνουν δεδομένα από τον τρόπο ζωής, τις καπνιστικές συνήθειες, την κατανάλωση ουσιών και αλκοόλ, τη φυσική δραστηριότητα και άλλους κοινωνικούς παράγοντες. Επιπλέον εξετάζονται ανθρωπομετρικά αλλά και κλινικά δεδομένα όπως η παχυσαρκία, η υπέρταση και άλλα. Παρακάτω αναλύονται οι τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου. [20]

A. Κλινικοί δείκτες

Υπερχοληστερολαιμία

Αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα αυξημένα επίπεδα της συγκέντρωσης της χοληστερόλης στο πλάσμα ενισχύουν τον κίνδυνο εμφάνισης της στεφανιαίας νόσου αλλά και άλλων μορφών της αθηροσκληρωτικής αγγειοπάθειας. Πιο συγκεκριμένα ο κίνδυνος αυξάνεται με τις τιμές της σχέσης ολικής χοληστερόλης προς τη χοληστερόλη υψηλής πυκνότητας σε λιποπρωτεΐνες (HDL). Επίσης τυχαίοποιημένες ευρείας κλίμακας μελέτες έχουν δείξει ότι μείωση της συγκέντρωσης της συνολικής χοληστερόλης και της LDL, γνωστής ως «κακή χοληστερόλη» μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών επεισοδίων.

Τριγλυκερίδια

Τα τριγλυκερίδια είναι ένας τύπος λιπιδίων του αίματος, για τα οποία αρκετές έρευνες υποστηρίζουν ότι υψηλά επίπεδα αυτών στο αίμα αυξάνουν τον κίνδυνο για την εκδήλωση της στεφανιαίας νόσου, ιδιαίτερα στις γυναίκες.

Υπέρταση

Η «πίεση του αίματος» όπως είναι γνωστό αποτελεί τη βασική δύναμη για την κυκλοφορία του αίματος στις αρτηρίες καθώς αυτό ωθείται από την καρδιά. Όλες οι τιμές πάνω από το επίπεδο της τιμής 120 mmHg για τη συστολική πίεση και της τιμής 80 mmHg για τη διαστολική αυξάνουν τον κίνδυνο της εκδήλωσης στεφανιαίας νόσου. Οποιαδήποτε, είτε η συστολική είτε η διαστολική παρουσιάσει αύξηση τότε το άτομο κινδυνεύει από τη νόσο και από βλάβη του μυοκαρδίου.

Σακχαρώδης διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης διακρίνεται στο διαβήτη τύπου 1, όπου τα επίπεδα γλυκόζης είναι υψηλά, καθώς ο οργανισμός δεν παράγει αρκετή ινσουλίνη και στο διαβήτη τύπου 2, κατά τον οποίο η ινσουλίνη παράγεται, αλλά δεν χρησιμοποιείται σωστά από τον οργανισμό. Συνολικά ο διαβήτης αποτελεί ισχυρό παράγοντα κινδύνου για όλες τις μορφές αρτηριοσκληρωτικής αγγειοπάθειας. Η ανοχή στην ινσουλίνη σχετίζεται με την παχυσαρκία και με τη μειωμένη φυσική δραστηριότητα, ενώ αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης της στεφανιαίας νόσου.

Παχυσαρκία

Η παχυσαρκία αποτελεί έναν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου. Ωστόσο συχνά σχετίζεται και με άλλους δυσμενείς παράγοντες όπως η υπέρταση, ο διαβήτης, τα αυξημένα επίπεδα λιπιδίων και παραγόντων φλεγμονής στο πλάσμα καθώς και με τη μειωμένη φυσική δραστηριότητα.

Παράγοντες που σχετίζονται με την αιμόσταση

Η δημιουργία θρομβώσεων ενισχύεται από την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, τα αυξημένα επίπεδα ινωδογόνου και τον παράγοντα VII. Επιπλέον άλλες διαταραχές του συστήματος πήξης όπως ανεπάρκεια βιταμίνης C, πρωτεΐνης S και του παράγοντα V leiden συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο φλεβικών και αρτηριακών θρομβώσεων.[24]

Παράγοντες φλεγμονής

Αρκετοί φλεγμονώδεις παράγοντες, με κύριους τους ιντερλευκίνη 6 (interleukin, IL-6), ιντερλευκίνη 18 (interleukin, IL-18), παράγοντας νέκρωσης όγκων α (tumor necrosis factor α, TNF-α), μητρική μεταλλοπρωτεϊνάση 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP-9) και αντιδρώσα πρωτεΐνη C (C-reactive protein, CRP) φαίνεται να σχετίζονται με τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων και ιδιαίτερα της αγγειακής νόσου.

Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων α (tumor necrosis factor α, TNF-α) και η ιντερλευκίνη 6 και 18 (interleukin, IL-6 και interleukin, IL-18) ανήκουν στην κατηγορία των κυταροκινών. Οι κυταροκίνες, παράγονται κατά τη δραστική φάση της ανοσιακής απάντησης, επηρεάζοντας την επαγωγή και τη ρύθμιση. Η έκκρισή τους είναι ταχεία, βραχεία και αυτοπεριοριζόμενη. Συνήθως συντίθενται μέσω γονιδιακής μεταγραφής και δεν αποθηκεύονται.

Όσον αφορά τη δράση των κυταροκινών, αυτή μεσολαβείται από τη σύνδεσή τους σε μεμβρανικούς υποδοχείς και μπορεί να είναι αυτοκρινής ή παρακρινής. Επίσης ασκούν τη δράση τους πλειοτροπικά, δηλαδή σε διαφορετικά είδη κυττάρων και οι επιδράσεις μπορεί να είναι σύγχρονες, ενώ άλλες μπορεί να εκδηλώνονται μετά από λεπτά, ώρες, ημέρες. Οι δράσεις τους συχνά αλληλοεπικαλύπτονται, καθώς επηρεάζουν τη σύνθεση και δράση άλλων κυταροκινών. Το αποτέλεσμα της συνεργικής δράσης διαφόρων κυταροκινών μπορεί να είναι ανταγωνιστικό ή αθροιστικό ή ενδέχεται να επιτείνει τις επιμέρους δράσεις τους ή δίνει γένεση σε νέες εκδηλώσεις (ρυθμιστικός μηχανισμός).

Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων α (tumor necrosis factor α , TNF- α) παράγεται από τα μακροφάγα, τα Τ λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα φυσικοί φονείς (natural killers cells, NK κύτταρα). Ειδικά στην περίπτωση της αθηροσκλήρωσης παράγεται από τα μακροφάγα. Συντίθεται ως μεμβρανική πρωτεΐνη 26kD (ομοτριμερές) και η απομάκρυνση 17kD από κάθε υπομονάδα δημιουργεί τη διαλυτή μορφή, δηλαδή σταθερό ομοτριμερές 51kD σαν τριγωνική πυραμίδα. Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων α (tumor necrosis factor α , TNF- α) συμβάλλει στη ρύθμιση της λειτουργίας των λευκοκυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων, οδηγεί σε αύξηση των παραγόντων ιντερλευκίνη-1 (interleukin-1, Il-1) και ιντερλευκίνη-6 (interleukin-6, Il-6) και των πρωτεϊνών οξείας φάσης που παράγονται από τα ηπατοκύτταρα. Επιπλέον δρα στην ενδοαγγειακή θρόμβωση αλλά και στις μεταβολικές διαταραχές.

Η ιντερλευκίνη-6 (interleukin-6, Il-6) έχει μοριακό βάρος 26kD και συντίθεται από τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τους ινοβλάστες και υπό την επίδραση του παράγοντα νέκρωσης όγκων α (tumor necrosis factor α , TNF- α) και της ιντερλευκίνης-1 (interleukin-1, Il-1). Η δράση της εκδηλώνεται στα ενεργοποιημένα Β κύτταρα παράγοντας τη διαφοροποίησή τους και διεγείρει επίσης την παραγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσης, όπως η αντιδρώσα πρωτεΐνη C (C-reactive protein, CRP), από τα ηπατοκύτταρα. [25]

Συγκεκριμένη μελέτη λοιπόν, η οποία πραγματοποιήθηκε σε 1514 συμμετέχοντες συνολικά, 833 περιπτώσεις οξέος στεφανιαίου συνδρόμου και 681 μη περιπτώσεις της ασθένειας και σύμφωνα με το Εθνικό Μητρώο Ασθενών της Δανίας και το Μητρώο Αιτιών Θανάτου της Δανίας επιβεβαιώθηκε η σχέση των προαναφερθέντων παραγόντων φλεγμονής με τον κίνδυνο της νόσου, καθώς οι συγκεντρώσεις τους είχαν υψηλότερες τιμές σε ασθενείς που εκδήλωσαν στεφανιαίο επεισόδιο σε σχέση με τα άτομα που δεν αποτελούσαν περιπτώσεις της νόσου.

Η έρευνα οδήγησε στο συμπέρασμα, κατόπιν μελέτης και της ήδη υπάρχουσας βιβλιογραφίας, ότι συγκεκριμένοι προ-φλεγμονώδεις παράγοντες σχετίζονται κατά γραμμικό τρόπο, ο καθένας ανεξάρτητα από τους συνηθισμένους παράγοντες κινδύνου, με τον κίνδυνο εμφάνισης της στεφανιαίας νόσου. Αξίζει να σημειωθεί ότι αν και τα πρόσφατα ευρήματα αποδεικνύουν τη σχέση των παραγόντων φλεγμονής με την αγγειοπάθεια, κρίνεται απαραίτητη περαιτέρω έρευνα για την πλήρη εξακρίβωση της σχέσης της στεφανιαίας νόσου και των φλεγμονωδών παραγόντων.[26]

Β. Συμπεριφοριστικοί παράγοντες

Κάπνισμα

Το κάπνισμα είναι ένας ισχυρός παράγοντας κινδύνου των καρδιαγγειακών νοσημάτων και σχετίζεται με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας στον κόσμο. Σύμφωνα με την Αμερικανική Καρδιολογική Εταιρεία (American Heart Association, AHA), οι καπνιστές φαίνεται να έχουν 2 με 4 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου από τους μη καπνιστές.

Το κάπνισμα συμβάλλει στο σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας μέσω διαφόρων μηχανισμών. Κάποιοι από αυτούς τους μηχανισμούς είναι η μείωση της αγγειοδιασταλτικής λειτουργίας, η αύξηση των δεικτών φλεγμονής, η αύξηση των τριγλυκεριδίων, της ολικής και LDL χοληστερόλης και της οξείδωσης της και η μείωση της καλής χοληστερόλης. Επίσης, προκαλεί αλλαγές στη λειτουργία των αιμοπεταλίων, των αντιθρομβωτικών και προθρομβωτικών παραγόντων και της θρομβόλυσης αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο δημιουργίας θρόμβου.[27] Η διακοπή του καπνίσματος, ωστόσο, φαίνεται να έχει πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα, καθώς αν αυτή διαρκέσει 15 χρόνια, ο κίνδυνος θανάτου από στεφανιαία νόσο τείνει να προσεγγίζει αυτόν που έχει κάποιος που υπήρξε μη καπνιστής σε όλη του τη ζωή.[28]

Αλκοόλ

Η κατανάλωση 1-2 ποτηριών κρασιού, σύμφωνα με τη μελέτη CARDIOL 2000 σχετίζεται με μείωση του κινδύνου της εκδήλωσης στεφανιαίας νόσου κατά 51% , ενώ η κατανάλωση 2-4 ποτηριών σχετίζεται με αύξηση του κινδύνου κατά 24%. Η υψηλή κατανάλωση αλκοόλ αυξάνει τα επίπεδα τριγλυκεριδίων στο αίμα, οδηγεί σε υπέρταση, παχυσαρκία καρδιακή αρρυθμία και σακχαρώδη διαβήτη. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας σε έκθεση που δημοσιεύτηκε το 2002 υπολογίζεται ότι το 2% της στεφανιαίας νόσου στους άνδρες ανεπτυγμένων χωρών οφείλεται στην υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ.[29]

Φυσική δραστηριότητα

Η έλλειψη φυσικής δραστηριότητας συνδέεται στενά με την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων και ιδίως της στεφανιαίας νόσου. Τα άτομα τα οποία έχουν έλλειψη φυσικής δραστηριότητας διατρέχουν τον κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου δύο φορές περισσότερο. Επιπλέον, η έλλειψη φυσικής δραστηριότητας ενισχύει άλλους παράγοντες κινδύνου της νόσου όπως την αύξηση των επιπέδων της χοληστερόλης του αίματος, των τριγλυκεριδίων, ενώ μπορεί να οδηγήσει σε υπέρταση, σακχαρώδη διαβήτη και παχυσαρκία.[30]

Διατροφή

Η ανθυγιεινή διατροφή αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης της στεφανιαίας νόσου. Τροφές υψηλής περιεκτικότητας σε χοληστερόλη, κορεσμένα και trans λιπαρά αυξάνουν την «κακή χοληστερόλη», την LDL. Επιπλέον, το αλάτι οδηγεί σε αύξηση της αρτηριακής πίεσης, ενώ η ζάχαρη μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του βάρους με συνέπεια να ενισχύεται ο κίνδυνος καρδιαγγειακών νοσημάτων.

Άγχος

Το άγχος αλλά και η κατάθλιψη έχουν συσχετιστεί με αύξηση του καρδιαγγειακού κινδύνου. Επίσης έχει βρεθεί ότι το άγχος οδηγεί στην αύξηση της αρτηριακής πίεσης αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων. [31]

Γ. Άλλοι παράγοντες κινδύνου

Κοινωνικοοικονομικοί παράγοντες

Ο κίνδυνος εμφάνισης οξέος στεφανιαίου συνδρόμου (ΟΣΣ) είναι χαμηλότερος σε ομάδες πλουσιότερες και υψηλότερου μορφωτικού επιπέδου. Επίσης αρκετοί κοινωνικοοικονομικοί παράγοντες συνδέονται με παράγοντες κινδύνου όπως το κάπνισμα, η υπέρταση, τα λιπίδια του αίματος και η παχυσαρκία. Η κατανόηση του τρόπου αλληλεπίδρασης των κοινωνικών παραγόντων, καθώς και παραγόντων κινδύνου που αφορούν τη συμπεριφορά του ατόμου θα μπορούσε ουσιαστικά να βοηθήσει και στην κατανόηση της αιτιολογίας του οξέος στεφανιαίου συνδρόμου (ΟΣΣ) και να προσδιορίσει πιθανές παρεμβάσεις οι οποίες να στοχεύουν στην αντιμετώπιση των αλληλοενισχυόμενων αιτιών του οξέος στεφανιαίου συνδρόμου (ΟΣΣ). [32]

1.5.3 Γενετικοί παράγοντες της καρδιαγγειακής νόσου

Όσον αφορά τη μελέτη της γενετικής στεφανιαίων νοσημάτων και του εμφράγματος του μυοκαρδίου, η επιτυχία της περιορίζεται από το γεγονός ότι είναι πολυπαραγοντικές ασθένειες. Πολλοί παράγοντες κινδύνου έχουν ταυτοποιηθεί για το οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (ΟΣΣ) και το οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου (ΟΕΜ) , συμπεριλαμβανομένου του καπνίσματος, της αυξημένης ηλικίας, του αντρικού φύλου, του σακχαρώδους διαβήτη, της

υψηλής συστολικής αρτηριακής πίεσης, του προσωπικού ιστορικού στηθάγχης, του οικογενειακού ιστορικού για οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (ΟΣΣ) και οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου (ΟΕΜ), της υψηλής σε λίπη δίαιτας, των λοιμώξεων, της παχυσαρκίας, της αυξημένης ολικής χοληστερόλης και της «κακής χοληστερόλης» στο πλάσμα, των αυξημένων τριγλυκεριδίων στο πλάσμα και της χαμηλής «καλής χοληστερόλης» στο πλάσμα. [33] Ανάμεσα σε αυτούς τους παράγοντες, το οικογενειακό ιστορικό είναι ένας από τους πιο σημαντικούς ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου. [34] Επίσης, μελέτες που έχουν γίνει σε διδύμους προτείνουν ότι οι γενετικοί παράγοντες συνεισφέρουν στην ανάπτυξη του οξέος στεφανιαίου συνδρόμου (ΟΣΣ) και του οξέος εμφράγματος μυοκαρδίου (ΟΕΜ). [35]

Η βασική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την εξακρίβωση γονιδίων ευαίσθητα για οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (ΟΣΣ) είναι η μελέτη ασθενών και ατόμων αναφοράς για υποψήφια γονίδια. Η μέθοδος αυτή είναι σχετικά εύκολη κι ένα γονίδιο επιλέγεται σύμφωνα με την πιθανή συμμετοχή στα στεφανιαία νοσήματα. Πραγματοποιείται η γονοτύπηση πολυμορφισμών στο γονίδιο σε μια ομάδα ασθενών και σε μια ομάδα ατόμων αναφοράς. Κατόπιν αναλύονται οι συχνότητες των αλληλόμορφων των πολυμορφισμών ή των γονοτύπων και στην περίπτωση που η εμφάνιση ενός αλληλόμορφου ή γονοτύπου στις υποθέσεις είναι σημαντικά διαφορετική από την αντίστοιχη στην ομάδα ελέγχου, τότε υπάρχει συσχέτιση με τη νόσο.

Τα γονίδια, τα οποία συνδέονται με σύνθετες ασθένειες, όπως τα στεφανιαία νοσήματα μπορούν να διαχωριστούν σε τρεις βασικές κατηγορίες: γονίδια τα οποία ενεργοποιούν το μηχανισμό της νόσου, γονίδια ευαισθησίας και γονίδια, τα οποία αν υποστούν μετάλλαξη οδηγούν στην παθογένεση της νόσου. Τα γονίδια που προκαλούν την ασθένεια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες πρόβλεψης σε γενετικά τεστ, τα γονίδια ευαισθησίας επηρεάζουν την πιθανότητα εμφάνισης της ασθένειας και συμβάλλουν στην εκδήλωση ή και όχι αυτής στα πλαίσια της αλληλεπίδρασης με άλλους γενετικούς ή περιβαλλοντικούς παράγοντες. Μεταλλάξεις ή πολυμορφισμοί σε αυτά τα γονίδια μπορεί να είναι παρόντα και στους υγιείς και στους ασθενείς, αλλά η συχνότητα διαφέρει. Τα γονίδια ευαισθησίας έχουν μικρότερη προβλεπτική αξία για την ανάπτυξη και την πρόγνωση της ασθένειας.

Αρκετές έρευνες τύπου Genome Wide Association Study (GWAS) κυρίως, έχουν οδηγήσει στην ύπαρξη πιθανών γονιδίων βιοδεικτών για την ασθένεια. Τα γονίδια αυτά είναι κυρίως γονίδια λιποπρωτεϊνών, παραγόντων φλεγμονής, μεταγραφικών και άλλων ρυθμιστικών παραγόντων. Υπάρχουν επίσης και κάποιοι γενετικοί τόποι, όπως ο 9p21, ο οποίος έχει συνδεθεί με τη γενετική προδιάθεση για την καρδιαγγειακή νόσο. [36]

1.6 Επιγενετική της καρδιαγγειακής νόσου: microRNAs ως πιθανοί βιοδείκτες

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα είναι πολυπαραγοντικές νόσοι, οπότε αρκετοί περιβαλλοντικοί αλλά και γενετικοί παράγοντες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση του φαινοτύπου. Τα τελευταία χρόνια αρκετές έρευνες εστιάζουν στη μελέτη και επιγενετικών παραγόντων της καρδιαγγειακής νόσου. Τα microRNAs, αν και ακόμα δεν έχουν εισαχθεί στην κλινική πράξη θα μπορούσαν να αποτελούν υποψήφιους βιοδείκτες για αρκετές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένης και της στεφανιαίας νόσου.

1.6.1 Η βιογένεση και ο ρόλος των microRNAs

Το ανθρώπινο γονιδίωμα αποτελείται περίπου στο 70% από γονίδια RNA, τα οποία δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες(non-coding RNAs, ncRNAs). Τα ncRNAs διακρίνονται ανάλογα με

το μέγεθός τους, στα μικρά μη κωδικά μόρια RNA (small non-coding RNAs, sncRNAs), τα οποία αποτελούνται από περίπου 20-300 νουκλεοτίδια και στα μεσαίου και μεγάλου μεγέθους μη κωδικά μόρια RNA (medium και long non-coding RNAs, lncRNAs), τα οποία αποτελούνται από περίπου 300-10000 νουκλεοτίδια. Στην κατηγορία των small non-coding RNAs (sncRNAs) ανήκουν δύο βασικές κατηγορίες τα microRNAs (miRNAs) και τα small interfering RNAs (siRNAs), αλλά και κάποιες άλλες κατηγορίες. Τα small non-coding RNAs (sncRNAs) διακρίνονται από τα υπόλοιπα λόγω του μικρού τους μεγέθους αλλά και λόγω της σύνδεσής τους με τις πρωτεΐνες Αργοναύτες. Κάποιες άλλες κατηγορίες των small non-coding RNAs (sncRNAs) είναι τα RNAs X απενεργοποίησης (x-inactivation RNAs, xi-RNAs), τα μικρά πυρηνισκικά RNAs (small nucleolar-organizer RNAs, sno-RNAs), τα μικρά τελομερικά RNAs (telomeric small RNAs, tel-sRNAs) και τα σχετιζόμενα με τα κεντροσωμάτια RNAs (centrosome associated RNAs, crasiRNAs).

Η κυριότερη ομάδα μη κωδικών RNAs στους περισσότερους ιστούς είναι τα microRNAs (miRNAs). Η ανίχνευσή τους στο φυτό *Arabidopsis thaliana* καταδεικνύει ότι είχαν εμφανιστεί από νωρίς στην εξέλιξη των ευκαρυωτικών οργανισμών. Πιο συγκεκριμένα τα microRNAs είναι μικρά μόρια μη κωδικών RNA 19-25 νουκλεοτιδίων και εμπλέκονται στη ρύθμιση αρκετών κυτταρικών διαδικασιών, όπως η κυτταρική διαφοροποίηση, η ανάπτυξη και ο κυτταρικός θάνατος. Τα μόρια αυτά προέρχονται από γονίδια που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες, από ιντρόνια γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και από ψευδογονίδια. Η σύνθεση αλλά και η λειτουργία των μορίων αυτών ελέγχεται αυστηρά και η απορρύθμισή τους έχει συνδεθεί με την εκδήλωση αρκετών ασθενειών, όπως και η στεφανιαία νόσος. [36] [37]

Όσον αφορά τη βιογένεσή τους, η μεταγραφή γίνεται αρχικά από το ένζυμο της RNA πολυμεράσης II, οπότε προκύπτει ένα μεγάλου μεγέθους pri-miRNA (primary miRNA) που συνήθως έχει μήκος μεγαλύτερο από 1kb. Στη συνέχεια το μόριο αυτό υφίσταται περαιτέρω επεξεργασία. Αρχικά η ωρίμανση γίνεται στον πυρήνα από το ένζυμο Drosha μια RNAase III και το συμπαραγόντα DGCR8, τα οποία οδηγούν στη διάσπαση του pri-miRNA (primary miRNA), οπότε και απελευθερώνεται ένα πρόδρομο δίκλωνο μόριο περίπου 70 νουκλεοτιδίων, το pre-miRNA (precursor miRNA), το οποίο έχει δομή που μοιάζει με φουρκέτα. Στη συνέχεια το μόριο αυτό μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα. Η μεταφορά αυτή γίνεται με τη βοήθεια της εξπορτίνης-5 (exportin 5), που σχηματίζει σύμπλοκο με την RAN-GTP, μία GTP-συνδεόμενη πρωτεΐνη του πυρήνα και με το συνδεόμενο precursor miRNA (pre-miRNA). Κατόπιν, το ένζυμο Dicer συμβάλλει στην περαιτέρω ωρίμανση του precursor-miRNA (pre-miRNA) στο κυτταρόπλασμα, οπότε δημιουργείται ένα πρόδρομο μόριο μεγέθους περίπου 22 νουκλεοτιδίων (δίκλωνο μόριο). Η Dicer έχει στο C-τελικό άκρο της διαδοχικές RNase III επικράτειες, οι οποίες σχηματίζουν ένα ενδομοριακό διμερές με ρόλο καταλυτικού κέντρου, παρόμοιου με αυτού της Drosha. Διασπά το εξερχόμενο από τον πυρήνα pre-miRNA απελευθερώνοντας το μικρό δίκλωνο RNA, το οποίο παραλαμβάνεται από το τελικό πρωτεϊνικό σύμπλεγμα της ωρίμανσης, το RISC (RNA-induced silencing complex). Το σύμπλεγμα αυτό σχηματίζεται σε δύο στάδια, αρχικά με το φόρτωμα του δίκλωνου RNA σε μια πρωτεΐνη Αργοναύτη (pre-RISC σύμπλοκο) και το επακόλουθο ξετύλιγμά του (ώριμο RISC σύμπλοκο) (Εικόνα 2). [38]

Όπως προαναφέρθηκε, η ρύθμιση της έκφρασης και της δράσης των microRNAs είναι πολύ σημαντική για την ορθή λειτουργία των οργανισμών. Η θέση των μορίων αυτών στο ανθρώπινο γονιδίωμα παίζει σημαντικό ρόλο και στη ρύθμιση της έκφρασης τους. Τα περισσότερα από αυτά βρίσκονται σε εσώνια κωδικών ή μη-κωδικών μεταγράφων. Κάποια υπόκεινται στον έλεγχο των υποκινητών των γονιδίων στον οποίο τα εσώνια παρεμβάλλονται, ενώ άλλα έχουν συγκεκριμένο υποκινητή ή περισσότερες από μία θέσεις έναρξης της μεταγραφής. Τέλος, μερικά γονίδια microRNAs βρίσκονται κοντά και

μεταγράφονται μαζί, σχηματίζοντας μία πολυσυστηνική μεταγραφική μονάδα. Η μεταγραφή τους γίνεται από την RNA Pol II και ελέγχεται από μεταγραφικούς παράγοντες, όπως οι p53 και MYC και επιγενετικούς παράγοντες όπως η μεθυλίωση του DNA και η τροποποίηση ιστονών. [39]

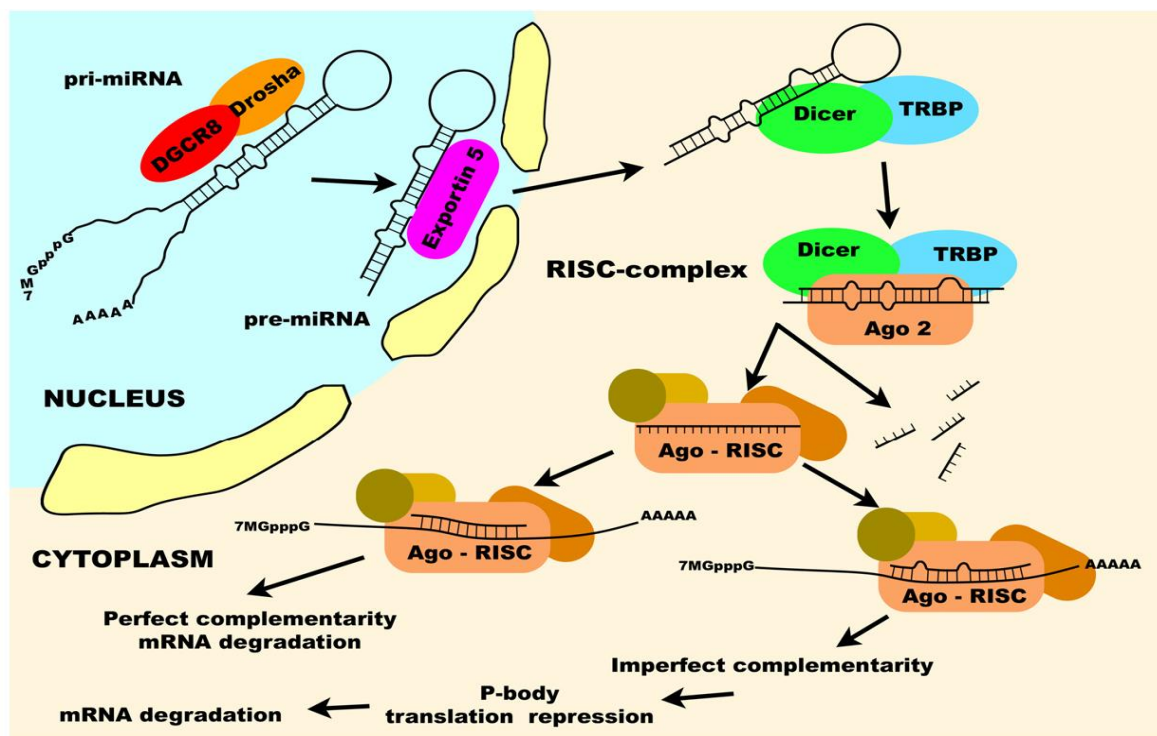
Η ποσότητα των microRNAs (miRNAs) μες στο κύτταρο επηρεάζει τη δραστηριότητά τους, ενώ ρυθμίζει και την παραγωγή τους. Η ρύθμιση γίνεται από νουκλεάσες, οι οποίες προκαλούν τη θραύση και αποδόμηση των microRNAs (miRNAs). Επιπλέον, οι πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου (single nucleotide polymorphisms, SNPs) που βρίσκονται στα γονίδια των microRNAs, αλλά και στη θέση του mRNA που μπορεί αυτά να στοχεύουν και να συνδέονται πάνω τους, ρυθμίζουν την ενδοκυττάρια ποσότητα των microRNAs. Τέλος, οι μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις που συμβαίνουν στο μετάγραφο από το οποίο προκύπτει στην ουσία το microRNA επηρεάζουν την ενδοκυττάρια συγκέντρωση των ίδιων των microRNAs, καθώς αλλάζουν τη δομή των μεταγράφων κι έτσι συνεισφέρουν στην ποικιλομορφία τους οδηγώντας τελικά στην παραγωγή διαφορετικών μορίων microRNAs από ένα μόνο μετάγραφο. [37] [39]

Το ώριμο πλέον microRNA είναι αυτό το οποίο συμμετέχει στα μονοπάτια ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων. Η δράση των microRNAs στους ζωικούς οργανισμούς είναι κυρίως η καταστολή των στόχων τους, σε επίπεδο μετάφρασης αλλά και σε επίπεδο γονιδίου κάποιες φορές. Η πολυπλοκότητα του μεταφραστικού ελέγχου από τα microRNAs ενισχύεται ακόμη περισσότερο από το γεγονός ότι ένα και μοναδικό microRNA έχει τη δυνατότητα ρύθμισης περισσότερων του ενός mRNAs, ενώ το κάθε mRNA ελέγχεται από πολλά διαφορετικά microRNAs. Οι πρωτεΐνες Αργοναύτες, οι οποίες είναι αυτές που διαδραματίζουν τον πιο σημαντικό ρόλο στη δράση των microRNAs στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης, παρουσιάζουν μεταλλαγές που οδηγούν σε διαφοροποίηση στα πρότυπα έκφρασής τους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ποικιλομορφίας των συμπλόκων RISC (RNA-induced silencing complex) και την ιστοειδική δράση τους. Όταν τα miRNAs συνδεθούν στο στόχο με απόλυτη συμπληρωματικότητα τότε οδηγούν στη αποδόμηση του mRNA-στόχου, ενώ αν δεν συνδεθούν με απόλυτη συμπληρωματικότητα τότε καταστέλλουν τη μετάφραση του mRNA. (Εικόνα 2 και 3). [38] [40]

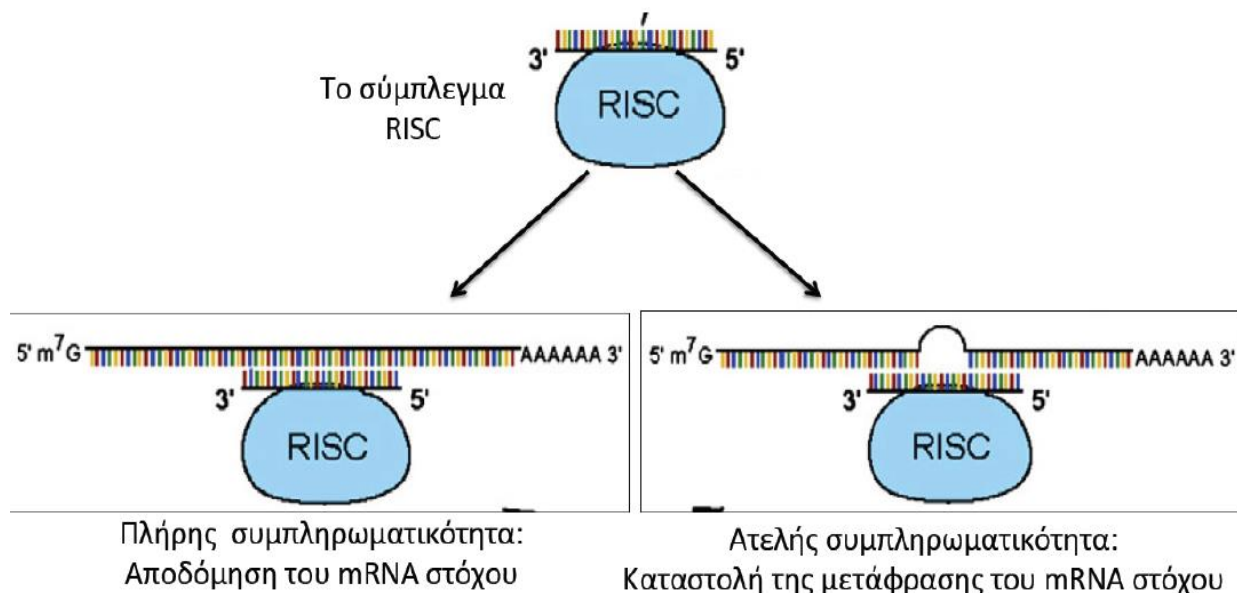
Όπως προαναφέρθηκε τα microRNAs δρουν και σε επίπεδο γονιδίου. Πιο συγκεκριμένα τα περισσότερα γονίδια των σπονδυλωτών, αλλά και άλλων ευκαρυωτικών οργανισμών, όπως μύκητες και φυτά έχουν στην μη-μεταφραζόμενη περιοχή στο 3' άκρο συντηρημένα μοτίβα, τα οποία είναι εμπλουτισμένα σε αλληλουχίες συμπληρωματικές σε microRNA. Η συμπληρωματικότητα βασίζεται σε μία αλληλουχία μικρού μεγέθους 2-8 νουκλεοτιδίων από το 5' άκρο των microRNA που ονομάζεται και "seed sequence" (Εικόνα 4). Μέσω αυτής της αλληλουχίας τα microRNAs συνδέονται στο γονίδιο εμποδίζοντας έτσι τη μεταγραφή του και ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο την έκφρασή του. [39] [40]

Μέχρι τώρα έχουν ανακαλυφθεί πάνω από 1900 microRNAs στον άνθρωπο, τα οποία φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε αρκετές ασθένειες, μεταξύ αυτών και η στεφανιαία νόσος (ΣΝ). Ωστόσο, δεν έχει ανακαλυφθεί ακόμα η ακριβής συσχέτιση των μικρών αυτών μορίων με την παθοφυσιολογία, την πρόγνωση και τη διάγνωση των διάφορων ασθενειών. [41]

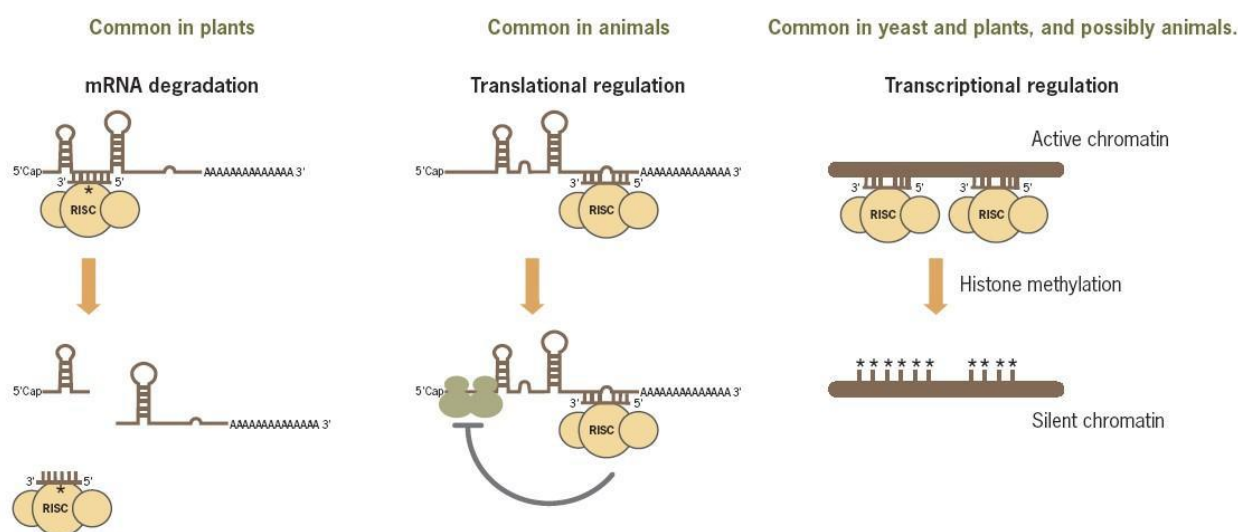
Παρακάτω ακολουθούν οι εικόνες που συνοψίζουν τη βιογένεση και τη δράση των microRNAs μες στο κύτταρο.



Εικόνα 2: Στάδια βιογένεσης των microRNAs και η δράση τους στο mRNA [38]



Εικόνα 3: Ο ρόλος των microRNAs στη γονιδιακή ρύθμιση σε μεταφραστικό επίπεδο [40]



Εικόνα 4: Ο ρόλος των microRNAs στη ρύθμιση της έκφρασης σε γονιδιακό επίπεδο [40]

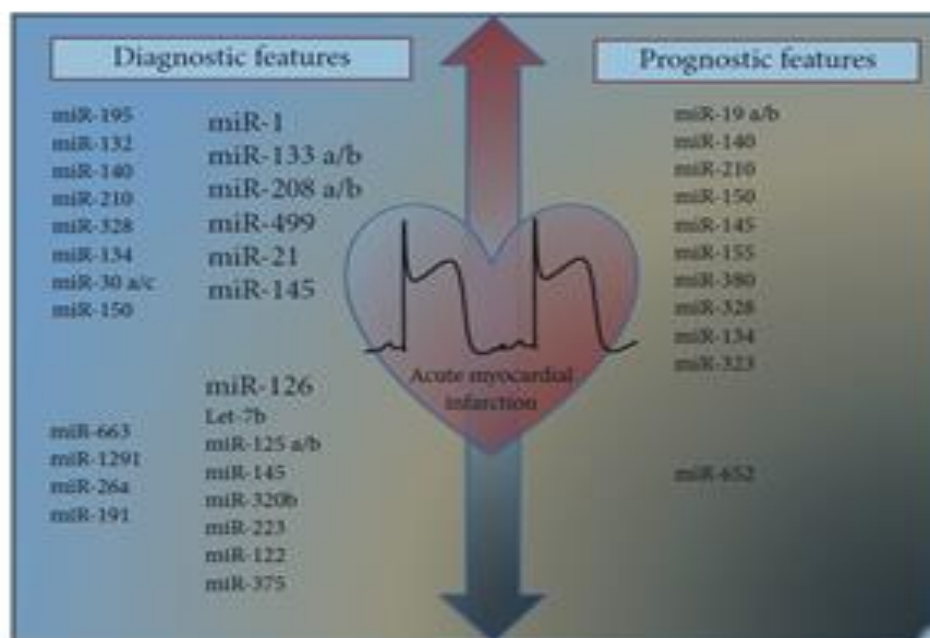
1.6.2 Η συμβολή των microRNAs στην πρόγνωση και τη διάγνωση της καρδιαγγειακής νόσου

Η καρδιακή αναδιαμόρφωση μετά το έμφραγμα του μυοκαρδίου (myocardial infarction, MI) εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το μέγεθος του εμφράγματος που καθορίζει την αλλοίωση της αρχιτεκτονικής της καρδιάς. Η ισχαιμική διαδικασία ενεργοποιεί επίσης φλεγμονώδη αντίδραση, καθώς και αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση στον καρδιακό μυ. Η καρδιακή δυσλειτουργία μετά από το έμφραγμα είναι ένα πολύ σημαντικό πρόβλημα, το οποίο πρέπει να αντιμετωπιστεί, ώστε να αποφευχθεί και η εκδήλωση ενός νέου επεισοδίου. Μέχρι τώρα οι υποκείμενοι μοριακοί μηχανισμοί δεν είναι ξεκάθαροι και τα τελευταία χρόνια εξετάζεται και ο ρόλος των microRNAs. Οι Da Costa και άλλοι ανέφεραν ότι ύστερα από απενεργοποίηση του ενζύμου Dicer, το οποίο όπως προαναφέρθηκε παίζει σημαντικό ρόλο στη βιογένεση των microRNAs, παρατηρήθηκε νέκρωση κάποιων μυοκαρδιακών κυττάρων. [41] Επιπλέον, οι συνθήκες υποξίας που παρατηρούνται κατά το ισχαιμικό επεισόδιο ενισχύουν την αποσιώπηση γονιδίων microRNA (miRNA), μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των πρωτεϊνών Αργοναύτες που συμμετέχουν στην ωρίμανση των microRNAs. [42] Επίσης, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα microRNAs παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της καρδιακής αγγειογένεσης, στην ίνωση και στην υπερτροφία του μυοκαρδίου κατά το έμφραγμα. Αυτές οι παρατηρήσεις κατέδειξαν μία πιθανή συσχέτιση της στεφανιαίας νόσου με την αλλαγή της έκφρασης διαφόρων microRNAs, ιδίως κατά την εκδήλωση του εμφράγματος. [43] -[46]

Την τελευταία δεκαετία αρκετές έρευνες έχουν επικεντρωθεί στη μελέτη των κυκλοφορούντων micro-RNAs (miRNAs) ως νέους βιοδείκτες για τη στεφανιαία νόσο και την κύρια επιπλοκή της, το έμφραγμα του μυοκαρδίου (myocardial infarction, MI). Πολυάριθμες μελέτες και ζωικά μοντέλα έχουν εξετάσει τη διαγνωστική αξία των microRNAs σε σχέση με τη στεφανιαία νόσο (ΣΝ). Πολλά miRNAs ορίζονται ως συμπληρωματικοί βιοδείκτες, εκτός των ήδη υπάρχοντων βιοδεικτών και για την πρόγνωση της στεφανιαίας νόσου. Σημαντική είναι επίσης η συμβολή των μορίων αυτών για τη διάκριση της ασταθούς στηθάγχης, η οποία είναι μία από τις εκδηλώσεις της στεφανιαίας νόσου. [47]

Το 2010 πέντε διαφορετικοί συγγραφείς ανέφεραν ένα πιθανό ρόλο των microRNAs, που εκφράζονται κυρίως στα κύτταρα του μυοκαρδίου, στην εκδήλωση οξέος εμφράγματος του

μυοκαρδίου(OEM).Συγκεκριμένα όλες αυτές οι μελέτες μαζί έδειξαν ότι κάποια microRNAs βρέθηκαν αυξημένα στο πλάσμα των ασθενών με έμφραγμα. Γενικά, μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί πολλά microRNAs, τα οποία όπως προαναφέρθηκε θεωρούνται ότι είναι υποψήφιοι βιοδείκτες για την πρόγνωση και τη διάγνωση της στεφανιαίας νόσου.Η παρακάτω εικόνα απεικονίζει κάποια από τα microRNAs αυτά (Εικόνα 5). [48]



Εικόνα 5: Τα κυκλοφορούντα microRNAs, τα οποία έχουν συσχετιστεί με τη διάγνωση και πρόγνωση των καρδιαγγειακών νοσημάτων, ειδικά τα microRNAs με μεγαλύτερου μεγέθους γραμματοσειρά είναι αυτά που έχουν συσχετιστεί με έμφραγμα μυοκαρδίου [48]

Αρκετές έρευνες έχουν δείξει ότι το ανθρώπινο γονιδίωμα περιλαμβάνει χιλιάδες microRNAs, με περίπου τα 300 να εκφράζονται κατά προσέγγιση στον καρδιακό ιστό.Κάποια από αυτά τα microRNAs,τα οποία εκφράζονται περισσότερο στα κύτταρα του μυοκαρδίου, συμπεριλαμβανομένων των miR-1, miR208a, miR-208b, miR-133a, miR-133b και miR-499 έχουν προταθεί ως δυνητικοί διαγνωστικοί δείκτες σε ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου.[49] [50] Πολλά από αυτά επίσης θα μπορούσαν να αποτελέσουν θεραπευτικούς στόχους,μέσω εκτεταμένων ερευνών με μόρια ανταγωνιστές των microRNAs ή χημικώς τροποποιημένων ολιγονουκλεοτιδίων που θα στόχευαν την απενεργοποίηση αυτών των microRNAs. [51]

Επιπλέον αξίζει να σημειωθεί ότι πολύ πιο πρόσφατα, μόλις το 2017, μετά από διεξοδική ανάλυση της βιβλιογραφίας, συνολικά 18 μελέτες συμπεριλήφθηκαν σε μια ανασκόπηση. Από τις συγκεκριμένες μελέτες προέκυψε ότι υπάρχουν κάποια επιπλέον microRNAs, τα οποία μεταβάλλουν την έκφραση τους κατά την εκδήλωση του εμφράγματος. Μερικά από αυτά υποεκφράζονται κατά την εκδήλωση του επεισοδίου, ενώ κάποια άλλα υπερεκφράζονται. Υπάρχουν και αυτά, τα οποία σε κάποιες μελέτες αναφέρεται ότι υποεκφράζονται και σε κάποιες άλλες ότι υπερεκφράζονται.Ο παρακάτω πίνακας απεικονίζει τα περισσότερα από αυτά τα κυκλοφορούντα microRNAs (Πίνακας 1). [52]

Πίνακας 1: Μεταβολή της έκφρασης κάποιων microRNAs κατά την εκδήλωση εμφράγματος του μυοκαρδίου σε διαφορετικούς πληθυσμούς

Επίπεδα έκφρασης	MicroRNAs
Υπερέκφραση	mir-19, mir-146, mir-223, mir-765, mir-133a, mir-191, mir-313, mir-23a, mir-34a, mir-526b, mir-25, mir-106b, mir-451, mir-590, mir-122, mir-370, mir-340, mir-624, mir-208a, mir-135, mir-130, mir-27b, mir-210
Υποέκφραση	mir-29a, mir-30e, mir-145, mir-140, mir-150, mir-181, mir-182, mir-342, mir-378, mir-584
Υπέρ- και Υπό-έκφραση	mir-92a, mir-126, mir-29a*, mir-155 * mir-147, mir-149, mir-424, mir-222

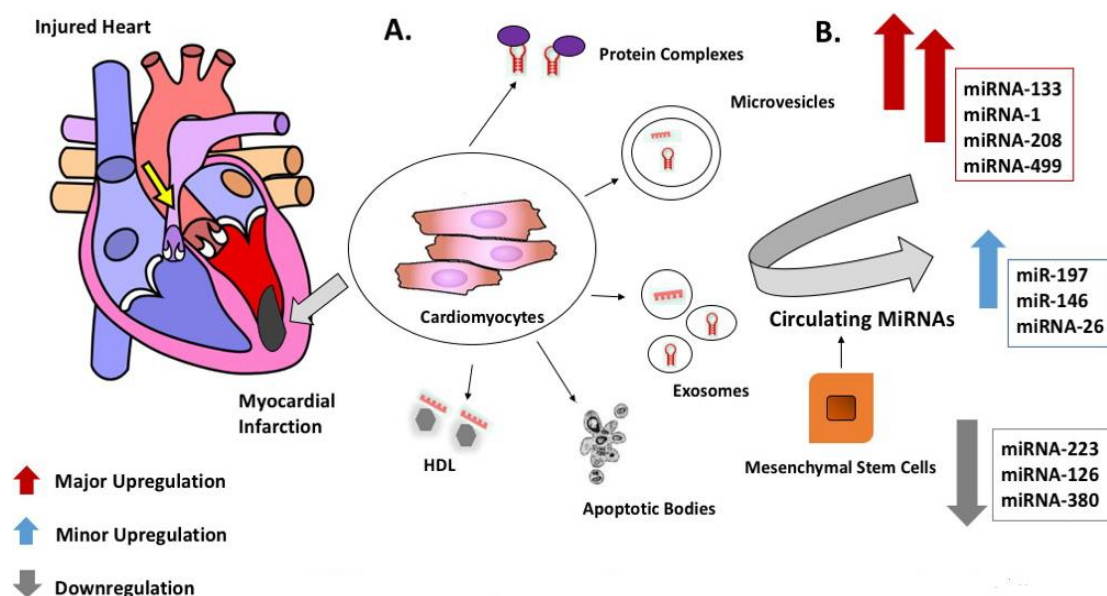
*Στις περισσότερες έρευνες βρέθηκε ότι υποεκφράζονται.

1.6.3 Αλληλεπίδραση των microRNAs και άλλων παραγόντων της καρδιαγγειακής νόσου

Αρκετές έρευνες έχουν επικεντρωθεί στη μελέτη της συσχέτισης της έκφρασης των microRNAs με άλλους παράγοντες της στεφανιαίας νόσου. Τα microRNAs συμμετέχουν σε αρκετά βιοχημικά μονοπάτια που αφορούν την παθοφυσιολογία της νόσου και αυτό έχει αποτελέσει τα τελευταία χρόνια το αντικείμενο μελέτης αρκετών ερευνητών, ωστόσο ακόμα δεν έχει ξεκαθαριστεί ο ακριβής τρόπος δράσης τους, καθώς πολλά από αυτά δεν ακολουθούν ένα συγκεκριμένο μοτίβο μεταβολής της έκφρασής τους. Το μόνο βέβαιο είναι πως άλλα μόρια φαίνεται να αλληλεπιδρούν με τα microRNAs κατά την εκδήλωση ενός οξέος στεφανιαίου επεισοδίου αλλά και μετά από αυτό. Επομένως η έκφραση των microRNAs φαίνεται να επηρεάζεται από άλλους ενδογενείς παράγοντες ύστερα από την εκδήλωση ενός επεισοδίου. Κάποιοι από αυτούς τους παράγοντες αποτελούν ήδη βιοδείκτες για την ασθένεια, όπως είναι οι διάφοροι παράγοντες φλεγμονής, η τροπονίνη και άλλα πρωτεϊνικά μόρια όπως η κινάση της κρεατινίνης MB (Creatinine-Kinase MB, CK-MB).

Κατά την εκδήλωση του εμφράγματος επηρεάζονται τόσο τα κύτταρα του μυοκαρδίου όσο και τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα. Πολλά πρωτεϊνικά μόρια που εκφράζονται από αυτά τα κύτταρα αλληλεπιδρούν με μόρια χοληστερόλης, τα οποία πρωταγωνιστούν στη διαδικασία της θρόμβωσης, όπως αναλύθηκε σε προηγούμενη ενότητα αλλά και με άλλες πρωτεΐνες δημιουργώντας διάφορα πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Επιπλέον ο τραυματισμός που υφίστανται τα κύτταρα αυτά μετά από ένα έμφραγμα οδηγεί στην αύξηση των παραγόντων φλεγμονής, ενώ η απόπτωσή πολλών από αυτά αυξάνει την παραγωγή αποπτωτικών σωματίων. Η αύξηση όλων αυτών των μορίων επηρεάζει την έκφραση πολλών microRNAs όχι απαραίτητα με τον ίδιο τρόπο.

Η παρακάτω εικόνα απεικονίζει λίγα από τα microRNAs, τα οποία απελευθερώνονται, μέσω διάφορων μηχανισμών στους οποίους συμμετέχουν και άλλα πρωτεϊνικά μόρια κατά το έμφραγμα του μυοκαρδίου (myocardial infarction, MI) και βγαίνουν τελικά στην κυκλοφορία (Εικόνα 6). [51] [52]



Εικόνα 6: Α.Η προέλευση και η απελευθέρωση των microRNAs στην κυκλοφορία κατά το έμφραγμα μυοκαρδίου. Σε απόκριση του εμφράγματος τα τραυματισμένα κύτταρα του μυοκαρδίου επηρεάζουν την έκφραση των microRNAs, μέσω διαφόρων μηχανισμών που περιλαμβάνουν κι άλλους παράγοντες όπως εξωσωμάτια, αποπτωτικά σωμάτια, υψηλή πυκνότητα λιποπρωτεϊνών και άλλα πρωτεϊνικά συμπλέγματα. Β. Η λίστα με κάποια από τα microRNAs που υποεκφράζονται ή υπερεκφράζονται μετά την εκδήλωση του εμφράγματος του μυοκαρδίου [52]

Μερικές έρευνες υποδεικνύουν επίσης το ρόλο κάποιων miRNAs στη θνησιμότητα και στην υποτροπή της στεφανιαίας νόσου μετά την εκδήλωση ενός πρώτου επεισοδίου. Στην έρευνα του Christian Schulte και της ομάδας του τα προερχόμενα από τον ορό κυκλοφορούντα miRNA-197 και miRNA-223 ταυτοποιήθηκαν ως προγνωστικοί παράγοντες για τον καρδιαγγειακό θάνατο σε μια μεγάλη ομάδα ασθενών με στεφανιαία νόσο.[47] Τα microRNAs αυτά, αλλά και το miR-126 μελετήθηκαν σε ασθενείς με στεφανιαίο σύνδρομο και η έκφρασή τους βρέθηκε αυξημένη. Κατόπιν του follow up των ασθενών βρέθηκε ότι αυτά τα miRNAs συνέχισαν να είναι αυξημένα και τελικά ύστερα από στατιστική ανάλυση προέκυψε η συσχέτισή τους με τον καρδιαγγειακό θάνατο, καθώς κάποιοι από τους ασθενείς που είχαν εκδηλώσει στεφανιαίο επεισόδιο απεβίωσαν. Προσφάτως οι Karakas και άλλοι ανακάλυψαν για πρώτη φορά ότι κάποια κυκλοφορούντα microRNAs, τα miR-132, miR-140-3p και miR-210, συνέβαλαν στην πρόγνωση της θνησιμότητας από καρδιαγγειακά νοσήματα σε μία μεγάλη κοόρτη από ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο και ασταθή στηθάγχη. Είναι λοιπόν φανερό ότι τα microRNAs συμβάλλουν στη συνολική εξέλιξη της νόσου και στην αποκατάσταση ή και όχι του καρδιακού μυ μετά από ένα οξύ στεφανιαίο επεισόδιο. [53]

Υπάρχουν επίσης αρκετές μελέτες που διερευνούν τη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των microRNAs μετά από ένα συμβάν εμφράγματος με άλλους παράγοντες κινδύνου της ασθένειας, όπως είναι η ηλικία, το φύλο, ο ΔΜΣ, η υπέρταση, η υπερχοληστερολαιμία, ο διαβήτης, η άσκηση, το κάπνισμα και οι βιοχημικοί δείκτες. Υπάρχουν αναφορές ότι η έκφραση μερικών microRNAs, όπως το miRNA-499, το miRNA-208, το miRNA-29a και άλλα microRNAs σχετίζεται με άλλους βιοδείκτες της στεφανιαίας νόσου, όπως η καρδιακή τροπονίνη T (cardiac troponin T, hs-cTnT) και η κινάση της κρεατινίνης (creatinine kinase, CK). Αυτές οι πληροφορίες προέκυψαν με τη χρήση πολυπαραγοντικής ανάλυσης με γραμμική παλινδρόμηση, η οποία οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ο τρόπος που μεταβάλλονται κάποια microRNAs μετά από ένα στεφανιαίο επεισόδιο σχετίζεται και με

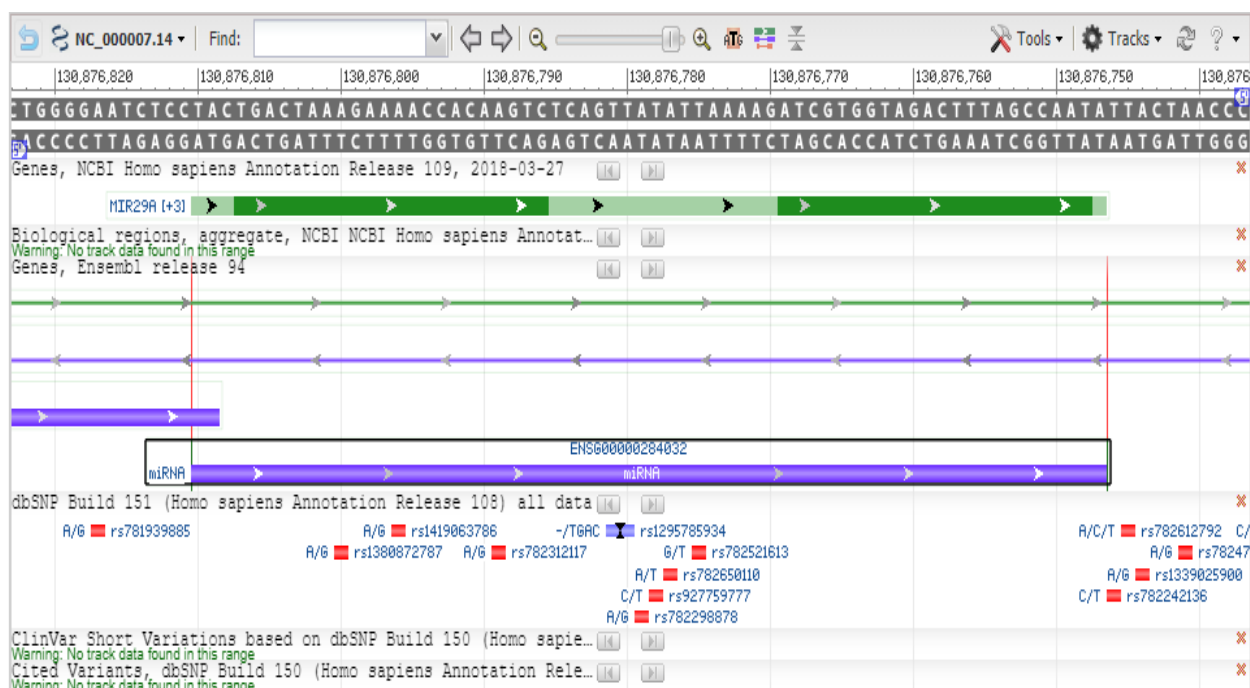
άλλους παράγοντες του περιβάλλοντος. [54] Έρευνες έχουν δείξει επίσης ότι η άσκηση συμβάλλει στη ρύθμιση της έκφρασης πολλών microRNAs, τα οποία είχαν απορυθμιστεί κατά τη διαδικασία εμφάνισης στεφανιαίου επεισοδίου. Κάποια από αυτά τα microRNAs είναι τα miR-29a και miR-101. [55]

Όπως προαναφέρθηκε, αρκετές έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην ανάλυση των miRNAs στο ολικό αίμα, συγκρίνοντας ασθενείς με μάρτυρες. Σε μία πρόσφατη έρευνα ταυτοποιήθηκαν 11 microRNAs, τα οποία υποεκφράζονταν σε ασθενείς, οι οποίοι εκδήλωσαν στεφανιαίο επεισόδιο σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες. Μεταξύ αυτών των microRNAs ήταν και το miR29a-3p, το οποίο είναι και αυτό που εξετάζεται στη συγκεκριμένη εργασία και αναλύεται στην αμέσως επόμενη ενότητα. [56]

1.6.4 Το miR-29a-3p και η στεφανιαία νόσος

Μερικές μελέτες καταδεικνύουν το ρόλο του miR-29a στην εκδήλωση του εμφράγματος. Πριν όμως αναλυθεί η σχέση του συγκεκριμένου microRNA με τη στεφανιαία νόσο και την τελική της εκδήλωση, το έμφραγμα του μυοκαρδίου (myocardial infarction, MI) θα ήταν χρήσιμο να αναφερθούν κάποιες σημαντικές πληροφορίες για το μόριο αυτό. Το μεταγράφο του miR-29a προέρχεται από μη κωδική περιοχή του βραχίονα q του χρωμοσώματος 7 και συγκεκριμένα από τη θέση 7q32.3, όπως προκύπτει από τη βάση δεδομένων Ensembl (GRCh38 p12). Η έκφραση του ελέγχεται αυστηρά από ρυθμιστικούς παράγοντες, όπως συμβαίνει με την έκφραση και των υπολοίπων microRNAs.

Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται οι ακριβείς συντεταγμένες της θέσης από την οποία μεταγράφεται το miR29a (chr 7:130876747-130876810), καθώς και η γενετική αλληλουχία μήκους 63 bp. [57]

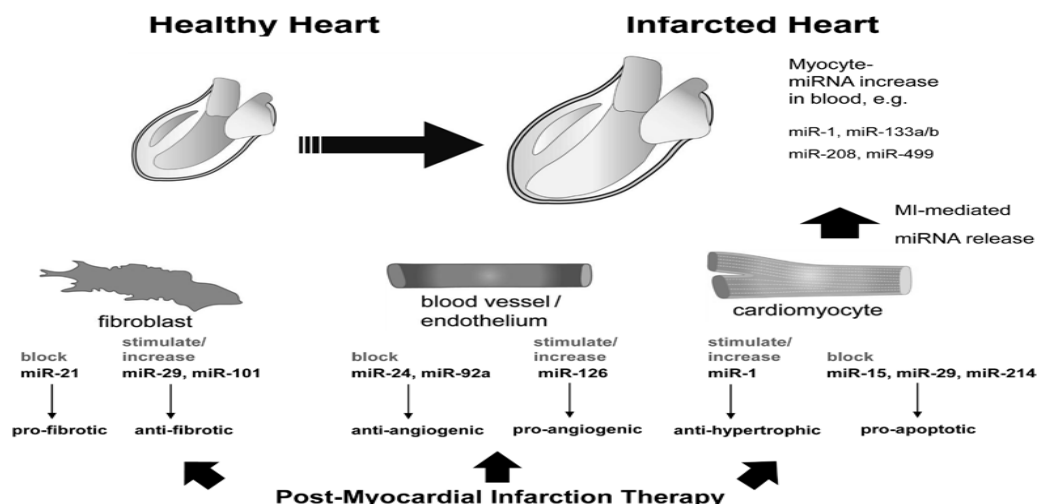


Εικόνα 7: Η ακριβής θέση του χρωμοσώματος 7 από την οποία μεταγράφεται το miR-29a έτσι όπως προκύπτει από την GRCh38 p12 Assembly [57]

Ανάλυση με μικροσυστοιχίες της έκφρασης των microRNAs μετά την εκδήλωση εμφράγματος του μυοκαρδίου επισήμανε το ρόλο κάποιων microRNAs μεταξύ αυτών και του mir-29a στην αναδιαμόρφωση του μυοκαρδίου μετά από ένα ισχαιμικό επεισόδιο. Αυτό το microRNA έχει βρεθεί ότι φυσιολογικά εκφράζεται σε κύτταρα του μυοκαρδίου αλλά η έκφρασή του είναι μεγαλύτερη στους ινοβλάστες. Η μείωση στην έκφρασή του στους ινοβλάστες μετά την εμφάνιση στεφανιαίου επεισοδίου συσχετίστηκε με την παραγωγή κολλαγόνου και τελικά τη δημιουργία ίνωσης. Τόσο σε καλλιέργειες κυτταρικών σειρών όσο και σε ποντίκια, στα οποία είχε προκληθεί ένα πειραματικό ισχαιμικό επεισόδιο βρέθηκε ότι η μείωση του mir-29a οδηγούσε στην απορρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων του κολλαγόνου. Από την άλλη η υπερέκφραση του συγκεκριμένου microRNA σε ινοβλάστες οδήγησε στη μείωση της παραγωγής του κολλαγόνου. [58] Ωστόσο, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η χορήγηση μιμητικών μορίων του mir-29a σε ινοβλάστες, προκάλεσε μόνο μια μέτρια καταστολή του κολλαγόνου, καταδεικνύοντας έτσι ότι η μείωση του miR-29a μπορεί να μην είναι ο πρωταρχικός μηχανισμός για την καρδιακή ίνωση μετά το έμφραγμα. [59]

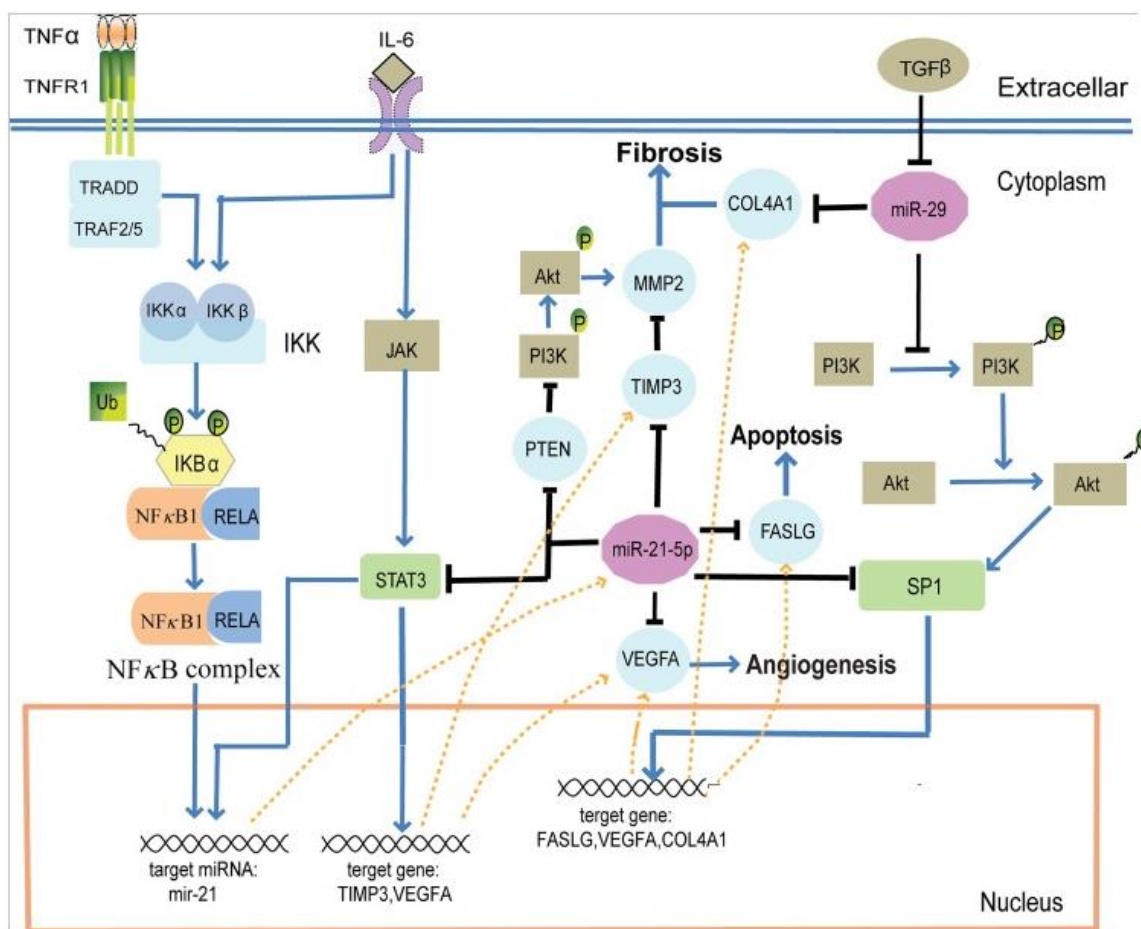
Είναι επίσης πολύ σημαντικό να αναφέρουμε ότι οι Ye και άλλοι έδειξαν ότι στις καρδιές των αρουραίων που υποβλήθηκαν σε ισχαιμικό επεισόδιο, τα μόρια-ανταγωνιστές του mir-29 μείωσαν σημαντικά το μέγεθος του μυοκαρδιακού εμφράγματος. Αυτές οι παρατηρήσεις ευνοούν την άποψη ότι τελικά η καταστολή της οικογένειας miR-29 στα κύτταρα του μυοκαρδίου κι όχι στους ινοβλάστες, προστατεύει τον καρδιακό ιστό σε καταστάσεις στρες, όπως αυτές της ισχαιμίας. Επομένως η μείωση της έκφρασης των mir-29 στα κύτταρα του μυοκαρδίου και η αύξηση αυτής στους ινοβλάστες συμβάλλουν στην προστασία του καρδιακού μυ από το έμφραγμα [60]

Η παρακάτω εικόνα απεικονίζει τη συμβολή του mir-29, αλλά και άλλων microRNAs στις διάφορες διαδικασίες μετά την εμφάνιση του εμφράγματος και φαίνονται τα «δύο πρόσωπα» του συγκεκριμένου microRNA, όπως ανέφερε η Slusarz και η ομάδα της. Η φαρμακευτική αγωγή την οποία ακολουθούν οι ασθενείς μετά την εκδήλωση του στεφανιαίου επεισοδίου στοχεύει τη ρύθμιση των βιολογικών μονοπατιών, τα οποία διαταράσσονται μετά το έμφραγμα. Συγκεκριμένα τα φάρμακα στοχεύουν στην αύξηση του mir-29a στα κύτταρα των ινοβλαστών, η οποία τελικά μπορεί να οδηγήσει στη μείωση της ίνωσης. Από την άλλη αρκετά άλλα φάρμακα, τα οποία χορηγούνται μετά την εκδήλωση του εμφράγματος στοχεύουν στο να μπλοκάρουν την έκφραση του mir-29 στα κύτταρα του μυοκαρδίου ενισχύοντας έτσι την προ-αποπτωτική διαδικασία κυρίως, ενώ εμποδίζουν και την υπερτροφία του καρδιακού μυός και μειώνουν έτσι τη στένωση από την πάχυνση του μυοκαρδίου. [61]



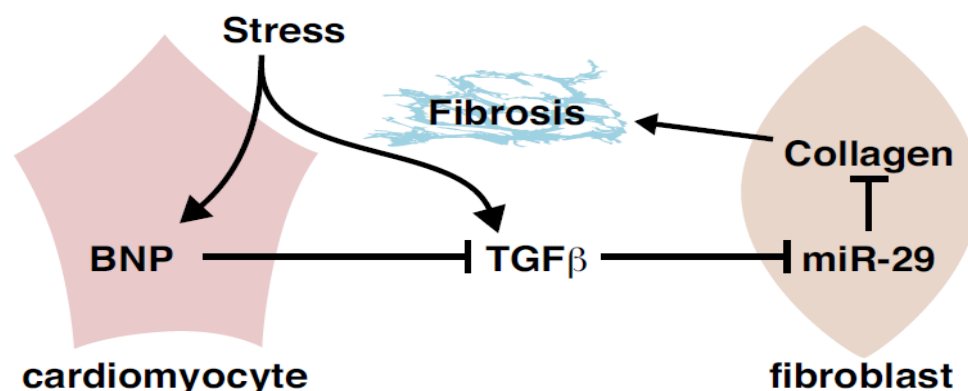
Εικόνα 8: Τα καρδιακά κύτταρα υφίστανται φαινοτυπικές αλλαγές κατά τη διάρκεια του ισχαιμικού επεισοδίου και συγκεκριμένα microRNAs συμμετέχουν στη ρύθμιση του πεπρωμένου των κυττάρων μετά από το έμφραγμα του μυοκαρδίου. Η θεραπεία μετά το επεισόδιο στοχεύει στη ρύθμιση όλων των μοριακών μονοπατιών στους ινοβλάστες, στα κύτταρα του μυοκαρδίου και του ενδοθηλίου [61]

Επίσης υπάρχουν και άλλες έρευνες που προτείνουν ότι η οικογένεια miR-29 (συμπεριλαμβανομένων των miR-29a-3p) και άλλων miRNAs, όπως η οικογένεια miR-21, αλληλεπιδρούν με άλλα μόρια σε αρκετές σημαντικές βιολογικές οδούς που εμπλέκονται στην εκδήλωση στεφανιαίου επεισοδίου, την αγγειογένεση και την απόπτωση. Κατά την εκδήλωση του εμφράγματος ενεργοποιούνται παράγοντες φλεγμονής, οι οποίοι φαίνεται να επιδρούν στη ρύθμιση της έκφρασης του miR-29, με αποτέλεσμα αυτό να υποεκφράζεται και την επακόλουθη αυξημένη ρύθμιση της έκφρασης κολλαγόνων και άλλων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην απόφραξη των αγγείων, όπως προαναφέρθηκε. Η παρακάτω εικόνα απεικονίζει ένα πιθανό μοντέλο με το δίκτυο ρύθμισης μετά τα πρώτα εικοσιτετράωρα εκδήλωσης του εμφράγματος, στο οποίο εμπλέκεται το miR-29. Στο δίκτυο φαίνεται η αλληλεπίδραση του συγκεκριμένου microRNA με άλλα microRNAs και παράγοντες φλεγμονής. [62]



Εικόνα 9: Προτεινόμενο μοντέλο ρύθμισης της έκφρασης κάποιων miRNAs που εκφράζονται στους ινοβλάστες κατά την εκδήλωση εμφράγματος του μυοκαρδίου [62]

Είναι λοιπόν φανερό ότι το συγκεκριμένο microRNA εμπλέκεται σε μονοπάτια που αφορούν την εκδήλωση του εμφράγματος, μέσω πολύπλοκων μηχανισμών και με την αλληλεπίδραση με άλλα μόρια όπως παράγοντες φλεγμονής, άλλα microRNAs και άλλα ενδοκυττάρια μόρια. [61] [62] Η έκφραση του mir-29a επηρεάζεται έμμεσα από αρκετά άλλα μόρια ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια. Αξίζει όμως, να αναφερθεί ότι η δράση του μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα β (transforming growth factor beta, TGF-b) μετά την εκδήλωση του στεφανιαίου επεισοδίου, είναι αυτή που άμεσα επηρεάζει την έκφραση του mir-29a, ιδίως στους ινοβλάστες. Πιο συγκεκριμένα, μετά το επεισόδιο το στρες οδηγεί στην αύξηση του TGF-b, ο οποίος στη συνέχεια οδηγεί στη μείωση της έκφρασης του mir-29a στους ινοβλάστες κι ενισχύει τη διαδικασία της ίνωσης. Παράλληλα τα κύτταρα του μυοκαρδίου παράγουν μία καρδιακή ορμόνη, το εγκεφαλικό νατριουρητικό πεπτίδιο (brain natriuretic peptide, BNP), η οποία συμβάλλει στην αντιμετώπιση της δράσης του TGF-b και της ίνωσης. Η εικόνα που ακολουθεί συνοψίζει τα βιολογικά αυτά μονοπάτια μετά την εκδήλωση του στεφανιαίου επεισοδίου. [59] [61]



Εικόνα 10: Προτεινόμενο μοντέλο απόκρισης του miR-29 και του TGF-β ύστερα από το στρες του ισχαιμικού επεισοδίου [59]

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι υπάρχουν μελέτες, οι οποίες υποστηρίζουν ότι η έκφραση του miR-29a μετά από ένα ισχαιμικό επεισόδιο μπορεί να επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Πιο συγκεκριμένα σε ποντίκια, στα οποία είχε προκληθεί ισχαιμικό επεισόδιο πειραματικά βρέθηκε ότι το miR-29a μειώνεται μετά το επεισόδιο. Τα ποντίκια υποβλήθηκαν σε ελεγχόμενη αερόβια άσκηση για τρεις εβδομάδες. Ύστερα από την άσκηση το miR-29a παρουσίασε αύξηση, αναστέλλοντας το μονοπάτι της κυταροκίνης του μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα β (transforming growth factor beta, TGF-β) και μειώνοντας την ίνωση. Η άσκηση, λοιπόν φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση του συγκεκριμένου microRNA στους ασθενείς με οξύ στεφανιαίο επεισόδιο, ενώ αξίζει να μελετηθούν και άλλοι παράγοντες του περιβάλλοντος που μπορεί να επηρεάζουν την έκφραση του. [55]

1.7 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της έκφρασης του miR-29a-3p σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο επεισόδιο. Αναλυτικότερα ελέγχθηκε η πιθανή διαφοροποίηση στην έκφραση του συγκεκριμένου microRNA μεταξύ ασθενών με στεφανιαία νόσο και μαρτύρων αλλά και μεταξύ δύο χρονικών στιγμών κατόπιν της εκδήλωσης στεφανιαίου επεισοδίου. Πιο συγκεκριμένα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν αποσκοπούσαν αρχικά στην ανάδειξη τυχόν διαφοροποιήσεων στην έκφραση του συγκεκριμένου microRNA μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. Κατόπιν έγινε έλεγχος για τη διαφοροποίηση της έκφρασης του miR-29a-3p μεταξύ δύο χρονικών στιγμών, συγκεκριμένα έως τρεις μέρες και έξι μήνες μετά το επεισόδιο στους ασθενείς. Στη συνέχεια μελετήθηκε αν αυτή η διαφορά είχε σχέση με άλλους παράγοντες, όπως τους δείκτες φλεγμονής ιντερλευκίνη 6 (interleukin 6, IL-6) και τον αυξητικό παράγοντα νέκρωσης α (tumor necrosis factor α, TNF-α), την επανανοσηλεία, λόγω εκδήλωσης νέου επεισοδίου και το περιβάλλον. Όσον αφορά τους περιβαλλοντικούς παράγοντες συγκεκριμένα σε αυτούς συγκαταλέχθηκαν ο τρόπος ζωής, το ιατρικό και οικογενειακό ιστορικό, οι καπνιστικές συνήθειες και η φυσική δραστηριότητα των συμμετεχόντων. Το microRNA επιλέχθηκε ύστερα από βιβλιογραφική αναζήτηση, καθώς όπως προαναφέρθηκε και στην προηγούμενη ενότητα αρκετές έρευνες έχουν δείξει πως εμπλέκεται σε μονοπάτια εκδήλωσης του εμφράγματος του μυοκαρδίου που αποτελεί και τη δεύτερη πιο επικίνδυνη εκδήλωση της στεφανιαίας νόσου μετά τον αιφνίδιο θάνατο. Επίσης υπάρχουν και λιγότερες μελέτες που καταδεικνύουν ότι η έκφραση του συγκεκριμένου

microRNA μετά την εκδήλωση του επεισοδίου μπορεί να επηρεάζεται και από το περιβάλλον, όπως είναι η άσκηση.

Τα δείγματα αίματος καθώς και ερωτηματολόγια συλλέχθηκαν από ασθενείς στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «Αττικό» ύστερα από την ενυπόγραφη συγκατάθεσή τους. Όσον αφορά τα δείγματα των υγιών, αυτά συλλέχθηκαν από εθελοντές, στους οποίους ελέγχθηκε το ιατρικό τους ιστορικό για όλες τις πιθανές εκδηλώσεις του μεταβολικού συνδρόμου και ιδίως για τη στεφανιαία νόσο.

Από τα ερωτηματολόγια που συμπλήρωσαν οι ασθενείς συλλέχθηκαν τα στοιχεία για τους περιβαλλοντικούς παράγοντες και την επανανοσηλεία.

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 Συμμετέχοντες

Η έκφραση του miR-29a-3p μελετήθηκε σε 35 ασθενείς με μέσο όρο ηλικίας τα 57,5 έτη. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «Αττικό» και η συμμετοχή ήταν εθελοντική κατόπιν ενυπόγραφης συναίνεσης των συμμετεχόντων. Ο σχεδιασμός και η διεξαγωγή της συγκεκριμένης μελέτης είχε την έγκριση της Επιτροπής Βιοηθικής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου. Μετά από το πέρας τουλάχιστον 6 μηνών από τη νοσηλεία, πραγματοποιήθηκε επικοινωνία με τους εθελοντές, στους οποίους ζητήθηκε να επισκεφτούν το νοσοκομείο που νοσηλεύτηκαν και συλλέχθηκαν δεδομένα με παρόμοιο τρόπο.

Επιπλέον πραγματοποιήθηκε η συλλογή δείγματος από 20 υγιή άτομα, ώστε να γίνει η απομόνωση του miR-29a-3p να ελεγχθεί και να συγκριθεί η έκφρασή του με αυτή των ασθενών.

2.2 Σχεδιασμός της έρευνας

Συγκεκριμένα για την έρευνα επιλέγονται ασθενείς με βάση τα παρακάτω κριτήρια:

- I. οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (OEM) η διάγνωση του οποίου βασίζεται στα τυπικά χαρακτηριστικά του ηλεκτρο-καρδιο-γραφήματος (ΗΚΓ), σε θετική δοκιμασία για τροπονίνη και στη νοσηλεία
- II. οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (ΟΣΣ),
- III. ασταθή στηθάγχη, με ανάσπαση του ST τμήματος ή χωρίς ανάσπαση του ST τμήματος (STEMI-NSTEMI), τα οποία τα βρίσκουμε από το ηλεκτρο-καρδιο-γράφημα και από θετικούς βιο-δείκτες νέκρωσης, όπως η τροπονίνη απουσία ανάσπασης του ST τμήματος.

Στο σημείο αυτό υιοθετείται ο ορισμός του εμφράγματος του μυοκαρδίου, όπως δίνεται από τους Thygesen et al., στο “the third universal definition of myocardial infraction” και περιλαμβάνει ασθενείς με:

Επίπεδα τροπονίνης 1 μεγαλύτερα ή ίσα από 0,1 ng/ml (ή άλλο καρδιακό βιοδείκτη) και τουλάχιστον ένα από τα επόμενα: συμπτώματα ισχαιμίας, καινούργιες ή θεωρούμενα καινούργιες σημαντικές αλλαγές στα κύματα του ST τμήματος ή καινούργια LBBB, παθολογικά Q κύματα στο ΗΚΓ, απεικονιστικές αποδείξεις από νέα απώλεια ζωτικού μυοκαρδίου, ταυτοποίηση ενός ενδο-στεφανιαίου θρόμβου στην αγγειογραφία.

Πρωτογενής αγγειοπλαστική σχετιζόμενη με OEM.

Θρόμβωση του στεντ που σχετίζεται με OEM όταν ταυτοποιείται από στεφανιαίο αγγειογράφημα.

Εγχείρηση αορτοστεφανιαίας παρακάμψεως σχετιζόμενη με OEM που ταυτοποιείται από αύξηση των τιμών των βιοδεικτών (5 με 10 φορές ή πάνω από το 99^ο τεταρτημόριο), με (i) νέα παθολογικά κύματα Q ή νέο LBBB, ή (ii) αγγειογραφικά τεκμηριωμένο νέο μόσχευμα ή καινούρια έμφραξη αρτηρίας, ή (iii) ένα θετικό απεικονιστικό τεστ. [63]

2.3 Τα μέσα συλλογής δεδομένων της έρευνας

Τα δεδομένα συλλέχθηκαν από την επεξεργασία δείγματος αίματος και από ερωτηματολόγια, τα οποία λήφθηκαν και στις δύο φάσεις. Πιο συγκεκριμένα τα δεδομένα των ερωτηματολογίων συλλέχθηκαν με συνέντευξη και σε αυτά περιλαμβάνονταν: ανθρωπομετρικά δεδομένα, κλινικά δεδομένα, ερωτηματολόγιο τρόπου ζωής, καπνιστικές συνήθειες, ερωτηματολόγιο φυσικής δραστηριότητας, διατροφικές συνήθειες, ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων κι ερωτηματολόγιο για την υγεία. Τέλος από τον ιατρικό φάκελο του ασθενούς απομονώθηκαν στοιχεία από αιματολογικές εξετάσεις, από την φαρμακευτική αγωγή και η διάγνωση.

2.3.1 Δεδομένα ερωτηματολογίου

Τα ερωτηματολόγια και των δύο φάσεων περιλαμβάνουν τις ίδιες ενότητες ερωτήσεων με τη διαφορά ότι στη δεύτερη επίσκεψη ο εθελοντής δε ρωτάται ξανά ερωτήσεις που αφορούν μη μεταβλητές καταστάσεις. Επίσης στην ενότητα που αφορά τις διατροφικές συνήθειες, κατά τη δεύτερη φάση συμπληρώνεται επίσης η διατροφική ανάκληση του εικοσιτετράωρου. Παρακάτω αναλύονται τα δεδομένα του ερωτηματολογίου.

Ανθρωπομετρικά δεδομένα

Στην ενότητα αυτή περιλαμβάνονται ερωτήσεις που αφορούν το βάρος και αν υπήρχε αυξομείωση το τελευταίο διάστημα, το ύψος, αν είναι αριστερόχειρας ή δεξιόχειρας, το χρώμα και το σχήμα μαλλιών, το χρώμα ματιών και τέλος ο τύπος και η ηλικία έναρξης της ανδρογενετικής αλωπεκίας.

Κλινικά δεδομένα

Από τη συνέντευξη ή από τον ιατρικό φάκελο συλλέγονται τα εξής στοιχεία: η ομάδα αίματος, η αρτηριακή πίεση, στοιχεία του έμμηνου κύκλου (διάρκεια, ηλικία έναρξης και λήξη, ύπαρξη αμηνόρροιας, ο αριθμός τέκνων κ.ά.), η φαρμακευτική αγωγή, χειρουργικές επεμβάσεις, διαγνωσμένες από ιατρό ασθένειες, πόνοι σε ισχίο, γόνατα ή πλάτη, κατάγματα από την ηλικία των 16ετών, οικογενειακό ιστορικό συγγενών 1^{ου} βαθμού και αν οι γονείς είναι εν ζωή και από τι πέθαναν αν δεν είναι.

Ερωτηματολόγια τρόπου ζωής

Περιλαμβάνονται πληροφορίες για τη συζυγική κατάσταση, το μορφωτικό επίπεδο και την επαγγελματική κατάσταση.

Καπνιστικές συνήθειες

Σε αυτό το τμήμα, συλλέγονται πληροφορίες αν ο εθελοντής καπνίζει καθημερινά, περιστασιακά ή καθόλου. Στην περίπτωση που κάπνιζε συμπληρώνεται η ηλικία έναρξης (και η ηλικία που το σταμάτησε αν ήταν παλιός καπνιστής), τα χρόνια καπνίσματος, το είδος τους τσιγάρου και η ποσότητα σε ημερήσια βάση, καθώς και αν ήταν παθητικός καπνιστής.

Ερωτηματολόγιο φυσικής δραστηριότητας

Για τον υπολογισμό του επιπέδου της φυσικής δραστηριότητας το ερωτηματολόγιο περιλαμβάνει στοιχεία που αφορούν τις συνθήκες εργασίας, εφόσον ο εθελοντής εργάζεται, τη φυσική δραστηριότητα στο σπίτι, τη φυσική δραστηριότητα που αφορά την ψυχαγωγία, το είδος και τις ώρες άσκησης ανά εβδομάδα καθώς και το μέσο μετακίνησης.

Διατροφικές συνήθειες

Στην ενότητα αυτή περιέχονται στοιχεία για το αν ο εθελοντής ετοιμάζει τα γεύματα μόνος του και κατά πόσο τρώει μόνος του, στο πόσο συχνά τρώει μαγειρεμένο φαγητό, στο αν έχει προβλήματα μάσησης, στο κατά πόσο καταναλώνει προμαγειρεμένα φαγητά, στο αν ακολουθεί ειδική διατροφή, στο αν χρησιμοποιεί διατροφικά συμπληρώματα, στο κατά πόσο χρησιμοποιεί το αλάτι και στο αν δεν καταναλώνει τρόφιμα για λόγους θρησκείας.

Ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων

Το τμήμα αυτό αφορά τη συχνότητα κατανάλωσης διαφόρων τροφίμων από όλες τις ομάδες τροφίμων και τα σημαντικά τρόφιμα (συνολικά 75 σε αριθμό) εκ των οποίων οι επιλογές είναι: ποτέ/σπάνια, 1-3 φορές το μήνα, 1-2 φορές τη βδομάδα, 3-6 φορές τη βδομάδα, 1 φορά τη μέρα και 2 ή περισσότερες φορές τη μέρα. Οι μερίδες που χρησιμοποιούνται είναι οι κοινώς αποδεκτές μετρημένες σε συχνά χρησιμοποιούμενες μεζούρες, όπως ένα φλιτζάνι ή 30gr τυρί ή ψωμί.

Ερωτηματολόγιο για την υγεία

Ερευνάται αν υπάρχει πρόβλημα και σε τι βαθμό όσον αφορά την κινητικότητα, την αυτοεξυπηρέτηση, στις συνηθισμένες δραστηριότητες, τον πόνο/δυσφορία και το άγχος/θλίψη. Τέλος ο εθελοντής καλείται να απαντήσει στο πως αισθάνεται την υγεία του σημειώνοντας ένα χ σε μια κλίμακα από το 0 μέχρι το 100, με το 0 να είναι η χειρότερη υγεία που χει φανταστεί και το 100 η καλύτερη.

Στοιχεία Αιματολογικών εξετάσεων

Οι αιματολογικές εξετάσεις περιελάμβαναν την πλήρη εξέταση αίματος και τα επίπεδα σημαντικών παραγόντων όπως η τροπονίνη, η γλυκόζη, η ολική χοληστερόλη, η LDL, τα τριγλυκερίδια, η CRP και η CPK. Ιδανικά η αιμοληψία πραγματοποιήθηκε μετά από πολύωρη νηστεία.

2.3.2 Συλλογή δείγματος αίματος, ορού πλάσματος και λευκοκυττάρων

Πραγματοποιήθηκε από συνεργαζόμενους γιατρούς η συλλογή δειγμάτων αίματος ένα φιαλίδιο των 5ml και δύο των 3ml στην πρώτη φάση και ένα των 5ml και ένα των 3ml στη δεύτερη φάση από κάθε εθελοντή. Από αυτά απομονώθηκαν και αποθηκεύτηκαν πλάσμα, ορός και αιμοποιητικά κύτταρα.

Απομόνωση ορού, πλάσματος και κυττάρων του αίματος

Τα φιαλίδια με το αίμα φυγοκεντρούνται στις 3000 στροφές/λεπτό στους 4°C για 10 λεπτά. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, κατά την πρώτη φάση απομονώνονται 2 eppendorfs των 2ml για το πλάσμα, τον ορό και τα κύτταρα του αίματος αντίστοιχα και αποθηκεύονται

στους -80° C. Στη δεύτερη φάση ακολουθείται όμοια διαδικασία αλλά απομονώνονται 2 erpendorfs για τον ορό, 1 για το πλάσμα και 1 για τα αιμοποιητικά κύτταρα. Τα λευκοκύτταρα θα χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση του DNA για τη μελέτη της γενετικής προδιάθεσης της ασθένειας, ενώ ο ορός και το πλάσμα για τη μέτρηση βιοχημικών παραγόντων και την απομόνωση RNA.

2.3.3 Συλλογή δεδομένων για τα επίπεδα των κυτταροκινών TNF-a και IL-6

Τα δεδομένα που αφορούσαν τις τιμές των κυτταροκινών IL-6 και TNF-a κατά τις δύο χρονικές στιγμές συλλέχθηκαν κατόπιν μέτρησης των συγκεκριμένων παραγόντων φλεγμονής στον ορό των ασθενών με τη χρήση της μεθόδου ELISA. Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά τα βήματα του πρωτοκόλλου για τα kit Human TNF-a Quantikine HS και Human IL-6 Quantikine HS ELISA :

Προσθήκη 100μl διαλύματος Assay Diluent RDF1, ώστε να καλυφθούν τα σημεία εκείνα τα οποία είναι κενά μεταξύ των ακινητοποιημένων αντισωμάτων

Προσθήκη 100 μl (σε κάθε πηγαδάκι) του δείγματος και του standard.

Επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Πλύσεις με 400 μl (σε κάθε πηγαδάκι) με wash buffer

Προσθήκη 100 μl (σε κάθε πηγαδάκι) του Human TNF-a HS Conjugate και του Human IL-6 HS Conjugate . Πρόκειται για το ενζυμο-συζευγμένο αντίσωμα με αλκαλική φωσφατάση.

Επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ανάδευση

Πλύσεις με 400 μl (σε κάθε πηγαδάκι) με wash buffer

Προσθήκη 50 μl (σε κάθε πηγαδάκι) Substrate Solution. Πρόκειται για το υπόστρωμα τις αντίδρασης, το NADPH

Επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου

Προσθήκη 50 μl (σε κάθε πηγαδάκι) Amplifier Solution, ώστε να παραχθεί το έγχρωμο προϊόν

Επώαση για 30min σε θερμοκρασία δωματίου

Προσθήκη 50 μl (σε κάθε πηγαδάκι) Stop Solution

Μέτρηση της έντασης του έγχρωμου προϊόντος στα 490nm και στα 650nm. Η διαφορά ανάμεσα στις δύο τιμές των απορροφήσεων θα διόρθωσε τις οπτικές αποκλίσεις.

Κατόπιν των μετρήσεων της απορρόφησης χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό 4-PL curve fit, μέσω του οποίου κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη με τις συγκεντρώσεις και τις απορροφήσεις των standards και πραγματοποιείται η εύρεση της εξίσωσης ώστε να υπολογιστούν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων για κάθε κυτταροκίνη.

2.4 Διαδικασία της μελέτης έκφρασης του mir-29a-3p

Η μελέτη της έκφρασης του mir-29a-3p ως βιοδείκτη για την ασθένεια πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των μεθόδων ποσοτικής Reverse-transcription PCR (Polymerase Chain Reaction) και Real-time PCR, αφού έγινε η απομόνωση του RNA από το πλάσμα.

2.4.1 Παράγοντες που επηρεάζουν τη συνολική διαδικασία

Προτού αναλυθούν τα πρωτόκολλα, αξίζει να σημειωθούν όλα τα κρίσιμα σημεία, τα οποία πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά το χειρισμό των δειγμάτων και τον έλεγχο των διακυμάνσεων μεταξύ αυτών. Στο συγκεκριμένο πείραμα η απομόνωση έγινε από πλάσμα και δεν ήταν εφικτό να γίνει απευθείας από τον καρδιακό ιστό. Σύμφωνα με έρευνες που έχουν διεξαχθεί μέχρι τώρα, τόσο από το πλάσμα όσο και από τον ορό απομονώνεται σχεδόν η ίδια ποσότητα RNA. Το πλάσμα είναι προτιμότερο να συλλέγεται σε σωληνάριο EDTA ή κιτρικού, καθώς η ηπαρίνη, η οποία χρησιμοποιείται επίσης ως αντιπηκτικό, μπορεί να αναστείλει την αντίδραση της PCR.

Υπάρχουν και άλλες μεταβλητές, οι οποίες πριν την ανάλυση θα πρέπει να ελεγχθούν. Μία από αυτές είναι η χρονική στιγμή που θα γίνει η απομόνωση του πλάσματος. Το πλάσμα απομονώνεται την ίδια μέρα με αυτή της αιμοληψίας, και γενικά όσο πιο σύντομα γίνεται μετά τη λήψη αίματος, καθώς τα κύτταρα του αίματος έχουν RNAses, ένζυμα που διασπούν το RNA. Μετά την απομόνωσή του το πλάσμα αποθηκεύεται στους -80°C.

Επίσης είναι προτιμότερο η συλλογή αίματος να γίνεται μετά από νηστεία, καθώς φαγητά πλούσια σε λιπαρά μπορεί να οδηγήσουν σε λιπαιμία στο αίμα και να επηρεάσουν την εκχύλιση του RNA. Επιπλέον η ποσότητα του miRNA μελλοντικά μπορεί να επηρεαστεί από τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων, από ημερήσιες διακυμάνσεις των miRNAs, αλλά και συνολικά από τα μέσα συλλογής δείγματος και τη φλεβοτομή. Αυτοί όλοι οι παράγοντες ευλόγως μπορεί να επηρεάσουν την εκχύλιση του RNA αλλά και την ικανότητα της αντίδρασης της PCR να οδηγήσει σε ορθή ποσοτικοποίηση.

Συνήθως κάποιοι από τους συγχυτικούς παράγοντες, όπως η μη ορθή εκχύλιση του RNA, η αποδοτικότητα της Reverse transcription PCR και η παρουσία αναστολέων της PCR μπορούν να ελεγχθούν με την χρήση συνθετικών μη ανθρώπινων microRNAs, τα οποία προστίθενται κατά την απομόνωση του RNA και μετέπειτα μας δίνεται η δυνατότητα να ελέγξουμε το ποσοστό ανάκτησης του RNA μεταξύ των δειγμάτων και να αξιολογήσουμε ως ένα βαθμό την απόδοση της απομόνωσης.

Το συνθετικό miRNA, cel-miR-39-3p με αλληλουχία 5'-UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG-3' από το *C.elegans*, χρησιμοποιείται σε αρκετά πειράματα σε γνωστή συγκέντρωση των 10pM ως εξωγενές control. Το cel-miR-39-3p προστίθεται τις περισσότερες φορές σε αρχικό στάδιο της απομόνωσης του RNA από το πλάσμα και υπόκεινται σε όλη τη διαδικασία της απομόνωσης. Έτσι αυτό το microRNA μετράται τελικά με τη Real-Time PCR, χρησιμεύοντας έτσι στην ομαλοποίηση των «τεχνικών διακυμάνσεων» μεταξύ των δειγμάτων. Αξίζει να σημειωθεί ότι για την ανάλυση των αποτελεσμάτων μας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του global normalization, επομένως το εξωγενές cel-miR-39-3p δεν χρειάστηκε για την κανονικοποίηση των δειγμάτων, αλλά οι τιμές των Ct του εξωγενούς για κάθε δείγμα ελέγχθηκαν. Είναι σημαντικό τα Ct του εξωγενούς να μη διαφέρουν από δείγμα σε δείγμα διαφορετικά η εκχύλιση του RNA ή/και η αντίδραση της PCR σημαίνει πως επηρεάστηκαν από τους προαναφερθέντες συγχυτικούς παράγοντες.

Ο έλεγχος των δειγμάτων ως προς τη «βιολογική μεταβλητότητα» δεν είναι καλά αναπτυγμένος, γιατί οι παράγοντες που οδηγούν σε βιολογικές παραλλαγές ανεξάρτητες από την υπό μελέτη ασθένεια δεν είναι γνωστοί και η επίδρασή τους σε συγκεκριμένα miRNAs δεν έχει χαρακτηριστεί. Προς το παρόν, δεν μπορούμε λοιπόν να υποστηρίξουμε κανένα συγκεκριμένο miRNA ή σύνολο miRNAs ως κατάλληλα για ενδογενείς ελέγχους, καθώς δεν είμαστε σε θέση ακόμα να γνωρίζουμε πως μεταβάλλεται η έκφραση κάθε miRNA, κατά την εκδήλωση διαφορετικών ασθενειών.

Η χρήση των λεγόμενων "αμετάβλητων" miRNA για ενδογενή έλεγχο έχουν προταθεί από ορισμένους ερευνητές. Τα microRNAs αυτά τα οποία εκφράζονται σε υψηλά και σταθερά επίπεδα στο πλάσμα μπορούν να συμβάλλουν στον εντοπισμό δειγμάτων που μπορεί να είναι χαμηλής ποιότητας σε σχέση με άλλα. Στο συγκεκριμένο πείραμα προτάθηκε αρχικά να χρησιμοποιηθεί ως ενδογενές control το hsa-miR-191-5p με αλληλουχία 5'-CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG-3', το οποίο μετρήθηκε κατά τη Real-Time PCR. Η έκφραση του συγκεκριμένου miRNA συνέβαλε στον έλεγχο ποιότητας των δειγμάτων, καθώς αν ένα δείγμα δεν είχε αποτέλεσμα από Ct ούτε για το ενδογενές, τότε αυτό μας οδηγούσε στο συμπέρασμα πως λόγω μακροχρόνιας αποθήκευσης του πλάσματος στην κατάψυξη πιθανότατα το δείγμα δεν έδινε ικανοποιητική ποσότητα RNA.

2.4.2 Ανάλυση πρωτοκόλλων

Παρακάτω αναλύονται όλα τα πρωτόκολλα από τη φάση της απομόνωσης μέχρι και την εξαγωγή των αποτελεσμάτων της Real-Time PCR.

➤ Απομόνωση RNA με τη χρήση MagMAX mirVANA Total RNA Isolation Kit:

Ανάλυση της διαδικασίας απομόνωσης RNA από πλάσμα:

1. Προθέρμανση του Elution Buffer σε θερμαντική πλάκα στους 65 °C. Υπολογίστηκαν 50 μl Elution Buffer για κάθε δείγμα, συνυπολογίζοντας το 10%
2. Προετοιμασία του διαλύματος του ενζύμου DNase σύμφωνα με τις οδηγίες του παρακάτω πίνακα. Vortex and spin down.

Πίνακας 2: Ποσότητες για την παρασκευή του TURBO DNase

Υλικά	Όγκος ανά δείγμα
MagMAX TURBO DNase Buffer	45 μl
TURBO Dnase	5 μl
Total DNase Solution	50 μl

3. Προετοιμασία του διαλύματος του ενζύμου της πρωτεϊνάσης K, σύμφωνα με τις οδηγίες του παρακάτω πίνακα. Vortex and spin down.

Πίνακας 3: Ποσότητες για την παρασκευή του PK Digestion Mix

Υλικά	Όγκος ανά δείγμα
PK Digestion Buffer	45 μl
Proteinase K	5 μl
Total PK Digestion Mix	50 μl

** Αν είχε θολερότητα το PK Digestion Buffer προθερμαινόταν στους 37 °C για 5-10min.

4. Προσθήκη 50μl από το PK Digestion Mix σε 100 μl δείγματος (πλάσμα).

5. Τοποθέτηση στο shaker (at 900rpm for 5minutes)

6. Επώαση στη θερμαντική πλάκα στους 65 °C για 30min.

Αφού έγινε η «λύση» των δειγμάτων και διασπάστηκαν οι πρωτεΐνες με τη χρήση πρωτεϊνάσης K, το RNA έπρεπε να συνδεθεί στα RNA Binding Beads, οπότε στο στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκε η προετοιμασία του Lysis Binding Mix. Το RNA συνδέθηκε πάνω στους μαγνήτες, μέσω εφαρμογής μαγνητικού πεδίου. Υπάρχουν διαφόρων ειδών μαγνητικά σφαιρίδια, που έχουν πυρήνα σιδήρου και φέρουν στην επιφάνειά τους κατάλληλη επικάλυψη για τη δέσμευση των επιθυμητών μορίων. Τα μαγνητικά σφαιρίδια μπορούν να έχουν στην επιφάνειά τους ένα δευτερογενές αντίσωμα που δεσμεύει ένα πρωτοταγές αντίσωμα επιλογής, επικάλυψη στρεπταβιδίνης για δέσμευση βιοτυνιλιωμένων προϊόντων, ουρά πολυ-T για απομόνωση mRNA ή επικάλυψη πυριτίου στην περίπτωση της δέσμευσης νουκλεϊκών οξέων.

7. Προετοιμασία του Lysis Binding Mix, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα. Vortex and spin down.

Πίνακας 4: Ποσότητες για την παρασκευή του Lysis Binding Mix

Υλικά	Όγκος ανά δείγμα
Lysis Buffer	99 µl
2-mercaptoethanol	1 µl
Total Lysis Binding Mix	100 µl

Στο Lysis Buffer προστέθηκε 1µl για κάθε δείγμα από το εξωγενές miRNA.

8. Προσθήκη 100µl Lysis Binding Mix σε κάθε δείγμα.

9. Προσθήκη 20 µl RNA Binding Beads σε κάθε δείγμα και κάνουμε ήπιο vortex

10. Τοποθέτηση στο shaker (at 700rpm for 7min.)

11. Ήπιο vortex και προσθήκη 270 µl ισοπροπανόλης πιπετάροντας 5 φορές πάνω-κάτω και κάνοντας ήπιο vortex. (Η ισοπροπανόλη προκαλεί αφυδάτωση και συμβάλλει στη σύνδεση του RNA πάνω στους μαγνήτες πυριτίου)

12. Τοποθέτηση στο shaker (at 400rpm for 15min.)

Στο στάδιο αυτό ξεκίνησε ο περαιτέρω καθαρισμός του RNA, που συνδέθηκε στους μαγνήτες και απομακρύνθηκαν τα μη ειδικά συνδεδεμένα μόρια.

13. Τοποθέτηση των eppendorfs στο Magnetic-Stand, μέχρι το διάλυμα να καθαρίσει από τους μαγνήτες και να μείνει το υπερκείμενο.

14. Απορρίφθηκε με προσοχή το υπερκείμενο χωρίς να προκληθεί αναταραχή με στους μαγνήτες.

15.Απομάκρυνση των eppendorfs από το Magnetic-Stand και προσθήκη 150 μl από το Wash Solution 1 σε κάθε δείγμα. Ήπιο vortex.

16.Τοποθέτηση στο shaker (at 900rpm for 1min.)

17.Τοποθέτηση ξανά τα eppendorfs στο Magnetic-Stand, μέχρι το διάλυμα να καθαρίσει από τους μαγνήτες και να μείνει το υπερκείμενο.

18.Απόρριψη με προσοχή το υπερκείμενο χωρίς να προκαλέσουμε αναταραχή με στους μαγνήτες.

19. Προσθήκη 150μl WashSolution 2 κι επανάληψη των βημάτων 15-18.

20.Απομακρύνθηκαν από το Magnetic-Stand τα eppendorfs και τοποθετήθηκαν ανοιχτά στο shaker στους 37 oC για 6min στα 1150rpm.

Τα δείγματα ελέγχονταν όσο ήταν στο shaker, καθώς υπήρχε ο κίνδυνος εξάτμισης των μαγνητών, χάνοντας έτσι ποσότητα RNA.

Στο στάδιο αυτό έπρεπε να γίνει η απομάκρυνση του DNA, οπότε προστέθηκε η DNase.

21.Προσθήκη 50μl από το διάλυμα του ενζύμου TURBO DNase σε κάθε δείγμα, ήπιο vortex και τοποθέτηση στο shaker (at 1000rpm for 15min.)

22.Προσθήκη σε κάθε δείγμα 50 μl Rebinding Buffer και 100μl ισοπροπανόλη ξεχωριστά.

23.Τοποθέτηση στο shaker (at 900rpm for 5min.)

24.Τοποθέτηση των eppendorfs στο Magnetic-Stand, μέχρι το διάλυμα να καθαρίσει από τους μαγνήτες και να μείνει το υπερκείμενο.

25. Απόρριψη με προσοχή το υπερκείμενο χωρίς να προκαλέσουμε αναταραχή με στους μαγνήτες.

26.Απομακρύνουμε από το Magnetic-Stand τα eppendorfs και προσθέτουμε 150 μl από το Wash Solution 2 σε κάθε δείγμα. Κάνουμε ήπιο vortex.

27.Επανάληψη των βημάτων 19-20.

28..Προσθήκη 50μl σε κάθε δείγμα από το Elution Buffer, που είχαμε προθερμάνει. Ήπιο vortex.

29. Τοποθέτηση στο shaker (at 1000rpm for 2min.)

30.Επώαση των δειγμάτων στη θερμαντική πλάκα στους 65 oC για 5min.

31. Ήπιο vortex, τοποθετούμε τα δειγμάτων στο shaker(at 1000rpm for 2min)

32. Τοποθέτηση των eppendorfs στο Magnetic-Stand, μέχρι το διάλυμα να καθαρίσει από τους μαγνήτες και να μείνει το υπερκείμενο.

33.Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο erpendorf και αποθήκευση στους -20 °C ή στους -80 °C.

➤ Σύνθεση cDNA – Reverse Transcription PCR με τη χρήση TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit.

Το kit χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του c DNA, το οποίο στη συνέχεια χρησίμευσε ως εκμαγείο στη real-Time PCR. Όλα τα αναλώσιμα του kit αποθηκεύτηκαν στους -20 °C εκτός από το miR-Amp Master Mix, το οποίο αποθηκεύτηκε στους 2-4 °C

Συνθήκες μηχανήματος

Πριν ξεκινήσει η διαδικασία σύνθεσης του cDNA έγινε ο προγραμματισμός του μηχανήματος PCR για τις παρακάτω αντιδράσεις:

Poly A: 37 °C 45min, stop 65 °C 10min, hold 4 °C

Ligation: 16 °C 60min, hold 4 °C

Reverse Transcription: 42 °C 15min, stop 85 °C 5min, hold 4 °C

MiRNA amplification: enzyme activation 95 °C 5min

Denature 95 °C 3min, annealing /extend 60 °C 30sec →14 cycles

Stop 99 °C 10min

Hold 4 °C

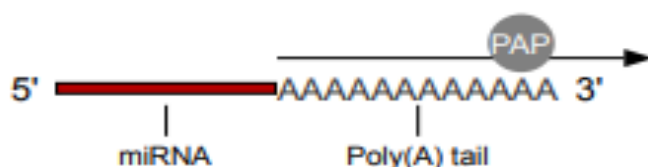
Προετοιμασία δειγμάτων

Η συγκέντρωση των δειγμάτων πριν χρησιμοποιηθούν για την αντίδραση έπρεπε να είναι ≤5 ng/μl με τελικό όγκο 2μL. Επομένως αφού έγινε η φωτομέτρηση των δειγμάτων RNA ακολούθησε αραίωσή τους.

Ανάλυση της διαδικασίας σύνθεσης cDNA:

Αντίδραση Poly(A)-ουράς

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η προσθήκη της Poly(A)-ουράς στο συνολικό miRNA (εικόνα 11).



Εικόνα 11: Προσθήκη της Poly-A ουράς στα microRNAs

Πιο συγκεκριμένα τα βήματα της αντίδρασης ήταν τα εξής:

1. Vortex για ανάμιξη και spin down των δειγμάτων και των αντιδραστηρίων.
2. Προετοιμασία του Poly(A) Reaction Mix σύμφωνα με τις οδηγίες του παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5: : Ποσότητες για την προετοιμασία του Poly-A Reaction Mix

Υλικά	Όγκος ανά δείγμα
10X Poly(A) Buffer	0,5 µl
ATP	0,5 µl
Poly(A) Enzyme	0,3 µl
RNase free water	1,7 µl
Total Poly(A) Reaction Mix	3,0 µl

3. Vortex και spin down το Poly(A) Reaction Mix.

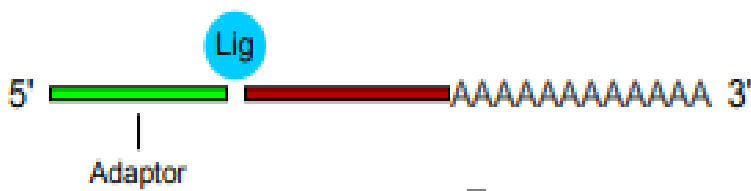
4. Προσθήκη 2µl από κάθε δείγμα και 3 µl από το Poly(A) Reaction Mix στο eppendorf της αντίδρασης.

***Συνολικός όγκος της αντίδρασης ανά δείγμα: 5µl*

5. Vortex και spin down. Τοποθέτηση των eppendorfs στο θερμικό κυκλοποιητή.

Αντίδραση της σύνδεσης του adaptor

Μετά την αντίδραση της Poly(A) - ουράς συνεχίζουμε αμέσως με την αντίδραση ενσωμάτωσης του adaptor. Ο adaptor χρησίμευσε ως forward εκκινήτης για την ενίσχυση του c DNA στη συνέχεια. (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Σύνδεση του adaptor στο microRNA με αντίδραση λιγάσης

Πιο συγκεκριμένα τα βήματα της αντίδρασης ήταν τα εξής:

1. Προετοιμασία του Ligation Reaction Mix σύμφωνα με τις οδηγίες του παρακάτω πίνακα

Πίνακας 6: Ποσότητες για την προετοιμασία του Ligation Reaction Mix

Υλικά	Όγκος ανά δείγμα
5X DNA Ligase Buffer	3 µl
50% PEG 8000	4,5 µl
25X Ligation Adaptor	0,6 µl
RNA Ligase	1,5 µl
RNase-free water	0,4 µl
Total Ligation Reaction Mix	10 µl

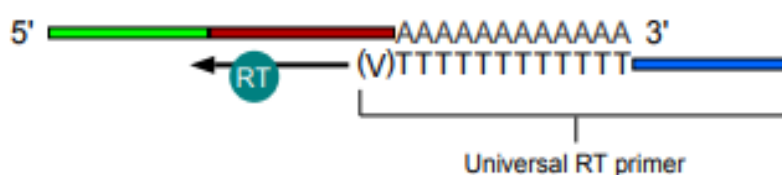
2. Vortex και spin down το Ligation Reaction Mix

3. Μεταφορά 10μl από το Ligation Reaction Mix σε κάθε eppendorf από την προηγούμενη αντίδραση της Poly(A). Ο συνολικός όγκος κάθε δείγματος είναι 15μl.

4. Vortex και spin down. Τοποθέτηση των eppendorfs στο θερμικό κυκλοποιητή.

Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

Μετά την αντίδραση σύνδεσης του adaptor συνεχίζουμε αμέσως με την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής. Ένας universal primer, ο οποίος συνδέεται στην Poly-A ουρά είναι απαραίτητος στο στάδιο αυτό, ώστε να γίνει η επέκταση όλων των microRNAs (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Σύνδεση του Universal RT primer στην Poly-A ουρά

Το c DNA που προκύπτει από την αντίδραση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αντίδραση της Real-time PCR.

Πιο συγκεκριμένα τα βήματα της αντίδρασης ήταν τα εξής:

1. Προετοιμασία του Reverse Transcription Reaction Mix σύμφωνα με τις οδηγίες του παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 7: Ποσότητες για την προετοιμασία του Reverse Transcription Reaction Mix

Υλικά	Όγκος ανά δείγμα
5X RT Buffer	3 μl
d NTP Mix (5Mm)	4,5 μl
20X Universal RT Primer	0,6 μl
10X RT Enzyme Mix	1,5 μl
RNase-free water	0,4 μl
Total RT Reaction Mix	10 μl

2. Vortex και spin down το Reverse Transcription Reaction Mix.

3. Μεταφορά 15μl από το Reverse Transcription Reaction Mix σε κάθε eppendorf από την προηγούμενη αντίδραση. Ο συνολικός όγκος κάθε δείγματος ήταν 30μl.

4. Vortex και spin down. Τοποθέτηση των eppendorfs στο θερμικό κυκλοποιητή.

Αντίδραση ενίσχυσης

Μετά την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής πραγματοποιήθηκε η αντίδραση ενίσχυσης ώστε να εξασφαλιστεί μεγαλύτερη ποσότητα του c DNA.

Πιο συγκεκριμένα τα βήματα της αντίδρασης ήταν τα εξής:

1. Προετοιμασία του miR-Amp Reaction Mix σύμφωνα με τις οδηγίες του παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 8: Ποσότητες για την προετοιμασία του miR-Amp Mix

Υλικά	Όγκος ανά δείγμα
2X miR Amp Master Mix	25 µl
20X miR Amp Primer Mix	2,5 µl
RNase-free water	17,5 µl
Total miR Amp Reaction Mix	45 µl

2. Vortex και spin down το miR-Amp Reaction Mix.

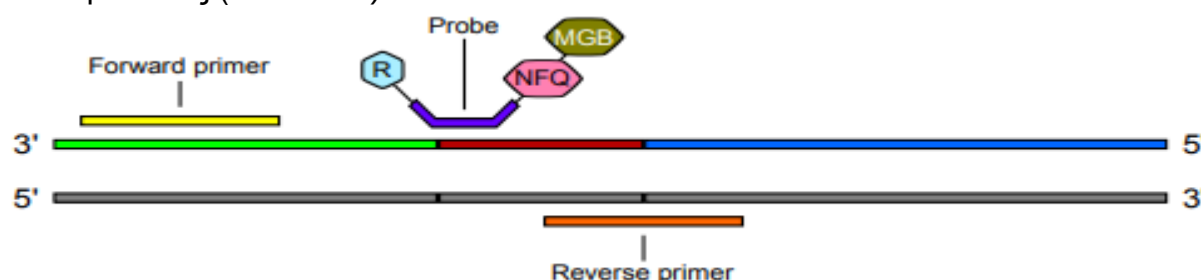
3. Μεταφορά 45µl από το miR-Amp Reaction Mix σε ένα νέο eppendorf και προσθήκη 5µl από το προϊόν της Reverse Transcription αντίδρασης. Ο συνολικός όγκος κάθε δείγματος ήταν 50µl.

4. Vortex και spin down. Τοποθέτηση των eppendorfs στο θερμικό κυκλοποιητή.

Αποθήκευση του προϊόντος στους -20 °C (για πάνω από δυο μήνες)

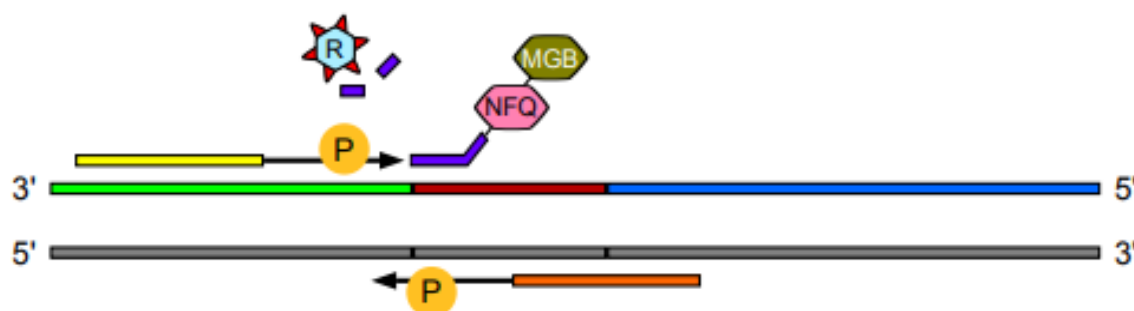
➤ Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)

Το προϊόν της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription), το οποίο είχε ενισχυθεί, χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για να εκτιμηθεί η έκφραση του microRNA που μας ενδιέφερε με τη μέθοδο της Real-Time PCR. Η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση των mir-29a-3p, cel-mir-39a-3p (exogenous control) και mir-191-5p(endogenous control) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των TaqMan Advanced miRNA Assays, τα οποία περιέχουν ένα σύνολο εκκινήτων και ανιχνευτών, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την ανάλυση των επιπέδων της έκφρασης των microRNAs. Κατά τη διάρκεια της PCR, οι εκκινήτες και οι ανιχνευτές συνδέονται σε συμπληρωματικές αλληλουχίες κατά μήκος των κλώνων του cDNA προϊόντος (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Σύνδεση των εκκινήτων και των ανιχνευτών στους κλώνους c DNA

Κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού η DNA πολυμεράση διασπά μόνο τους ανιχνευτές που έχουν συνδεθεί στις αλληλουχίες-στόχους. Μετά την προσπέλαση της DNA πολυμεράσης η χρωστική διαχωρίζεται από τον υπόλοιπο ανιχνευτή κι έτσι παύει να είναι απενεργοποιημένη και ξεκινά πλέον να φθορίζει. Όσο γίνεται ο πολυμερισμός τόσο αυξάνεται και ο φθορισμός (Εικόνα 15).

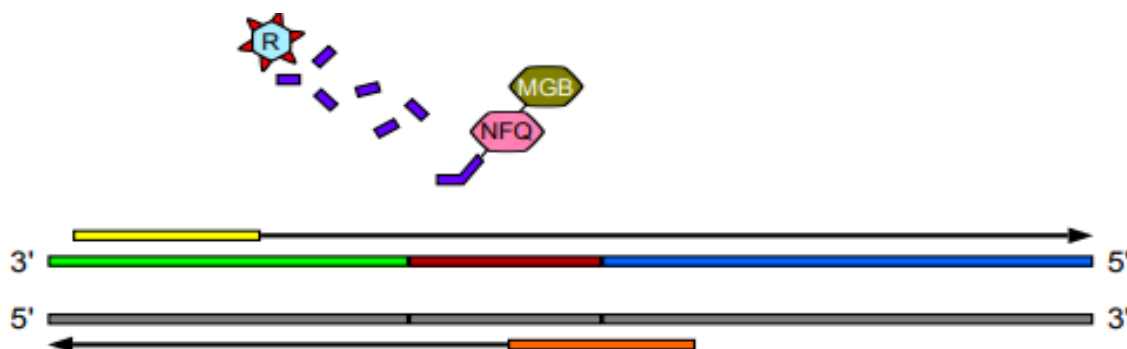


Εικόνα 15: Αρχικός πολυμερισμός και διαχωρισμός της χρωστικής αναφοράς από τον ανιχνευτή

Ο πολυμερισμός του κλώνου συνεχίζεται αλλά επειδή το άκρο 3' του ανιχνευτή είναι μπλοκαρισμένο δεν πραγματοποιείται η επέκταση του κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR (Εικόνα 16).

LEGEND:

P	Hot-start DNA polymerase	R	Reporter dye	NFQ	Non-fluorescent quencher dye	MGB	Minor groove binder
----------	--------------------------	----------	--------------	------------	------------------------------	------------	---------------------



Εικόνα 16: Ολοκλήρωση του πολυμερισμού

Πειραματική πορεία:

1. Αραίωση 1/8 των δειγμάτων cDNA. Οπότε 5μl δείγματος και 35μl DNase/RNase free water.
2. Vortex και spin down στο PCR Master Mix.
3. Προετοιμασία του Real-Time Reaction Mix σύμφωνα με τις οδηγίες του παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 9: Ποσότητες για την προετοιμασία του Real-Time Reaction Mix

Υλικά	Όγκος ανά δείγμα
TaqMan Fast Advanced Master Mix(2X)	10 µl
TaqMan Advanced miRNA Assay (20X)	1 µl
RNase-free water	4 µl
Total PCR Reaction Mix	15 µl

4. Vortex και spin down το RT-PCR Mix.
5. Μεταφορά 15 µl RT-PCR Mix και 5µl, οπότε total volume 20µl.
6. Ανάμιξη κι έλεγχος ώστε να μην υπάρχουν αρκετές φυσαλίδες.
7. Τοποθέτηση του plate στο μηχάνημα

Οι κύκλοι και οι θερμοκρασίες της PCR φαίνονται παρακάτω:

Πίνακας 10: Οι κύκλοι και οι θερμοκρασίες στο μηχάνημα της Applied Biosystems για τη Real-time PCR

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Ενεργοποίηση Ενζύμου	95 °C	20 sec	1
Αποδιάταξη	95 °C	3 sec	40
Σύνδεση εκκινητών/Επέκταση	60 °C	30 sec	

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος StepOnePlus. Στο σημείο αυτό είναι χρήσιμο να αναλυθούν κάποια στοιχεία, τα οποία αφορούν τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, ώστε να γίνει περισσότερο κατανοητή η μέθοδος, με την οποία προέκυψαν οι μετρήσεις μας. Η διαφορά της Real-time PCR από την απλή ποσοτική PCR έγκειται στο γεγονός ότι στην αντίδραση προστίθεται μια φθορίζουσα ουσία, η οποία χρησιμεύει ως ανιχνευτής των παραγόμενων αντιγράφων. Η ένταση φθορισμού, που είναι ανάλογη της ποσότητας του παραγόμενου προϊόντος, καταγράφεται και επιτρέπει την παρακολούθηση της ενίσχυσης σε πραγματικό χρόνο. Ο αριθμός των κύκλων που απαιτούνται, ώστε να παραχθεί ανιχνεύσιμο σήμα φθορισμού είναι αντιστρόφως ανάλογος της αρχικής ποσότητας DNA. Κατά τη Real Time PCR πραγματοποιείται η συνεχής καταγραφή σήματος φθορισμού κατά τη διεξαγωγή μιας ή περισσότερων PCR για μια σειρά κύκλων της αντίδρασης. Είναι μια μέθοδος

ποσοτικοποίησης με υψηλή ακρίβεια, ευαισθησία και επαναληψιμότητα. Η μέθοδος εφαρμόζεται αρκετά σε μελέτες της γονιδιακής έκφρασης, σε συνδυασμό με την αντίστροφη μεταγραφή. Βέβαια όπως κάθε επιστημονική μέθοδος έτσι και η Real-Time PCR έχει κάποιους περιορισμούς. Συγκεκριμένα απαιτείται πιο πριν υψηλής ποιότητας απομόνωση RNA και ακριβής μετατροπή αυτού σε cDNA. Επιπλέον, λάθη που μπορεί να οφείλονται στον ανθρώπινο παράγοντα (ανεπιτυχής σχεδίαση εκκινητών, λανθασμένος χειρισμός μηχανημάτων και προγραμμάτων, σφάλματα στις αραιώσεις κ.α.) αποτελούν σημαντικό περιορισμό της μεθόδου. [64] [65]

Οι φάσεις της Real-Time PCR είναι ίδιες με της απλής PCR, δηλαδή έχουμε τη φάση υποβάθρου, όπου η αύξηση της έντασης του φθορισμού ακόμα δεν ανιχνεύεται και είναι οι πρώτοι 18 περίπου κύκλοι της αντίδρασης. Στη συνέχεια η ποσότητα προϊόντος που έχει παραχθεί είναι αρκετή οπότε το σήμα του φθορισμού ξεπερνά τώρα αυτό του υποβάθρου και είναι ανιχνεύσιμο. Ο κύκλος, στον οποίο αυτό συμβαίνει ονομάζεται κύκλος ποσοτικοποίησης ή κατωφλίου (Threshold Cycle, Ct). Η τιμή Ct μετράται στη δεύτερη φάση, την εκθετική φάση και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ακριβή μέτρηση της αρχικής ποσότητας DNA που βρίσκονταν στο δείγμα. Όσο περισσότερη ποσότητα υπάρχει στο αρχικό δείγμα, τόσο πιο γρήγορα το σήμα γίνεται ανιχνεύσιμο και τόσο πιο μικρή είναι η τιμή Ct. Μετά την εκθετική φάση η αντίδραση περνά στη γραμμική φάση, όπου το σήμα συνεχίζει να αυξάνεται, αλλά όχι με εκθετικό τρόπο, καθώς τα προϊόντα παράγονται με χαμηλότερο ρυθμό. Τέλος, στη φάση κορεσμού (plateau) η ενίσχυση των προϊόντων ελαττώνεται απότομα μέχρι τον τελευταίο κύκλο της αντίδρασης. [66]

Όσον αφορά τον ανιχνευτή που χρησιμοποιήθηκε, αυτός ήταν ο Taqman όπως προαναφέρθηκε, που αποτελείται από ένα μόριο χρωστικής-ιχνηθέτη στο 5' άκρο και έναν αποσβέστη στο 3' άκρο, τα οποία συνδέονται εκλεκτικά με συμπληρωματικότητα με μία εσωτερική περιοχή της ενισχυόμενης αλληλουχίας. Όταν η Taq πολυμεράση φτάσει στον ανιχνευτή τον υδρολύει, μέσω της 5' νουκλεολυτικής της ενεργότητας, και έτσι, απομακρύνεται η χρωστική-ιχνηθέτης από τον αποσβέστη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η χρωστική να αρχίζει να εκπέμπει φθορισμό. Οι ανιχνευτές αυτής της κατηγορίας παρουσιάζουν το πλεονέκτημα ότι αυξάνουν την ειδικότητα των αποτελεσμάτων, αφού φθορίζουν μόνο όταν οι επιθυμητές αλληλουχίες ενισχύονται, έτσι αποφεύγεται σε μεγάλο βαθμό ο φθορισμός από πιθανά παραπροϊόντα. [67] [68] [69]

2.4.3 Ανάλυση των δεδομένων

Η ανάλυση των δεδομένων της Real-Time PCR έγινε με τη χρήση του λογισμικού Expression Suite κι εφαρμόστηκε η υπολογιστική μέθοδος της σχετικής ποσοτικοποίησης. Κατά την ανάλυση ελέγχθηκαν τα Ct των δειγμάτων και απορρίφθηκαν εκείνα τα δείγματα με Ct >35, ένα κατώφλι, το οποίο ορίστηκε σύμφωνα με την υπάρχουσα έως τώρα βιβλιογραφία. (Ameya Deo et al. 2011). Κατόπιν εφαρμόστηκε η μέθοδος του Global Normalization, οπότε η κανονικοποίηση έγινε με βάση το μέσο όρο του Ct όλων των microRNAs, που μετρήθηκαν. Στη συνέχεια έγινε ο υπολογισμός του $\Delta\Delta Ct$ και κατόπιν των τιμών $2^{-\Delta\Delta Ct}$ για κάθε δείγμα. Προέκυψε έτσι για κάθε δείγμα η τιμή RQ (relative quantification) το οποίο δηλώνει πόσες φορές διαφέρει η έκφραση του υπό μελέτη miRNA από το μέσο όρο έκφρασης όλων των microRNAs που μετρήθηκαν στη Real-Time PCR. Προέκυψαν εν τέλει αποτελέσματα RQ για 19 δείγματα ασθενών από τα 35 και 20 υγιών. [70] [71]

Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS 20. Το διάστημα εμπιστοσύνης ήταν στο 95% και το επίπεδο σημαντικότητας στο 0.05 (p-value). Πραγματοποιήθηκε επίσης ο έλεγχος της κανονικότητας και στην περίπτωση που δεν υπήρχε κανονικότητα έγιναν μη παραμετρικοί έλεγχοι κι έλεγχος συσχέτισης κατά

Spearman. Το t-test και ο έλεγχος συσχέτισης κατά Pearson χρησιμοποιήθηκαν στις περιπτώσεις που οι μεταβλητές ακολουθούσαν την κανονική κατανομή αλλά και αυθαίρετα στις περιπτώσεις μη κανονικής κατανομής.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Περιγραφικά στοιχεία του δείγματος

Πραγματοποιήθηκε η ανάλυση του δείγματος αποτελούμενο από 35 άτομα εκ των οποίων οι 6 είναι γυναίκες (17,1%) και οι 29 άντρες. Η ηλικία των ατόμων ήταν από 37 μέχρι 73 χρονών, με το μέσο όρο να είναι στα 58 χρόνια.

Συγκεκριμένα για το επίπεδο εκπαίδευσης οι κατηγορίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν καθόλου εκπαίδευση, δημοτικό σχολείο, γυμνάσιο-λύκειο και πανεπιστήμιο. Προέκυψε ότι το 31,4% των ασθενών είχε τελειώσει μόνο το δημοτικό σχολείο, το 48,6% είχε ολοκληρώσει το λύκειο ενώ το 17,1% ήταν πανεπιστημιακής εκπαίδευσης.

Η επαγγελματική κατάσταση χωρίστηκε στις εξής κατηγορίες: δημόσιος ή ιδιωτικός υπάλληλος μερικής ή πλήρους απασχόλησης, αυτοαπασχολούμενος, άνεργος και συνταξιούχος ή οικιακά. Το 23% των συμμετεχόντων ήταν δημόσιοι υπάλληλοι πλήρους ή μερικής απασχόλησης, ένα 17% ήταν ιδιωτικοί υπάλληλοι πλήρους ή μερικής απασχόλησης, ένα 50% ήταν αυτοαπασχολούμενοι, ένα 5,7% ήταν συνταξιούχοι, ενώ ένα ποσοστό 2,9% ασχολούταν με τα οικιακά. Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει συγκεντρωτικά τα στοιχεία αυτά του δείγματος.

Πίνακας 11: Περιγραφικά στοιχεία του δείγματος

Ηλικία (έτη)	58±11
Φύλο (άνδρες %)	82,9
Μορφωτικό Επίπεδο (Πρωτοβάθμια Εκπαίδευση) (%)	31,4
Μορφωτικό Επίπεδο (Δευτεροβάθμια Εκπαίδευση) (%)	48,6
Μορφωτικό Επίπεδο (Τριτοβάθμια εκπαίδευση) (%)	17,1
Δημόσιος ή Ιδιωτικός Υπάλληλος (%)	40
Αυτοαπασχολούμενος (%)	50
Συνταξιούχος (%)	5,7
Οικιακά (%)	2,9

Τέλος το δείγμα των υγιών ελέγχθηκε ως προς τους παράγοντες της ηλικίας και του φύλου. Ο μέσος όρος ηλικίας ήταν τα 50 έτη, ενώ το 75% του δείγματος αποτελούνταν από άνδρες.

3.2 Συνοδά Νοσήματα κι Επανανοσηλεία

Όπως προαναφέρθηκε, αρκετά νοσήματα όπως η υπερλιπιδαιμία, ο διαβήτης, η υπέρταση και άλλα αποτελούν παράγοντες κινδύνου των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Έτσι εξετάζοντας τα νοσήματα αυτά βρέθηκε ότι η υπέρταση, η υπερλιπιδαιμία και ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 κυμαίνονταν σε μεγαλύτερα ποσοστά. Το αποτέλεσμα αυτό εξήχθη συνυπολογίζοντας την δήλωση του ασθενούς, τα φάρμακά του και τις αιματολογικές εξετάσεις του κατά τη νοσηλεία. Συγκεκριμένα για τις εξετάσεις, τα κριτήρια για την υπέρταση ήταν η συστολική αρτηριακή πίεση να είναι μεγαλύτερη από 140 χιλιοστών υδραργύρου και η διαστολική από 90 χιλιοστά, για την υπερλιπιδαιμία τα κριτήρια ήταν η ολική χοληστερόλη να είναι μεγαλύτερη από 200mg/dL ή/και η LDL από 130mg/dL, και ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2) να είναι μεγαλύτερος από 125mg/dL.

Το 28,6% των ασθενών είχε εκδηλώσει υπέρταση πριν το επεισόδιο, ένα ποσοστό του 31,4% είχε υπερλιπιδαιμία και ένα ποσοστό του 18,6% είχε ΣΔ2. Επιπλέον συνυπολογίστηκαν και τα τρία αυτά νοσήματα και βρέθηκε ότι ένα ποσοστό του 51,4% δεν είχε καμία, ένα 25,7% είχε μια από τις τρεις, ένα 22,9% είχε δύο από τις τρεις και τέλος ένα ποσοστό του 17,1% είχε ταυτόχρονα και υπέρταση και υπερλιπιδαιμία.

Επιπλέον η παχυσαρκία, όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο, είναι ένας ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου των καρδιαγγειακών νοσημάτων, οπότε μετρήθηκε το ύψος και το βάρος και υπολογίστηκε ο δείκτης μάζας του σώματος κάθε ατόμου, σύμφωνα με τον τύπο: $BMI = \text{kg/m}^2$. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι το 25,7% του δείγματος ήταν παχύσαρκοι, το 48,6 % ήταν υπέρβαροι και ένα ποσοστό περίπου 24% ήταν φυσιολογικού βάρους.

Το οικογενειακό ιστορικό των ασθενών, ήταν ένα ακόμη στοιχείο, το οποίο μελετήθηκε στατιστικά. Ένα ποσοστό του 11,4% είχε οικογενειακό ιστορικό καρδιαγγειακών νοσημάτων. Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, κυρίως το ισχαιμικό, παρουσίαζαν το μεγαλύτερο επιπολασμό.

Επίσης, ένα ποσοστό του 22,9% των ασθενών εκδήλωσε ένα δεύτερο επεισόδιο κατά την περίοδο του follow up.

3.3 Τρόπος ζωής των εθελοντών

3.3.1 Καπνιστικές συνήθειες

Το κάπνισμα είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας κινδύνου των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Μελετήθηκε λοιπόν αυτός ο παράγοντας και συγκεκριμένα εξετάστηκε η ηλικία που ξεκίνησαν οι ασθενείς το κάπνισμα, ο αριθμός τσιγάρων που κάνουν καθημερινά αλλά και τα χρόνια που καπνίζουν μέχρι τώρα. Το 45,7% από τους ασθενείς, δεν έχει καπνίσει ποτέ του και το 54,2% κάπνιζε μέχρι το επεισόδιο καθημερινά. Μετά από το follow up των 6 μηνών οι εθελοντές ρωτήθηκαν αν άλλαξαν οι καπνιστικές τους συνήθειες και ένα ποσοστό του 42,1 % είχε σταματήσει το κάπνισμα.

Οι ασθενείς ξεκίνησαν το κάπνισμα σε νεαρές ηλικίες, χωρίς να λείπουν τα περιστατικά που το ξεκίνησαν μετά από κάποιο συμβάν αργότερα στη ζωή τους. Όσον αφορά τα συνολικά χρόνια καπνίσματος αυτά διακυμαίνονται στα 20 χρόνια.

Το εύρος στον αριθμό των τσιγάρων ήταν μεγάλο, καθώς ενώ οι περισσότεροι καπνίζανε κοντά στα 20 τσιγάρα την ημέρα, δηλαδή ένα πακέτο, υπήρχαν αρκετοί καπνιστές που καπνίζανε υπερβολικό αριθμό τσιγάρων.

3.3.2 Φυσική δραστηριότητα

Η φυσική δραστηριότητα είναι ένας άλλος βασικός παράγοντας που σχετίζεται με τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Ο παράγοντας αυτός μελετήθηκε ποιοτικά, ώστε να εκτιμηθεί το ποσοστό των συμμετεχόντων, οι οποίοι δήλωσαν πως κάνουν μία οποιαδήποτε μορφή άσκησης. Έτσι βρέθηκε ότι ένα ποσοστό του 62,8% δήλωσαν πως κάνουν οποιαδήποτε μορφή άσκησης. Τέλος μετρήθηκαν και οι ώρες της άσκησης σε αυτούς που ασκούσαν, με το μεγαλύτερο ποσοστό να κυμαίνεται περίπου στη 1 ώρα τη μέρα.

3.3.3 Ώρες ύπνου, τηλεθέασης και υπολογιστή

Οι ώρες ύπνου, τηλεθέασης αλλά και οι ώρες που περνάει κάποιος μπροστά στον υπολογιστή είναι βασικές παράμετροι, οι οποίες καταδεικνύουν πόσο καθιστική ζωή κάνει το άτομο.

Στον ύπνο βρέθηκαν φυσιολογικές μετρήσεις, με τις τιμές να βρίσκονται σε μεγαλύτερο βαθμό περίπου στο οκτάωρο. Αλλά και οι ώρες τηλεθέασης δεν βρέθηκαν πολύ αυξημένες, με πάνω από τους μισούς να παρακολουθούν περίπου 3 με 5 ώρες τη μέρα τηλεόραση, κάτι που αν συμπεριληφθεί η ηλικία και το ότι κάποιοι ήταν και στη σύνταξη, δεν είναι πολύ. Τέλος, ο μέσος όρος για τις ώρες που περνούσαν οι εθελοντές στον υπολογιστή ήταν 2 με 3.

Στον παρακάτω πίνακα, συνοψίζονται τα ποσοστά των εθελοντών σε κάθε συνοδό νόσημα, το οικογενειακό ιστορικό που αφορούσε καρδιαγγειακές νόσους και συνοδά νοσήματα, το ποσοστό των ασθενών που εκδήλωσαν νέο επεισόδιο κατά το follow up και τον τρόπο ζωής των εθελοντών.

Πίνακας 12: Δεδομένα για συνοδά νοσήματα, επανανοσηλεία και τον τρόπο ζωής των ασθενών

Υπέρβαροι (%)	48,6
Παχύσαρκοι (%)	25,7
Υπέρταση (%)	28,6
Υπερλιπιδαιμία (%)	31,4
Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2 (%)	18,6
Οικογενειακό Ιστορικό (%)	11,4
Επανανοσηλεία (%)	22,9
Κάπνισμα (%)	54,2

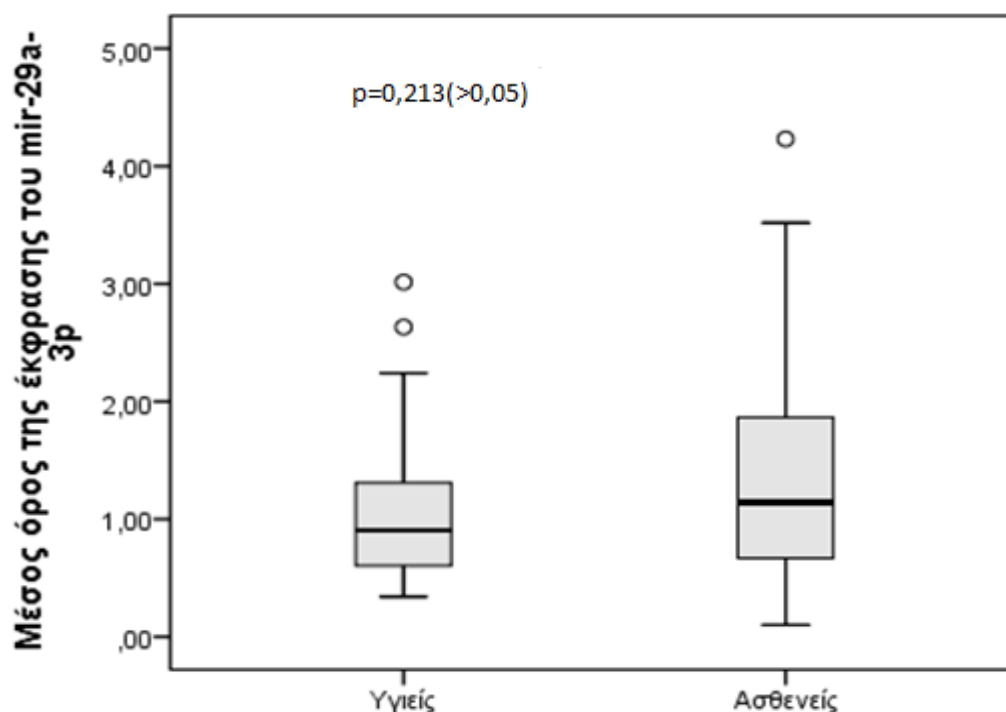
Διακοπή καπνίσματος (%)	42,1
Άσκηση (%)	62,8
Ώρες ύπνου	7±1,3
Ώρες τηλεθέασης	3±2,2
Ώρες στον υπολογιστή	2±1,1

3.4 Αποτελέσματα της έκφρασης του miR-29a-3p

3.4.1 Αποτελέσματα της έκφρασης miR-29a-3p σε υγιείς και ασθενείς

Η έκφραση του miR-29a-3p μελετήθηκε σε ασθενείς και υγιείς, προκειμένου να ελεγχθεί αν υπήρχε διαφορά. Το συγκεκριμένο microRNA είχε αυξημένη έκφραση στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς, χωρίς όμως η διαφορά αυτή να είναι στατιστικώς σημαντική. Ύστερα από τη στατιστική ανάλυση με τη χρήση του ελέγχου t-test ανεξάρτητων δειγμάτων προέκυψε ότι ο μέσος όρος της έκφρασης του miR-29a-3p στους υγιείς ήταν 1,1090 με τυπική απόκλιση 0,74267 και στους ασθενείς 1,3683 με τυπική απόκλιση 1,03025, ενώ το p-value ήταν 0,213, δηλαδή μεγαλύτερο του 0,05.

Το παρακάτω γράφημα απεικονίζει το μέσο όρο έκφρασης του microRNA στα δύο αυτά γκρουπ.

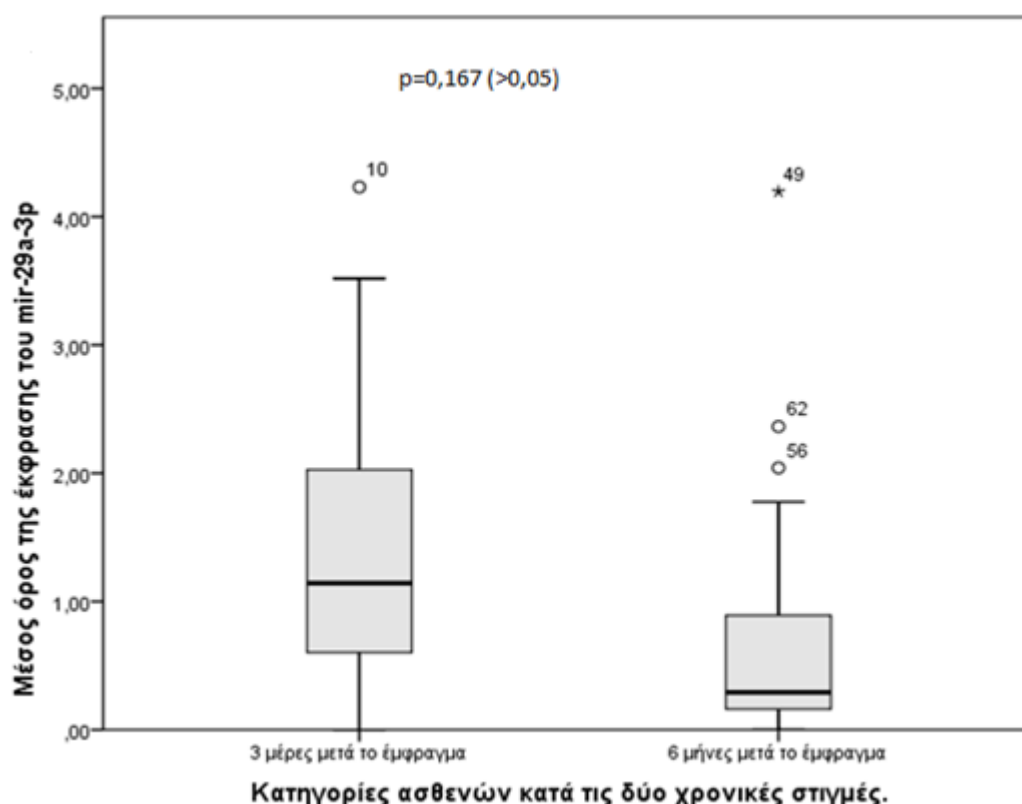


Σχήμα 2: Η έκφραση του miR-29a-3p σε RQ Units σε υγιείς και ασθενείς

3.4.2 Αποτελέσματα της έκφρασης του mir-29a-3p στις δύο χρονικές στιγμές

Όπως προαναφέρθηκε ελέγχθηκε η έκφραση του microRNA έως και τρεις μέρες μετά το επεισόδιο και έξι μήνες μετά από αυτό. Η έκφραση βρέθηκε να μειώνεται έξι μήνες μετά το επεισόδιο. Συγκεκριμένα κατόπιν ελέγχου με τη χρήση paired sample t-test ο μέσος όρος της έκφρασης έως και τρεις μέρες μετά το έμφραγμα ήταν 1,2028 με τυπική απόκλιση 0,97737, ενώ ο μέσος όρος έξι μήνες μετά ήταν 0,8234 με τυπική απόκλιση 1,10005. Η μείωση αυτή στην έκφραση δεν ήταν στατιστικώς σημαντική, καθώς το p-value ισούταν με 0,167, δηλαδή ήταν μεγαλύτερο του 0,05.

Το παρακάτω γράφημα απεικονίζει τη διαφορά στο μέσο όρο έκφρασης του mir-29a-3p κατά τις δύο χρονικές στιγμές.



Σχήμα 3: Μέσος όρος της έκφρασης του mir-29a-3p σε RQ Units κατά τις δύο χρονικές στιγμές μετά το επεισόδιο

Κατόπιν του ελέγχου των τιμών της έκφρασης κατά τις δύο χρονικές στιγμές υπολογίστηκε το ποσοστό της διαφοράς και ελέγχθηκε αν αυτή η διαφορά επηρεάζεται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Τα αποτελέσματα αυτού του ελέγχου παρουσιάζονται στην επόμενη υποενότητα.

3.4.3 Περιβαλλοντικοί παράγοντες κι έκφραση του mir-29a-3p

Το επί τοις εκατό ποσοστό της διαφοράς των μέσων όρων της έκφρασης του mir-29a-3p κατά τις δύο χρονικές στιγμές και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες ελέγχθηκαν για την πιθανή μεταξύ τους συσχέτιση. Η εφαρμογή του ελέγχου συσχέτισης κατά Spearman χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθεί η συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του mir-29a-3p με

ποσοτικές μεταβλητές, όπως η ηλικία και το BMI. Η ηλικία δε φάνηκε να σχετίζεται με το ποσοστό της μείωσης της έκφρασης του miR-29a-3p, καθώς το p-value ισούταν με 0,535(>0,05), όπως επίσης ούτε με το BMI, για το οποίο βρέθηκε p-value=0,173(>0,05).

Όσον αφορά τον έλεγχο συσχέτισης του ποσοστού της διαφοράς των μέσων όρων έκφρασης του microRNA με ποιοτικές μεταβλητές εκεί εφαρμόστηκε ο στατιστικός έλεγχος t-test ανεξάρτητων δειγμάτων (αξίζει να σημειωθεί ότι έγινε και μη παραμετρικός έλεγχος, όπου βρέθηκαν οι ίδιες συσχετίσεις).

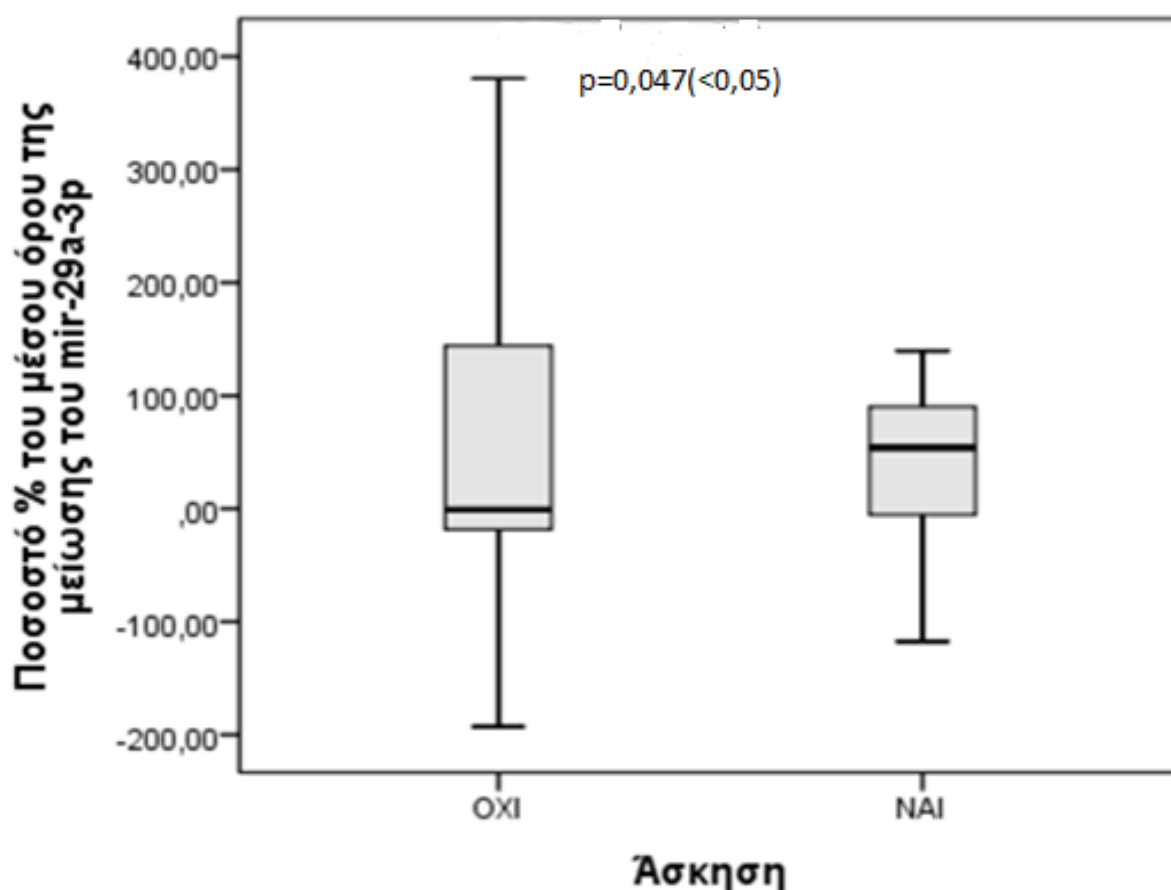
Ο παρακάτω πίνακας συνοψίζει τα αποτελέσματα των ελέγχων t-test ανεξάρτητων δειγμάτων.

Πίνακας 13: Έλεγχος t-test για τη συσχέτιση της μεταβολής του miR-29a-3p με περιβαλλοντικούς παράγοντες

Περιβαλλοντικοί Παράγοντες – % Δ(Μέσου όρου)	Μέσος όρος	p- value
Φύλο		
Ανδρες (=14)	53,3571 ± 122,68336	0,802
Γυναίκες(=5)	-3,7000 ± 116,25175	
Ηλικία		
>50 έτη	47,5757 ± 140,25217	0,385
<50 έτη	22,5143 ± 84,22548	
Κάπνισμα		
Συνέχιση του καπνίσματος(=9)	62,7111 ± 63,04648	0,174
Διακοπή καπνίσματος(=10)	16,4100 ± 156,26327	
Επανενοσηλεία		
Ναι(=5)	-2,2600 ± 77,09736	0,327
Όχι(=14)	52,8429 ± 132,07081	
Οικογενειακό Ιστορικό		
Ναι(=2)	83,2500 ± 41,50717	0,345
Όχι(=17)	33,0588 ± 126,36425	
Συνοδά νοσήματα		
Ναι(=9)	-1,5222 ± 98,1265	0,493
Όχι(=10)	74,2200 ± 132,23592	
Ώρες τηλεθέασης		
>3 ώρες/ημέρα(=11)	35,8909 ± 155,35918	0,051
<3 ώρες/ημέρα(=8)	41,7125 ± 53,71332	
Ώρες υπολογιστή		

>2 ώρες/ημέρα(=9)	-8,3000 ± 99,03179	0,712
<2 ώρες/ημέρα(=10)	80,3200 ± 127,39196	
Άσκηση		
Ναι(=13)	32,0308 ± 78,04403	0,047 *
Όχι(=6)	52,0167 ± 193,38424	

Από τους παραπάνω ελέγχους προέκυψε ότι υπήρχε συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού του μέσου όρου της μείωσης της έκφρασης του miR-29a-3p και της άσκησης. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι η μείωση στην έκφραση έξι μήνες μετά ήταν μεγαλύτερη σε εκείνους που δεν ασκούσαν και συγκεκριμένα το p-value ισούταν με 0,047 (<0,05). Το παρακάτω σχήμα απεικονίζει τη διαφορά στην έκφραση του miR-29a-3p μετά το επεισόδιο σε ασθενείς, οι οποίοι έκαναν άσκηση και σε εκείνους που δεν έκαναν καμία μορφή άσκησης.



Σχήμα 4: Σχέση της μεταβολής της έκφρασης του miR-29a-3p με την άσκηση

Κατόπιν της ανάλυσης με τη χρήση του στατιστικού ελέγχου t-test πραγματοποιήθηκε και η ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης, προκειμένου να ελεγχθεί η ακριβής σχέση της μεταβολής στην έκφραση του συγκεκριμένου microRNA με την άσκηση. Κατά την ανάλυση ελέγχθηκαν τρία μοντέλα, ένα απλό μοντέλο και δύο μοντέλα περισσότερων μεταβλητών. Στο ένα μοντέλο περισσότερων μεταβλητών έγινε προσαρμογή των παραγόντων της ηλικίας και του φύλου και στο άλλο έγινε προσαρμογή ηλικίας, φύλου και BMI. Από την ανάλυση παλινδρόμησης προέκυψε ότι η σχέση μεταξύ του ποσοστού της μεταβολής του microRNA και της άσκησης δε διατηρείται. Η σχέση μεταξύ των δύο μεταβλητών θα διατηρούταν αν το

μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης είχε καλή εφαρμογή και συγκεκριμένα το R^2 ήταν υψηλό και το $p < 0,05$. Στην προκειμένη περίπτωση δε βρέθηκε σε κανένα μοντέλο το p να είναι $< 0,05$, άρα η γραμμική παλινδρόμηση δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα των τριών μοντέλων γραμμικής παλινδρόμησης. Το μοντέλο 1 είναι το απλό μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης, στο μοντέλο 2 έχει γίνει προσαρμογή για τους συγχυτικούς παράγοντες του φύλου και της ηλικίας και στο μοντέλο 3 για το φύλο, την ηλικία και το BMI.

Πίνακας 14: Ανάλυση μοντέλων γραμμικής παλινδρόμησης για τη σχέση της μεταβολής της έκφρασης του mir-29a-3p με την άσκηση

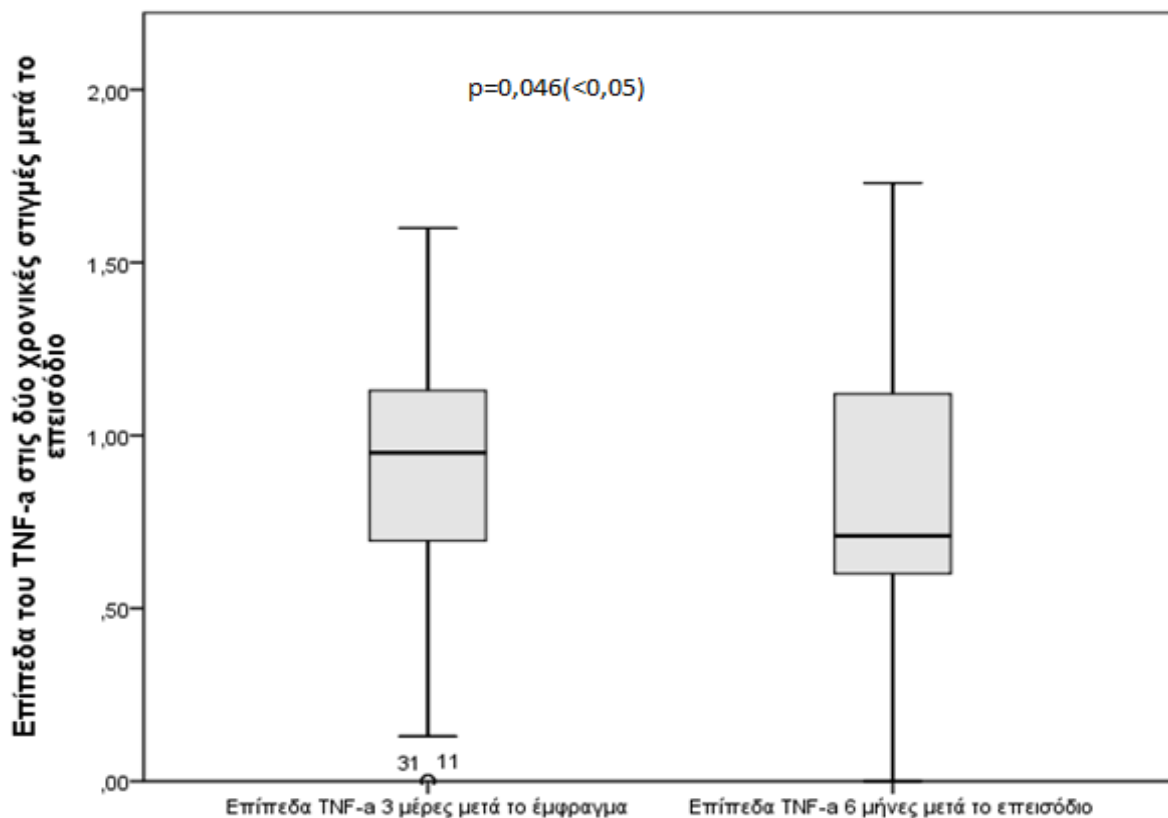
	Μοντέλο 1 $R^2=0,06$		Μοντέλο 2 $R^2=0,075$		Μοντέλο 3 $R^2=0,131$	
Ποσοστό μείωσης mir-29a-3p – Άσκηση	B	p-value	B	p-value	B	p-value
	-0,079	0,747	-0,076	0,750	-0,038	0,717

3.4.4 Παράγοντες φλεγμονής κι έκφραση του mir-29a-3p

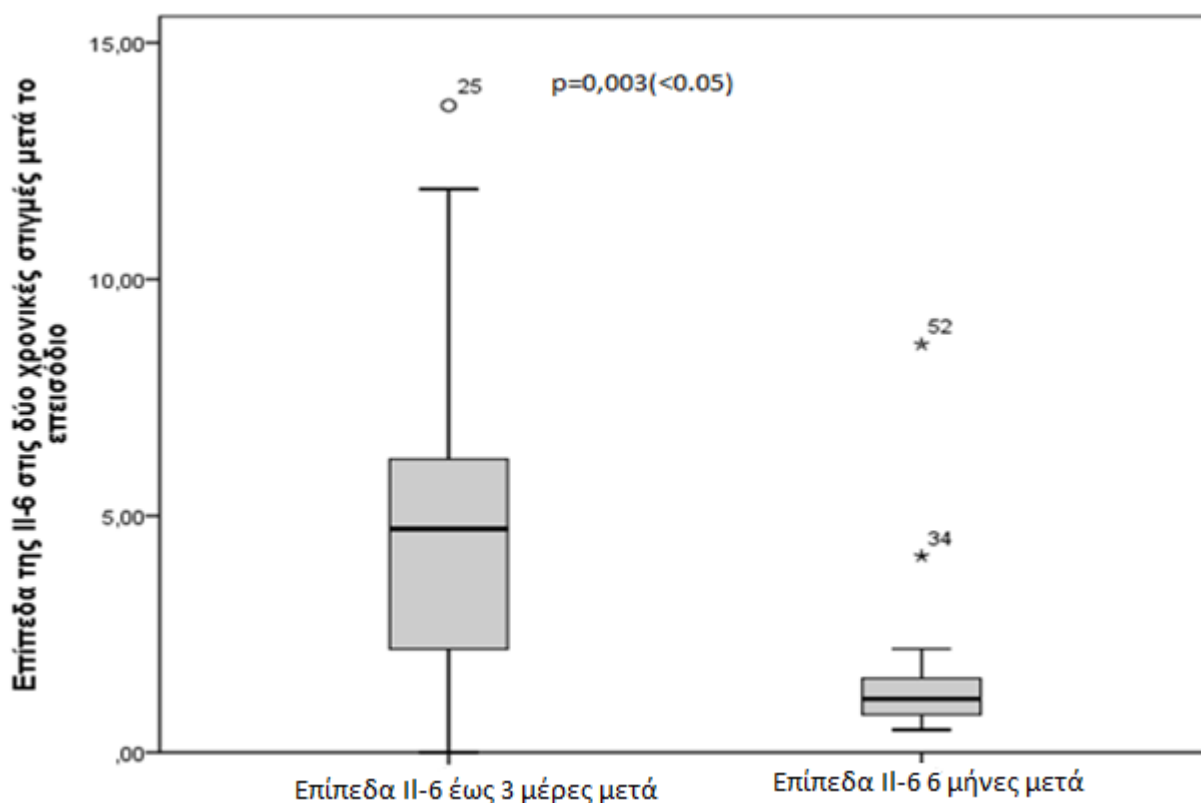
3.4.4.1 Αποτελέσματα των επιπέδων των κυτταροκινών των ασθενών στις δύο χρονικές στιγμές

Όπως προαναφέρθηκε στους ασθενείς ελέγχθηκαν επίσης τα επίπεδα των κυτταροκινών IL-6 και TNF- α και στις δύο χρονικές στιγμές, δηλαδή έως και τρεις ημέρες και έξι μήνες μετά το επεισόδιο. Η IL-6 αλλά και ο TNF- α ήταν αυξημένοι έως και τρεις μέρες μετά το επεισόδιο, αλλά μειώθηκαν έξι μήνες μετά από αυτό. Η μείωση αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική και για τις δύο κυτταροκίνες, όπως προέκυψε κατόπιν ελέγχου paired sample t-test. Συγκεκριμένα έγινε σύγκριση των μέσων όρων και βρέθηκε ότι ο μέσος όρος των επιπέδων του TNF- α κατά τη χρονική στιγμή έως και τρεις μέρες μετά το έμφραγμα ήταν $0,9 \pm 0,42$ pg/ml και έξι μήνες μετά ήταν $0,8 \pm 0,37$ pg/ml με το p-value να ισούται με 0,046 ($< 0,05$). Ο μέσος όρος των επιπέδων της IL-6 έως τρεις μέρες μετά το έμφραγμα ήταν $5,30 \pm 3,62$ pg/ml και έξι μήνες μετά ήταν $1,62 \pm 1,50$ pg/ml, ενώ το p-value ισούταν με 0,003 ($< 0,05$).

Τα παρακάτω γραφήματα απεικονίζουν τα επίπεδα των συγκεκριμένων κυτταροκινών κατά τις δύο χρονικές στιγμές μετά την εκδήλωση οξέος στεφανιαίου επεισοδίου.



Σχήμα 5: Μέσος όρος των επιπέδων(pg/ml) του TNF-α κατά τις δύο χρονικές στιγμές μετά το επεισόδιο



Σχήμα 6: Μέσος όρος των επιπέδων(pg/ml) της IL-6 κατά τις δύο χρονικές στιγμές μετά το επεισόδιο

3.4.4.2 Αποτελέσματα ελέγχου συσχέτισης της έκφρασης του mir-29a-3p με τα επίπεδα των κυτταροκινών

Τα επίπεδα της έκφρασης του microRNA έως και τρεις ημέρες μετά το έμφραγμα ελέγχθηκαν για τη συσχέτισή τους με αυτά τον κυτταροκινών. Κατόπιν του στατιστικού ελέγχου συσχέτισης δε βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της έκφρασης του mir-29a-3p και της Il-6 τρεις μέρες μετά την εκδήλωση του επεισοδίου. Συγκεκριμένα μετά από την ανάλυση κατά Spearman βρέθηκε να είναι $p=0,620$, δηλαδή μεγαλύτερο του 0,05 οπότε δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση.

Αντιθέτως, βρέθηκε να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του microRNA και του TNF- α λίγες μέρες μετά το έμφραγμα. Κατόπιν του ελέγχου κατά Spearman το p ισούταν με 0,023 μικρότερο του 0,05. Προχωρήσαμε σε ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης προκειμένου να ελεγχθεί ο ακριβής τρόπος με τον οποίο οι δύο μεταβλητές σχετίζονται μεταξύ τους. Στην ανάλυση ελέγχθηκαν τρία μοντέλα ένα απλό (Μοντέλο 1), ένα στο οποίο έγινε προσαρμογή των παραγόντων της ηλικίας και του φύλου (Μοντέλο 2) κι ένα τρίτο μοντέλο στο οποίο έγινε προσαρμογή των συγχυτικών παραγόντων της ηλικίας, του φύλου και του BMI (Μοντέλο 3). Ο παρακάτω πίνακας συνοψίζει τα αποτελέσματα των αναλύσεων.

Πίνακας 15: Αποτελέσματα της ανάλυσης των μοντέλων γραμμικής παλινδρόμησης για τον έλεγχο της σχέσης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του mir-29a-3p και των επιπέδων του TNF- α έως και τρεις ημέρες μετά το επεισόδιο

	Μοντέλο 1 R²=0,285		Μοντέλο 2 R²=0,397		Μοντέλο 3 R²=0,400	
Επίπεδα έκφρασης mir-29a-3p- Επίπεδα TNF-α	B	p-value	B	p-value	B	p-value
	-0,534	0,006*	-0,603	0,012*	-0,556	0,03*

Όπως φαίνεται και από τον παραπάνω πίνακα η συσχέτιση μεταξύ των δύο μεταβλητών διατηρείται και στον έλεγχο της γραμμικής παλινδρόμησης σε όλα τα μοντέλα, καθώς η τιμή του p ήταν μικρότερη του 0,05. Από την ανάλυση προέκυψε ότι οι δύο μεταβλητές συσχετίζονται αρνητικά μεταξύ τους. Συγκεκριμένα για κάθε τιμή αύξησης του TNF- α το mir-29a-3p μειωνόταν κατά 0,5 με 0,6 μονάδες.

Επιπλέον το επί τοις εκατό ποσοστό του μέσου όρου της διαφοράς των επιπέδων έκφρασης του mir-29a-3p τις δύο χρονικές στιγμές και το επί τοις εκατό ποσοστό του μέσου όρου της διαφοράς των επιπέδων των κυτταροκινών ελέγχθηκαν για την πιθανή συσχέτιση μεταξύ τους. Από την ανάλυση κατά Spearman για τον έλεγχο συσχέτισης του ποσοστού του μέσου όρου της διαφοράς των επιπέδων έκφρασης του mir-29a-3p και του ποσοστού του μέσου όρου των επιπέδων του TNF- α για τις δύο χρονικές στιγμές δεν προέκυψε κάποια συσχέτιση και το p ισούταν με 0,112, δηλαδή μεγαλύτερο από το 0,05. Όσον αφορά τον αντίστοιχο έλεγχο συσχέτισης για τη διαφορά της έκφρασης του mir-29a-3p με τη διαφορά των επιπέδων της Il-6 κατά τις δύο χρονικές στιγμές δεν υπήρξε κι εκεί κάποια συσχέτιση κι από τον έλεγχο κατά Spearman προέκυψε $p=0,303$, το οποίο ήταν μεγαλύτερο του 0,05, οπότε δεν υπήρξε σημαντική συσχέτιση.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα (ΚΝ) ευθύνονται για 17,5 εκατομμύρια θανάτους ετησίως, δηλαδή 31% όλων των θανάτων, πάνω από το 75% των οποίων αφορά χαμηλού κοινωνικού-οικονομικού επιπέδου χώρες. Το 80% των θανάτων από ΚΝ αφορούν εμφράγματα και εγκεφαλικά. Όπως υποστηρίζει η πρόσφατη βιβλιογραφία, η γενετική, η επιγενετική, και το περιβάλλον αποτελούν τους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση χρόνιων ασθενειών όπως η στεφανιαία νόσος (ΣΝ). Συγκεκριμένα υπάρχουν γενετικοί παράγοντες (συγκεκριμένοι απλότυποι, μοριακές διαταραχές σε συγκεκριμένα γονίδια και microRNAs), καθώς και βιοχημικοί παράγοντες που επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό την εμφάνιση και την εξέλιξη των καρδιαγγειακών νοσημάτων (ΚΝ), είτε ανεξάρτητα είτε σε συνέργεια με διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως ο τρόπος ζωής, η διατροφή και συμπεριφορές όπως το κάπνισμα.

Η παρούσα εργασία βρίσκεται εντός του πλαισίου μιας ευρύτερης έρευνας. Πρόκειται για μία follow up έρευνα, η οποία στοχεύει τόσο στη μελέτη γενετικών, επιγενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων της καρδιαγγειακής νόσου, όσο και στη διερεύνηση προγνωστικών δεικτών για την εμφάνιση ενός νέου επεισοδίου σε χρονικό διάστημα τουλάχιστον ενός εξαμήνου από το πρώτο έμφραγμα. Το δείγμα της παρούσας εργασίας αποτελεί ένα μικρό τμήμα αυτής της εν εξελίξει έρευνας και περιλαμβάνει συνολικά 35 ασθενείς με στεφανιαία νόσο.

Από την ανάλυση των περιβαλλοντικών παραγόντων προέκυψε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών ήταν άντρες, ενώ ο μέσος όρος ηλικίας ήταν περίπου τα 58 έτη. Ο μέσος όρος ηλικίας είναι αναμενόμενος, καθώς αρκετές έρευνες αναφέρουν ότι ο μέσος όρος ηλικίας εκδήλωσης του εμφράγματος είναι κοντά στα 60 έτη. [73] Τα ποσοστά που αφορούν το φύλο συνάδουν με τα αποτελέσματα και άλλων ερευνών, καθώς οι άντρες είναι τα πιο συχνά θύματα της καρδιαγγειακής νόσου. Οι ορμόνες του φύλου συμβάλλουν στην προστασία από καρδιαγγειακά νοσήματα στις γυναίκες και ο κίνδυνος εμφάνισης εμφράγματος αυξάνεται στις γυναίκες σε μεγαλύτερη ηλικία, ιδίως μετά την εμμηνόπαυση που μειώνονται τα οιστρογόνα, τα οποία έχουν καρδιοπροστατευτικό ρόλο. [72] Όσον αφορά το κάπνισμα το 54,2% ήταν καπνιστές και το 45,7% δεν είχε καπνίσει ποτέ ούτε περιστασιακά. Ένα ποσοστό 42,1% διέκοψαν το κάπνισμα μετά το επεισόδιο ακολουθώντας τις συστάσεις του Ιατρού τους. Επίσης το 62,8% των εθελοντών δήλωσαν πως πλέον έχει ενταχθεί η άσκηση στην καθημερινότητά τους με μέσο όρο περίπου 1 ώρα την ημέρα. Οι ώρες ύπνου αλλά και της τηλεθέασης και του υπολογιστή κυμαίνονταν σε φυσιολογικά πλαίσια, οπότε οι εθελοντές δεν είχαν έντονη καθιστική ζωή.

Όσον αφορά τα λοιπά επιδημιολογικά στοιχεία που προέκυψαν από την έρευνα έδειξαν ότι αρκετοί ασθενείς είχαν και άλλα συνοδά νοσήματα, ενώ ένα μικρό ποσοστό είχε οικογενειακό ιστορικό για καρδιαγγειακά νοσήματα. Επιπλέον ένα μικρό ποσοστό εμφάνισε ένα δεύτερο επεισόδιο κατά την περίοδο του follow up.

Για να έχουμε καλύτερη εικόνα για τα αποτελέσματα της ανάλυσης των περιβαλλοντικών παραγόντων αυτά συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα της έρευνας HELIOS (Hellenic Infarction Observation Study). Η συγκεκριμένη επιδημιολογική μελέτη αφορά 1840 ασθενείς ελληνικής καταγωγής από 31 νοσοκομεία. Στον πίνακα 17 υπάρχουν τα επιδημιολογικά στοιχεία από τις 2 έρευνες.

Πίνακας 16: Σύγκριση αποτελεσμάτων με τα αποτελέσματα της έρευνας HELIOS

Χαρακτηριστικό	Αποτελέσματα	HELIOS	Αποτέλεσμα σύγκρισης(ποσοστό)
Ηλικία	58±11	58±13	-
Ποσοστό ανδρών (%)	82,9	75	Αυξημένο
Κάπνισμα (%)	54,2	71	Μειωμένο
Υπέρταση (%)	28,6	59	Μειωμένο
Υπερλιπιδαιμία (%)	31,4	50	Μειωμένο
Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2 (%)	18,6	31	Μειωμένο
Υπέρβαροι (%)	48,6	73	Μειωμένο
Παχύσαρκοι (%)	25,7	22	-
Οικογενειακό ιστορικό (%)	11,4	22	Μειωμένο

Όπως βλέπουμε και στον παραπάνω πίνακα, έχουμε σχεδόν τον ίδιο μέσο όρο ηλικίας εμφράγματος με αυτό των εθελοντών της έρευνας HELIOS. Επίσης παρόμοιο είναι και το ποσοστό των παχύσαρκων. Το ποσοστό των ανδρών είναι αυξημένο στη δική μας κοόρτη, ενώ οι υπόλοιποι παράγοντες είχαν μειωμένο ποσοστό. Οι διαφοροποιήσεις αυτές είναι πολύ πιθανό να οφείλονται στο γεγονός ότι ο δικός μας πληθυσμός ήταν μικρότερος στη φάση αυτή της έρευνας, οπότε οι αναλύσεις μας στερούνται και στατιστικής ισχύος. [73]

Όσον αφορά την έκφραση του miR-29a-3p στη μελέτη μας βρέθηκε κατόπιν σύγκρισης με την έκφραση σε υγιή άτομα, ότι αυξάνεται έως και τρεις μέρες μετά το έμφραγμα. Η διαφορά αυτή βέβαια δεν ήταν στατιστικώς σημαντική, καθώς το δείγμα της μελέτης στο στάδιο αυτό είναι μικρό. Επιπλέον δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της έκφρασης του miR-29a-3p έως τρεις μέρες μετά το επεισόδιο με την έκφρασή του έξι μήνες μετά. Ύστερα από ανάλυση της βιβλιογραφίας βρέθηκε ότι το συγκεκριμένο microRNA μειώνει την έκφρασή του τα πρώτα εικοσιτετράωρα μετά την εκδήλωση του επεισοδίου και αυξάνει τις επόμενες εβδομάδες, άρα φαίνεται να παίζει έναν καρδιοπροστατευτικό ρόλο. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα δε συνάδει με αυτό της δικής μας έρευνας, αλλά όπως προαναφέρθηκε το δείγμα της μελέτης μας στην παρούσα φάση είναι μικρό και στερείται στατιστικής ισχύος. Μελλοντικός στόχος λοιπόν είναι η αύξηση του δείγματος, ώστε να αναλυθεί η έκφραση του συγκεκριμένου microRNA και ο ακριβής ρόλος του στην παθοφυσιολογία του εμφράγματος αλλά και στην πρόγνωση της στεφανιαίας νόσου και της εμφάνισης ενός δεύτερου επεισοδίου εμφράγματος. Το συγκεκριμένο microRNA είναι ένας πιθανός προγνωστικός δείκτης της εμφάνισης και της εξέλιξης της στεφανιαίας νόσου και ο ρόλος του φαίνεται να είναι καρδιοπροστατευτικός, καθώς τα επίπεδά του στην κυκλοφορία μειώνονται μετά την εκδήλωση του εμφράγματος. [74]

Επιπλέον αξίζει να σημειωθεί ότι κατόπιν ελέγχου t-test ανεξάρτητων δειγμάτων βρέθηκε ότι το ποσοστό της διαφοράς της έκφρασης του miR-29a-3p μεταξύ των δύο χρονικών στιγμών συσχετίζεται με την άσκηση. Συγκεκριμένα υπήρχε μεγαλύτερη μείωση, έως και ένα εξάμηνο

μετά, στην έκφραση του miR-29a-3p σε εκείνους που δεν ασκούσαν. Ωστόσο πιθανότατα, λόγω του μικρού δείγματος βρέθηκε τελικά ότι η συσχέτιση αυτή δε διατηρείται και στον έλεγχο γραμμικής παλινδρόμησης. Το συγκεκριμένο είναι όμως, ένα ενδιαφέρον αποτέλεσμα, καθώς σε προηγούμενες μελέτες η έκφραση του miR-29a-3p μετά την εκδήλωση εμφράγματος φάνηκε να επηρεάζεται από την άσκηση. Συγκεκριμένα ελεγχόμενη αερόβια άσκηση σε επίμυες που είχαν υποστεί ισχαιμικό επεισόδιο, οδήγησε σε υψηλή αύξηση του miR-29a-3p, το οποίο είχε μειωθεί μετά την εκδήλωση εμφράγματος, ενώ σε επίμυες που είχαν υποστεί ισχαιμικό επεισόδιο και δεν ασκούσαν μετά από αυτό, η έκφραση του miR-29a-3p αυξήθηκε λιγότερο και άργησε να επανέλθει στα επίπεδα προ-εμφράγματος. [75]

Επίσης μελετήθηκαν τα επίπεδα των κυτταροκινών (cytokines) ιντερλευκίνης-6 (interleukin-6, IL-6) και του παράγοντα νέκρωσης όγκων α (tumor necrosis factor α, TNF-α). Από τις μετρήσεις με ELISA προέκυψε ότι και οι δύο αυτοί παράγοντες ήταν αυξημένοι έως και τρεις μέρες μετά το επεισόδιο, ενώ μειώθηκαν έξι μήνες μετά από αυτό. Υστερα από τον έλεγχο συσχέτισης κατά Spearman των επιπέδων των κυτταροκινών και του miR-29a-3p έως και τρεις μέρες μετά το επεισόδιο, βρέθηκε ότι τα επίπεδα του παράγοντα νέκρωσης όγκων α (tumor necrosis factor α, TNF-α) σχετίζονταν με τα επίπεδα έκφρασης του miR-29a-3p τη χρονική αυτή στιγμή (έως και τρεις μέρες μετά το επεισόδιο). Κατόπιν ανάλυσης γραμμικής παλινδρόμησης τριών μοντέλων βρέθηκε ότι η συσχέτιση διατηρείται και συγκεκριμένα ήταν αρνητική συσχέτιση. Επομένως φάνηκε ότι, για κάθε μονάδα αύξησης του παράγοντα νέκρωσης όγκων α (tumor necrosis factor α, TNF-α) τα επίπεδα έκφρασης του miR-29a-3p έπεφταν κατά 0,5 με 0,6 μονάδες περίπου. Άρα μπορεί το miR-29a-3p να βρέθηκε ότι συνολικά έχει αυξημένη έκφραση στους ασθενείς που είχαν εκδηλώσει οξύ στεφανιαίο επεισόδιο σε σχέση με την έκφρασή του στους υγιείς, αλλά τα επίπεδα του επηρεάζονταν αρνητικά από την αύξηση του παράγοντα νέκρωσης όγκων α (tumor necrosis factor α, TNF-α).

Σύμφωνα με προηγούμενες έρευνες το συγκεκριμένο microRNA φαίνεται να συμμετέχει σε κοινά βιολογικά μονοπάτια με διάφορους παράγοντες φλεγμονής. Συγκεκριμένα όπως προαναφέρθηκε οι παράγοντες φλεγμονής αυξάνουν μετά από την εκδήλωση του εμφράγματος, καθώς παράγονται από κύτταρα του ανοσοποιητικού. Στη συνέχεια οι παράγοντες αυτοί αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς τους στα κύτταρα του μυοκαρδίου και στους ινοβλάστες, τα οποία στην περίπτωση του εμφράγματος αποτελούν τα βασικά κύτταρα-στόχους των συγκεκριμένων φλεγμονώδων παραγόντων και σηματοδοτούν έτσι την ενεργοποίηση πολλών άλλων μορίων, που συμμετέχουν σε ενδοκυτταρικά μονοπάτια, όπως διάφορους παράγοντες μεταγραφής (transcription factors, TFs). Οι παράγοντες αυτοί αλληλεπιδρούν με τη σειρά τους με microRNAs και δημιουργούν σύμπλοκα, τα οποία εν τέλει συμβάλλουν στη διαδικασία της ίνωσης, της απόπτωσης και της αγγειογένεσης. [74] [76]

Πιο συγκεκριμένα σε αρκετές μελέτες έχει αναφερθεί ότι η αύξηση πολλών παραγόντων φλεγμονής, όπως και του παράγοντα νέκρωσης όγκων α (tumor necrosis factor α, TNF-α) επηρεάζουν την έκφραση του miR-29a-3p στα κύτταρα των ινοβλαστών, οδηγώντας συνήθως στη μείωσή του. Το συγκεκριμένο microRNA είναι απαραίτητο για τη ρύθμιση των γονιδίων κολλαγόνου. Τελικά το κολλαγόνο που παράγεται, συμβάλλει στη δημιουργία ινώδους πλάκας μετά την εκδήλωση του εμφράγματος, καθώς δε ρυθμίζεται σωστά η έκφραση των γονιδίων του. Επίσης αρκετοί παράγοντες φλεγμονής επηρεάζουν την έκφραση του miR-29a-3p, όχι μόνο στα κύτταρα των ινοβλαστών αλλά και στα κύτταρα του μυοκαρδίου, συνήθως αυξάνοντας την έκφρασή του. [77] [78]

Τα επίπεδα των κυτταροκινών έξι μήνες μετά το επεισόδιο είχαν πλέον μειωθεί, όπως είναι αναμενόμενο, καθώς οι ασθενείς πλέον ακολουθούσαν και φαρμακευτική αγωγή με

αντιθρομβωτικά φάρμακα. Η διαφορά αυτή στα επίπεδα των κυτταροκινών ελέγχθηκε για την πιθανή συσχέτιση της με τη διαφορά στα επίπεδα της έκφρασης του mir-29a-3p. Κατόπιν του στατιστικού ελέγχου κατά Spearman δε βρέθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά, επομένως δεν υπήρχε κάποια συσχέτιση.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παρούσα πειραματική εργασία προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

1. Το mir-29a-3p φαίνεται να συμμετέχει στην παθοφυσιολογία της στεφανιαίας νόσου. Ύστερα από τη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του συγκεκριμένου microRNA μεταξύ υγιών και ασθενών βρέθηκε ότι η έκφρασή του μεταβάλλεται σε ασθενείς, οι οποίοι εκδήλωσαν ένα στεφανιαίο επεισόδιο και τείνει να επανέλθει έξι μήνες μετά από αυτό. Ωστόσο είναι σημαντικό να αυξηθεί το δείγμα της έρευνας, ώστε να αποσαφηνιστεί ο τρόπος με τον οποίο αυτό μεταβάλλεται, αν δηλαδή αυξάνει ή μειώνει την έκφρασή του μετά το έμφραγμα.
2. Η έκφραση του μετά το επεισόδιο επηρεάζεται και από το περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως είναι η άσκηση, ύστερα από την εκδήλωση του στεφανιαίου επεισοδίου. Επιπλέον, ένα ποσοστό των ασθενών, μεγαλύτερο του 20% είχε επανανοσηλεία, λόγω εκδήλωσης ενός δεύτερου επεισοδίου κατά την περίοδο του follow up 6 μηνών. Αρα θα ήταν και πάλι σημαντικό να αυξηθεί το δείγμα, ώστε να ελεγχθεί αν η έκφραση του συγκεκριμένου microRNA συμβάλλει στην πρόγνωση ενός δεύτερου εμφράγματος.
3. Το mir-29a-3p πιθανώς συμμετέχει σε μοριακά μονοπάτια της νόσου κοινά με αυτά κάποιων παραγόντων φλεγμονής. Μέχρι τώρα στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί ότι η έκφραση του στα κύτταρα των ινοβλαστών επηρεάζεται άμεσα αρνητικά από την αύξηση του TGF- β . Από τη μελέτη μας προέκυψε ότι η έκφραση του mir-29a-3p, το οποίο έχει βγει στην κυκλοφορία και μετρήθηκε στο πλάσμα των ασθενών, επηρεάζεται αρνητικά από τα επίπεδα του TNF- α μετά το έμφραγμα, ο οποίος φάνηκε να αυξάνεται. Συγκεκριμένα για κάθε μονάδα αύξησης του TNF- α το mir-29a-3p μειωνόταν κατά 0,5 με 0,6 περίπου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Seven Countries Study	Έρευνα των Επτά Χωρών
Interleukin – 6	Ιντερλευκίνη – 6
Tumor necrosis factor – α	Παράγοντας νέκρωσης όγκου - α
Matrix metalloproteinase – 9	Μητρική μεταλλοπρωτεΐνάση – 9
C-reactive protein	Αντιδρώσα πρωτεΐνη C
Interleukin – 18	Ιντερλευκίνη – 18
Transforming growth factor – beta	Μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας β
Brain natriuretic peptide	Εγκεφαλικό νατριουρητικό πεπτίδιο
Exportin – 5	Εξπορτίνη – 5
Single nucleotide polymorphism	Πολυμορφισμός μονού νουκλεοτιδίου
Creatinine kinase MB	Κινάση της κρεατινίνης MB
Threshold Cycle	Κύκλος ποσοτικοποίησης (ή κατωφλίου)
Small non-coding RNAs	Μικρά μη κωδικά μόρια RNAs
X-inactivation RNAs	RNAs X - απενεργοποίησης
Small nucleolar-organizer RNAs	Μικρά πυρηνισκικά RNAs
Telomeric small RNAs	Μικρά τελομερικά RNAs
Centrosome associated RNAs	Σχετιζόμενα με τα κεντροσωμάτια RNAs
World Health Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
American Heart Association	Αμερικάνικη Εταιρία Καρδιολογίας
Transcription factors	Παράγοντες μεταγραφής

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

miRNA	MicroRNA
ncRNAs	Non-coding RNAs
sncRNAs	Small non-coding RNAs
siRNAs	Small interfering RNAs
xi-RNAs	X-inactivation RNAs
snoRNAs	Small nucleolar-organizer RNAs
tel-sRNAs	Telomeric small RNAs
crasiRNAs	Centrosome associated RNAs
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
GWAS	Genome Wide Association Study
WHO	World Health Organization
AHA	American Heart Association
Il-6	Interleukin – 6
Il-18	Interleukin – 18
TNF-a	Tumor Necrosis Factor – a
TFs	Transcription Factors
TGF-b	Transforming Growth Factor beta
PCR	Polymerase Chain Reaction
Ct	Threshold Cycle
BMI	Body Mass Index
SCS	Seven Countries Study
MMP-9	Matrix metalloproteinase - 9
CRP	C-reactive protein
CK-MB	Creatinine kinase MB
pri-miRNA	Primary miRNA

pre - miRNA	Precursor miRNA
RISC	RNA-induced silencing complex
FHS	Framingham Heart Study
MONICA	Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease
PROCAM	Prospective Cardiovascular Munster
PREDIMED	PREvencion con Dieta MEDiterranea
BNP	Brain Natriuretic Peptide
HELIOS	Hellenic Infracrion Observation Study
MI	Myocardial Infarction
ΟΣΣ	Οξύ Στεφανιαίο Σύνδρομο
OEM	Οξύ Έμφραγμα Μυοκαρδίου
ΚΝ	Καρδιαγγειακά Νοσήματα
ΣΝ	Στεφανιαία Νόσος
ΑΕΕ	Αγγειακό Εγκεφαλικό Επεισόδιο
ΣΔ2	Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2
ΗΚΓ	Ηλεκτρο-καρδιογράφημα

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1: Μεταβολή της έκφρασης κάποιων microRNAs κατά την εκδήλωση εμφράγματος του μυοκαρδίου σε διαφορετικούς πληθυσμούς.

Επίπεδα έκφρασης	MicroRNAs
Υπερέκφραση	mir-19, mir-146, mir-223, mir-765, mir-133a, mir-191, mir-313, mir-23a, mir-34a, mir-526b, mir-25, mir-106b, mir-451, mir-590, mir-122, mir-370, mir-340, mir-624, mir-208a, mir-135, mir-130, mir-27b, mir-210
Υποέκφραση	mir-29a, mir-30e, mir-145, mir-140, mir-150, mir-181, mir-182, mir-342, mir-378, mir-584
Υπέρ- και Υπό-έκφραση	mir-92a, mir-126, mir-29a*, mir-155 * mir-147, mir-149, mir-424, mir-222

*Στις περισσότερες έρευνες βρέθηκε ότι υποεκφράζονται

Πίνακας 2: Ποσότητες για την παρασκευή του TURBO DNase.

Υλικά	Όγκος ανά δείγμα
MagMAX TURBO DNase Buffer	45 µl
TURBO Dnase	5 µl
Total DNase Solution	50 µl

Πίνακας 3: Ποσότητες για την παρασκευή του PK DigestionMix.

Υλικά	Όγκος ανά δείγμα
PK Digestion Buffer	45 µl
Proteinase K	5 µl
Total PK Digestion Mix	50 µl

Πίνακας 4: Ποσότητες για την παρασκευή του Lysis Binding Mix.

Υλικά	Όγκος ανά δείγμα
Lysis Buffer	99 µl
2-mercaptoethanol	1 µl
Total Lysis Binding Mix	100 µl

Πίνακας 5: Ποσότητες για την προετοιμασία του Poly-A Reaction Mix

Υλικά	Όγκος ανά δείγμα
10X Poly(A) Buffer	0,5 µl
ATP	0,5 µl
Poly(A) Enzyme	0,3 µl
RNase free water	1,7 µl
Total Poly(A) Reaction Mix	3,0 µl

Πίνακας 6: Ποσότητες για την προετοιμασία του Ligation Reaction Mix.

Υλικά	Όγκος ανά δείγμα
5X DNA Ligase Buffer	3 µl
50% PEG 8000	4,5 µl
25X Ligation Adaptor	0,6 µl
RNA Ligase	1,5 µl
RNase-free water	0,4 µl
Total Ligation Reaction Mix	10 µl

Πίνακας 7: Ποσότητες για την προετοιμασία του Reverse Transcription Reaction Mix.

Υλικά	Όγκος ανά δείγμα
5X RT Buffer	3 µl
d NTP Mix (5Mm)	4,5 µl
20X Universal RT Primer	0,6 µl
10X RT Enzyme Mix	1,5 µl
RNase-free water	0,4 µl
Total RT Reaction Mix	10 µl

Πίνακας 8: Ποσότητες για την προετοιμασία του miR-Amp Mix.

Υλικά	Όγκος ανά δείγμα
2X miR Amp Master Mix	25 µl
20X miR Amp Primer Mix	2,5 µl
RNase-free water	17,5 µl
Total miR Amp Reaction Mix	45 µl

Πίνακας 9: Ποσότητες για την προετοιμασία του Real-Time Reaction Mix.

Υλικά	Όγκος ανά δείγμα
TaqMan Fast Advanced Master Mix(2X)	10 µl
TaqMan Advanced miRNA Assay (20X)	1 µl
RNase-free water	4 µl
Total PCR Reaction Mix	15 µl

Πίνακας 10: Οι κύκλοι και οι θερμοκρασίες στο μηχάνημα της Applied Biosystems για τη Real-time PCR.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Ενεργοποίηση Ενζύμου	95 °C	20 sec	1
Αποδιάταξη	95 °C	3 sec	40
Σύνδεση εκκινητών/Επέκταση	60 °C	30 sec	

Πίνακας 11: Περιγραφικά στοιχεία του δείγματος.

Ηλικία (έτη)	58±11
Φύλο (άνδρες %)	82,9
Μορφωτικό Επίπεδο (Πρωτοβάθμια Εκπαίδευση) (%)	31,4
Μορφωτικό Επίπεδο (Δευτεροβάθμια Εκπαίδευση) (%)	48,6
Μορφωτικό Επίπεδο (Τριτοβάθμια εκπαίδευση) (%)	17,1
Δημόσιος ή Ιδιωτικός Υπάλληλος (%)	40

Αυτοαπασχολούμενος (%)	50
Συνταξιούχος (%)	5,7
Οικιακά (%)	2,9

Πίνακας 12: Δεδομένα για συνοδά νοσήματα, επανανοσηλεία και τον τρόπο ζωής των ασθενών

Υπέρβαροι (%)	48,6
Παχύσαρκοι (%)	25,7
Υπέρταση (%)	28,6
Υπερλιπιδαιμία (%)	31,4
Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2 (%)	18,6
Οικογενειακό Ιστορικό (%)	11,4
Επανανοσηλεία (%)	22,9
Κάπνισμα (%)	54,2
Διακοπή καπνίσματος (%)	42,1
Άσκηση (%)	62,8
Ώρες ύπνου	7±1,3
Ώρες τηλεθέασης	3±2,2
Ώρες στον υπολογιστή	2±1,1

Πίνακας 13: Έλεγχος t-test για τη συσχέτιση της μεταβολής του mir-29a-3p με περιβαλλοντικούς παράγοντες

Περιβαλλοντικοί Παράγοντες – % Δ(Μέσου όρου)	Μέσος όρος	p- value
Φύλο		
Άνδρες (=14)	53,3571 ± 122,68336	0,802
Γυναίκες(=5)	-3,7000 ± 116,25175	
Ηλικία		
>50 έτη	47,5757 ± 140,25217	0,385
<50 έτη	22,5143 ± 84,22548	
Κάπνισμα		

Συνέχιση του καπνίσματος(=9)	62,7111 ± 63,04648	0,174
Διακοπή καπνίσματος(=10)	16,4100 ± 156,26327	
Επανενοσηλεία		
Ναι(=5)	-2,2600 ± 77,09736	0,327
Όχι(=14)	52,8429 ± 132,07081	
Οικογενειακό Ιστορικό		
Ναι(=2)	83,2500 ± 41,50717	0,345
Όχι(=17)	33,0588 ± 126,36425	
Συνοδά νοσήματα		
Ναι(=9)	-1,5222 ± 98,1265	0,493
Όχι(=10)	74,2200 ± 132,23592	
Ώρες τηλεθέασης		
>3 ώρες/ημέρα(=11)	35,8909 ± 155,35918	0,051
<3 ώρες/ημέρα(=8)	41,7125 ± 53,71332	
Ώρες υπολογιστή		
>2 ώρες/ημέρα(=9)	-8,3000 ± 99,03179	0,712
<2 ώρες/ημέρα(=10)	80,3200 ± 127,39196	
Άσκηση		
Ναι(=13)	32,0308 ± 78,04403	0,047 *
Όχι(=6)	52,0167 ± 193,38424	

Πίνακας 14: Ανάλυση μοντέλων γραμμικής παλινδρόμησης για τη σχέση της μεταβολής της έκφρασης του mir-29a-3p με την άσκηση

	Μοντέλο 1		Μοντέλο 2		Μοντέλο 3	
	R²=0,06		R²=0,075		R²=0,131	
Ποσοστό μείωσης mir-29a-3p – Άσκηση	B	p-value	B	p-value	B	p-value
	-0,079	0,747	-0,076	0,750	-0,038	0,717

Πίνακας 15: Αποτελέσματα της ανάλυσης των μοντέλων γραμμικής παλινδρόμησης για τον έλεγχο της σχέσης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του mir-29a-3p και των επιπέδων του TNF-a έως και τρεις ημέρες μετά το επεισόδιο.

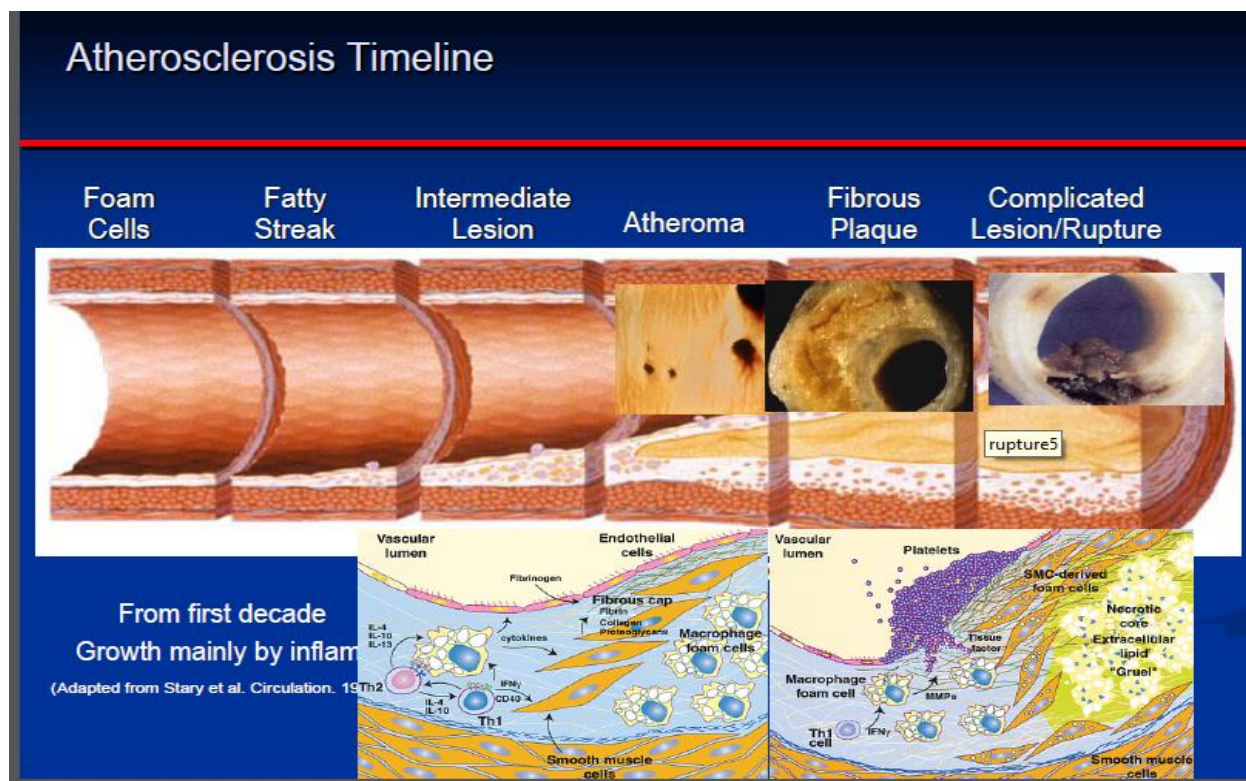
	Μοντέλο 1 R²=0,285		Μοντέλο 2 R²=0,397		Μοντέλο 3 R²=0,400	
Επίπεδα έκφρασης mir-29a-3p- Επίπεδα TNF-a	B	p-value	B	p-value	B	p-value
	-0,534	0,006*	-0,603	0,012*	-0,556	0,03*

Πίνακας 16: Σύγκριση αποτελεσμάτων με τα αποτελέσματα της έρευνας HELIOS

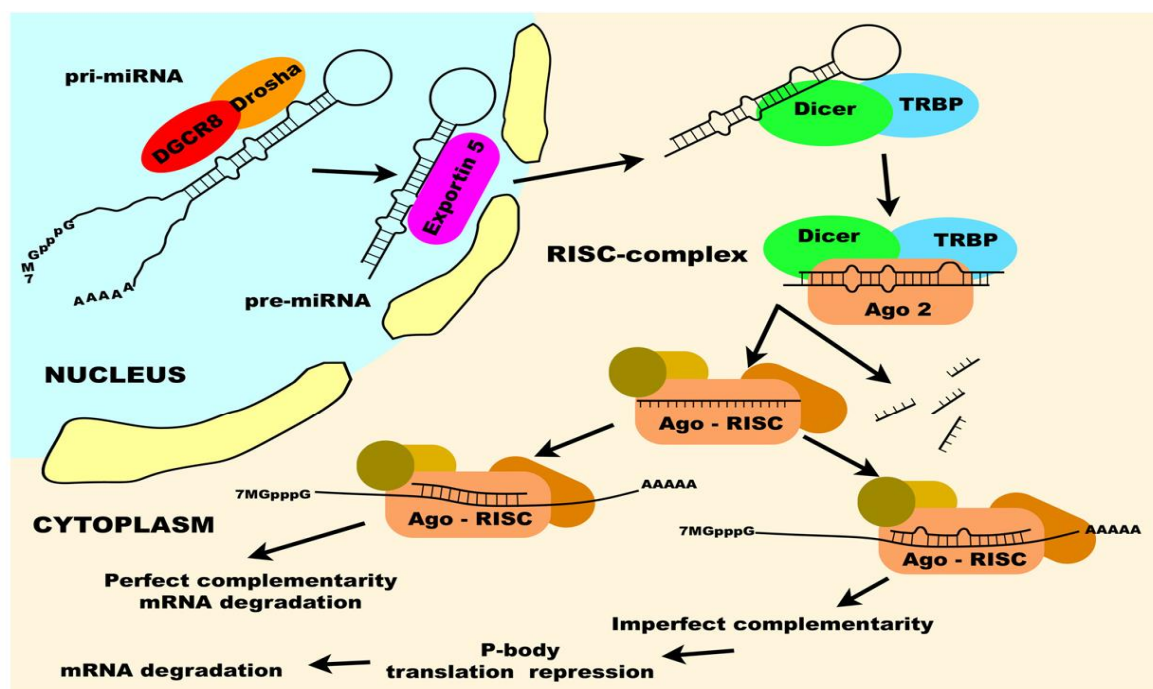
Χαρακτηριστικό	Αποτελέσματα	HELIOS	Αποτέλεσμα σύγκρισης(ποσοστό)
Ηλικία	58±11	58±13	-
Ποσοστό ανδρών (%)	82,9	75	Αυξημένο
Κάπνισμα (%)	54,2	71	Μειωμένο
Υπέρταση (%)	28,6	59	Μειωμένο
Υπερλιπιδαιμία (%)	31,4	50	Μειωμένο
Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2 (%)	18,6	31	Μειωμένο
Υπέρβαροι (%)	48,6	73	Μειωμένο
Παχύσαρκοι (%)	25,7	22	-
Οικογενειακό ιστορικό (%)	11,4	22	Μειωμένο

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

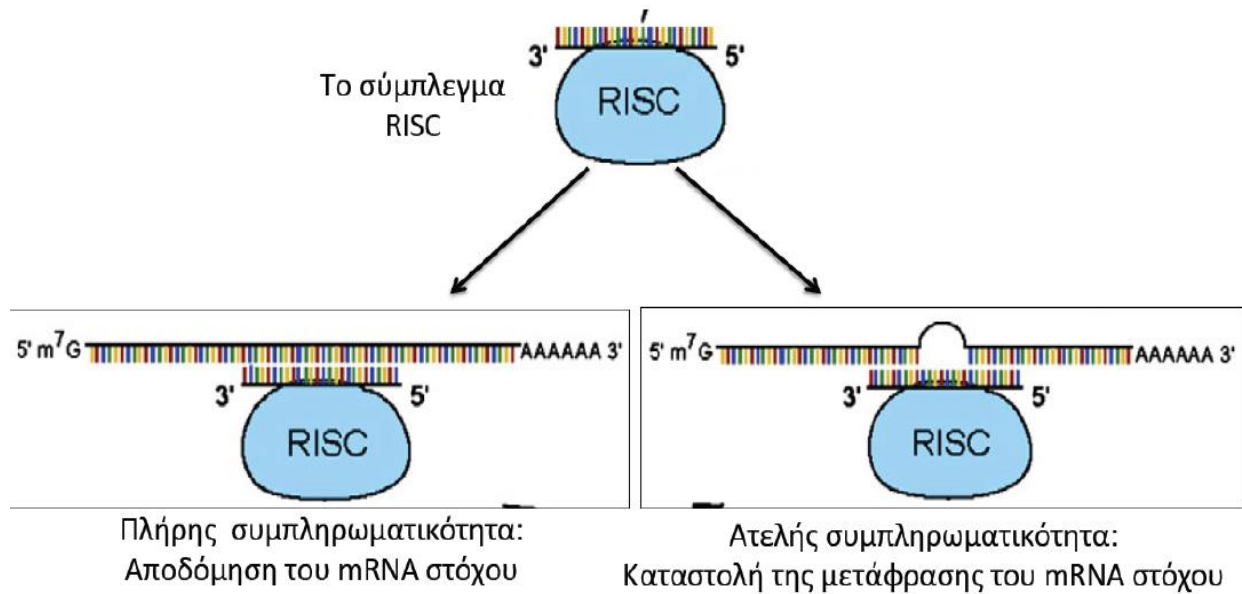
ΕΙΚΟΝΕΣ



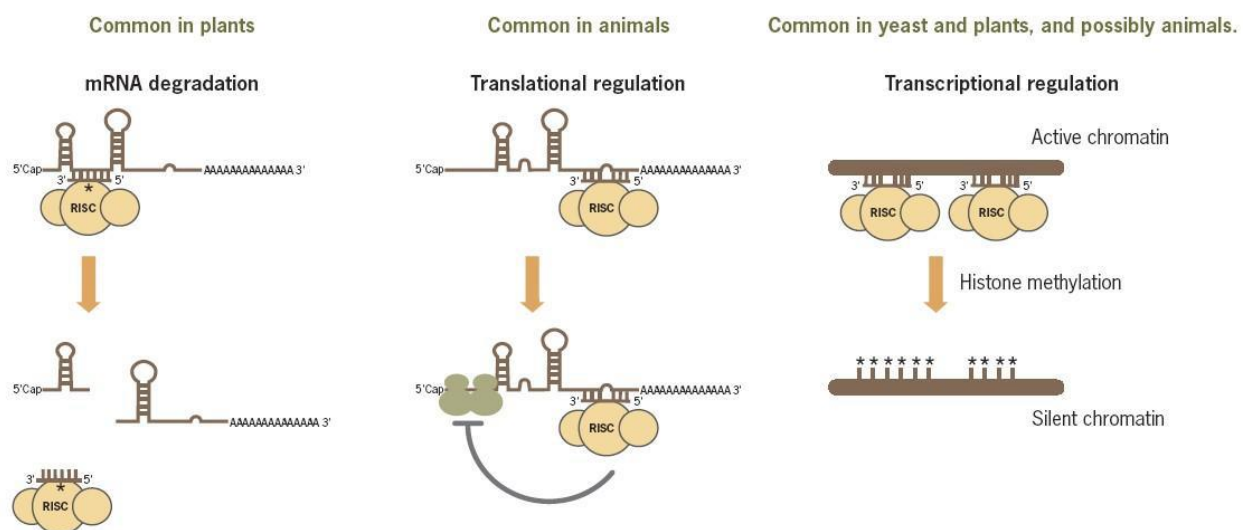
Εικόνα 1: Στάδια της διαδικασίας της αθηροσκλήρωσης [15]



Εικόνα 2: Στάδια βιογένεσης των microRNAs και η δράση τους στο mRNA [38]

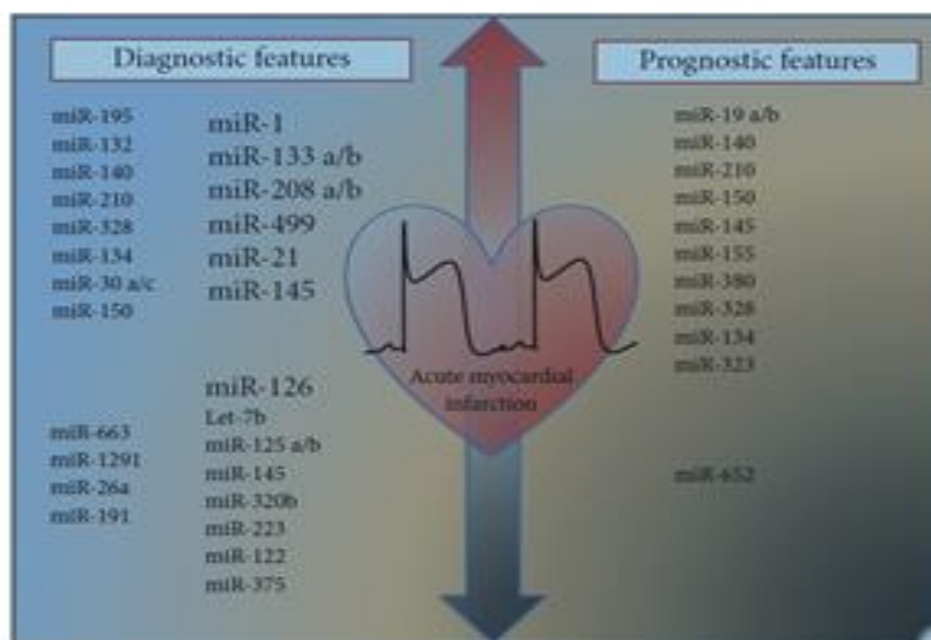


Εικόνα 3: Ο ρόλος των microRNAs στη γονιδιακή ρύθμιση σε μεταφραστικό επίπεδο [40]

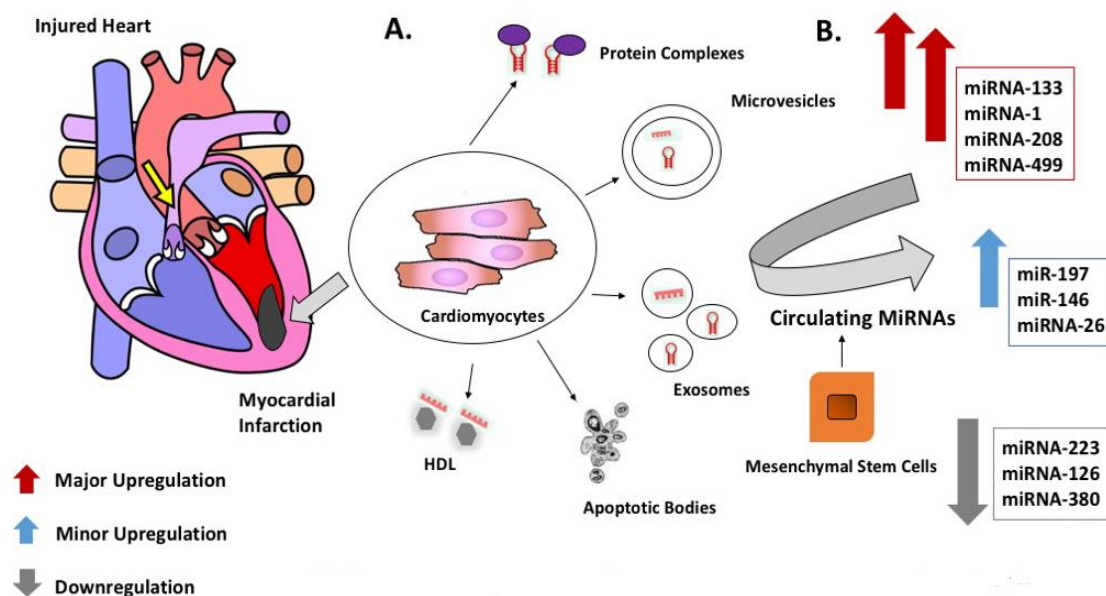


Εικόνα 4: Ο ρόλος των miRNAs στη ρύθμιση της έκφρασης σε γονιδιακό επίπεδο [40]

Μελέτη έκφρασης του miR-29a-3p και περιβαλλοντικών παραγόντων σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο επεισόδιο

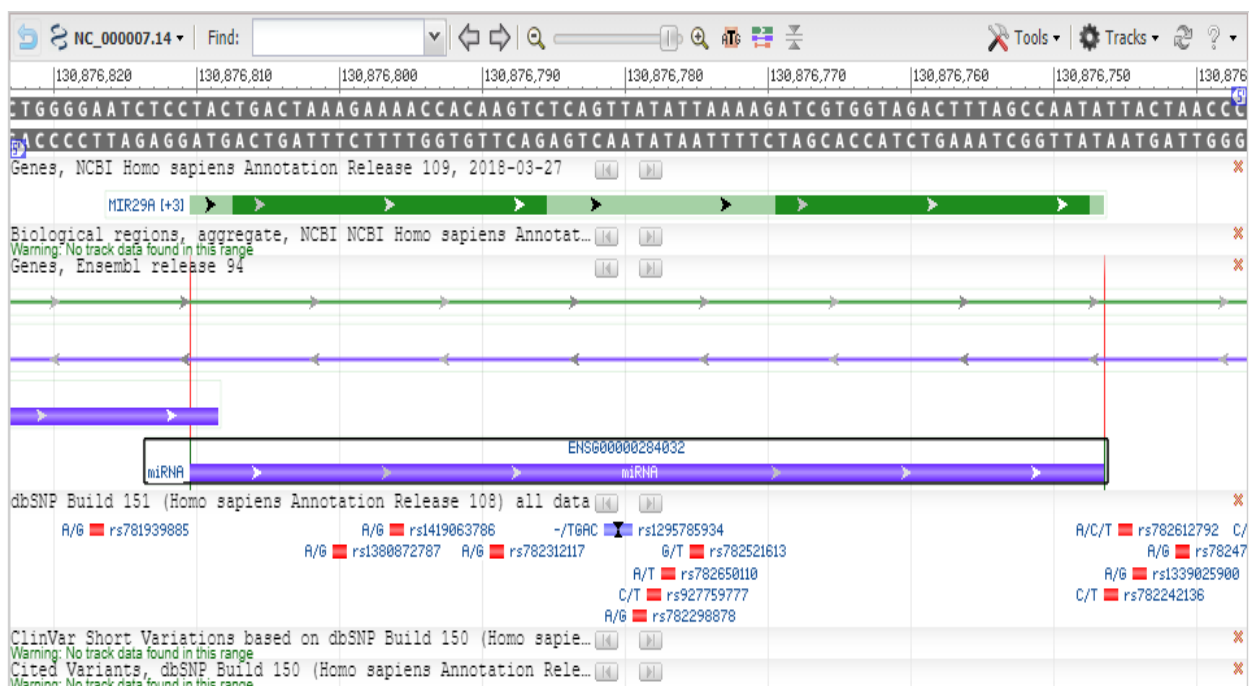


Εικόνα 5: Τα κυκλοφορούντα microRNAs, τα οποία έχουν συσχετιστεί με τη διάγνωση και πρόγνωση των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Ειδικά τα microRNAs με μεγαλύτερου μεγέθους γραμματοσειρά είναι αυτά που έχουν συσχετιστεί με έμφραγμα μυοκαρδίου [48]

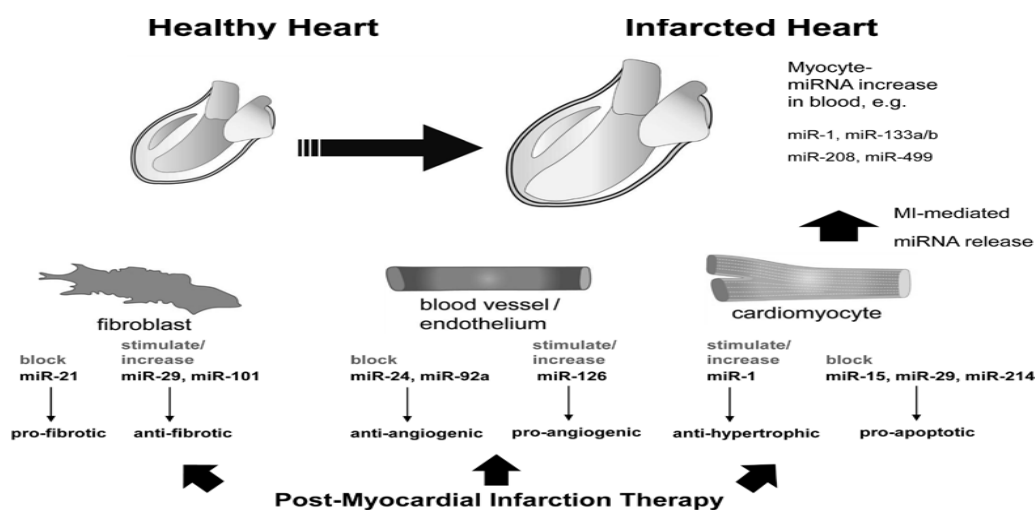


Εικόνα 6: Α. Η προέλευση και η απελευθέρωση των microRNAs στην κυκλοφορία κατά το έμφραγμα μυοκαρδίου. Σε απόκριση του εμφράγματος τα τραυματισμένα κύτταρα του μυοκαρδίου επηρεάζουν την έκφραση των microRNAs, μέσω διαφόρων μηχανισμών που περιλαμβάνουν κι άλλους παράγοντες όπως εξωσωμάτια, αποπτωτικά σωμάτια, υψηλή πυκνότητα λιποπρωτεϊνών και άλλα πρωτεϊνικά συμπλέγματα. Β. Η λίστα με κάποια από τα microRNAs που υποεκφράζονται ή υπερεκφράζονται μετά την εκδήλωση του εμφράγματος του μυοκαρδίου [52]

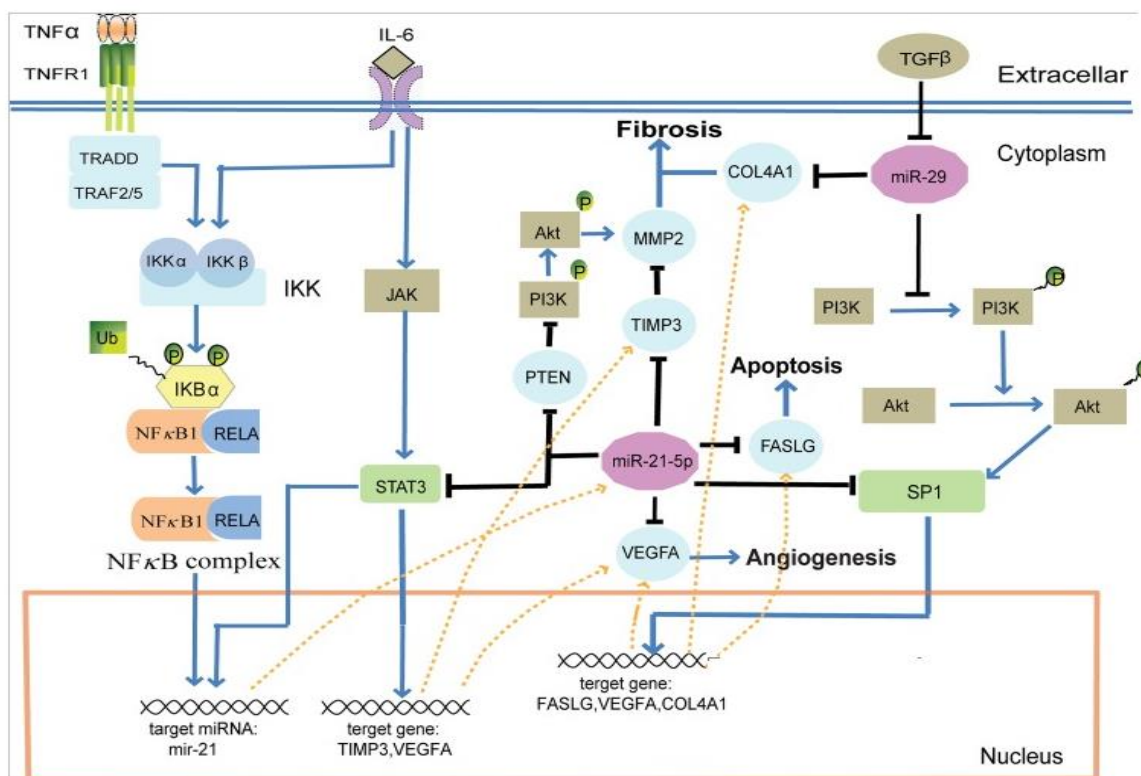
Μελέτη έκφρασης του mir-29a-3p και περιβαλλοντικών παραγόντων σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο επεισόδιο



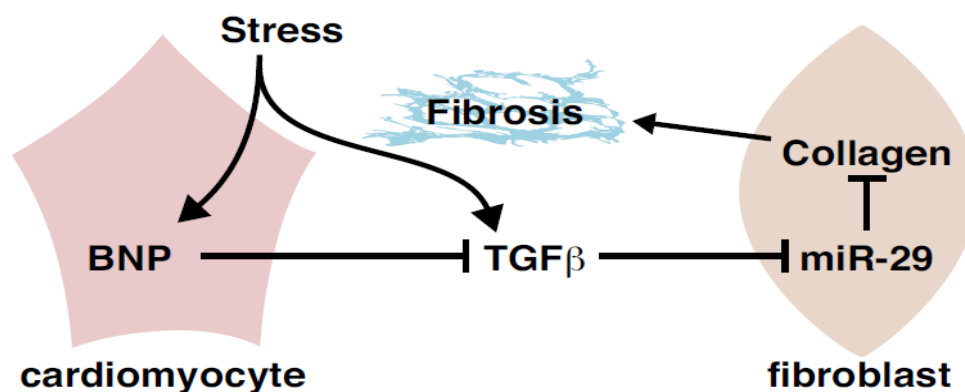
Εικόνα 7: Η ακριβής θέση του χρωμοσώματος 7 από την οποία μεταγράφεται το mir29a έτσι όπως προκύπτει από την GRCh38 p12 Assembly [57]



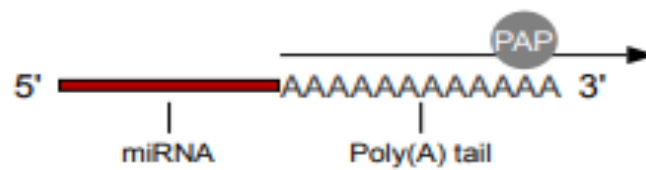
Εικόνα 8: Τα καρδιακά κύτταρα υφίστανται φαινοτυπικές αλλαγές κατά τη διάρκεια του ισχαιμικού επεισοδίου και συγκεκριμένα microRNAs συμμετέχουν στη ρύθμιση του πεπτρωμένου των κυττάρων μετά από το έμφραγμα του μυοκαρδίου. Η θεραπεία μετά το επεισόδιο στοχεύει στη ρύθμιση όλων των μοριακών μονοπατιών στους ινοβλάστες, στα κύτταρα του μυοκαρδίου και του ενδοθηλίου [61]



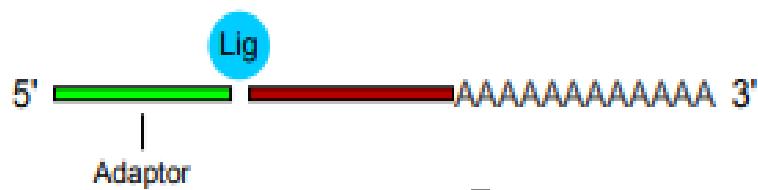
Εικόνα 9: Προτεινόμενο μοντέλο ρύθμισης της έκφρασης κάποιων miRNAs που εκφράζονται στους ινοβλάστες κατά την εκδήλωση εμφράγματος του μυοκαρδίου [62]



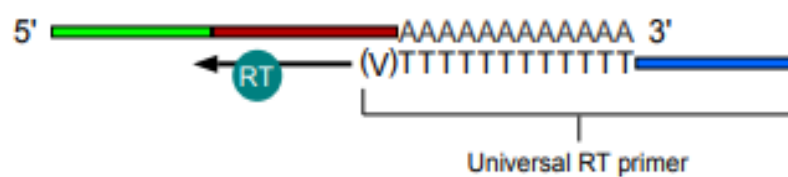
Εικόνα 17: Προτεινόμενο μοντέλο απόκρισης του miR-29 και του TGF-β ύστερα από το στρες του ισχαιμικού επεισοδίου [59]



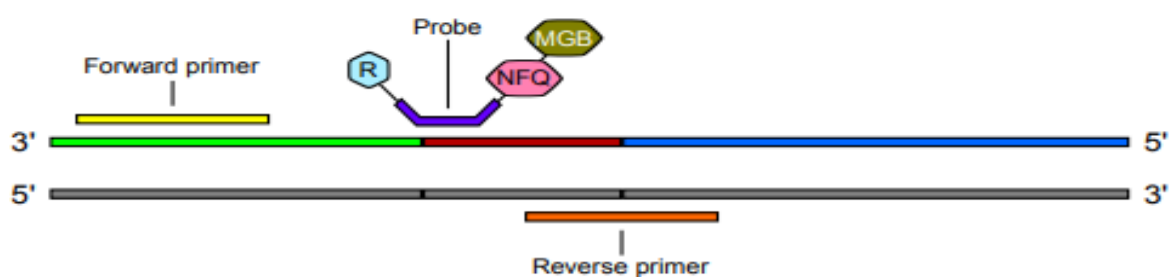
Εικόνα 11: Προσθήκη της Poly-A ουράς στα microRNAs



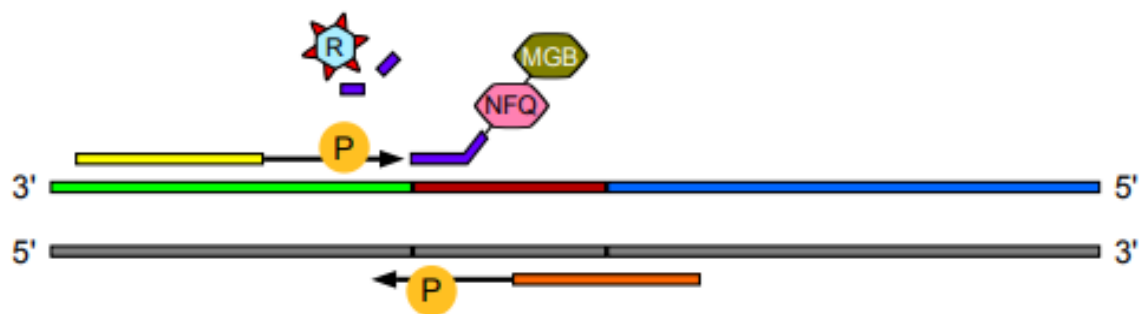
Εικόνα 12: Σύνδεση του adaptor στο microRNA με αντίδραση λιγάσης



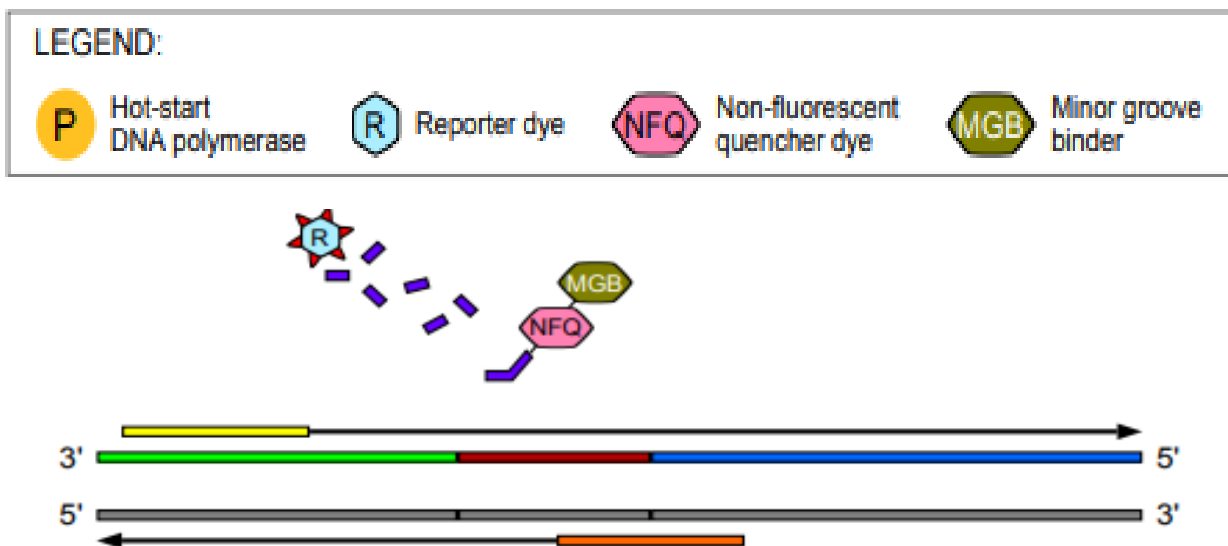
Εικόνα 13: Σύνδεση του Universal RT primer στην Poly-A ουρά



Εικόνα 14: Σύνδεση των εκκινήτων και των ανιχνευτών στους κλώνους c DNA

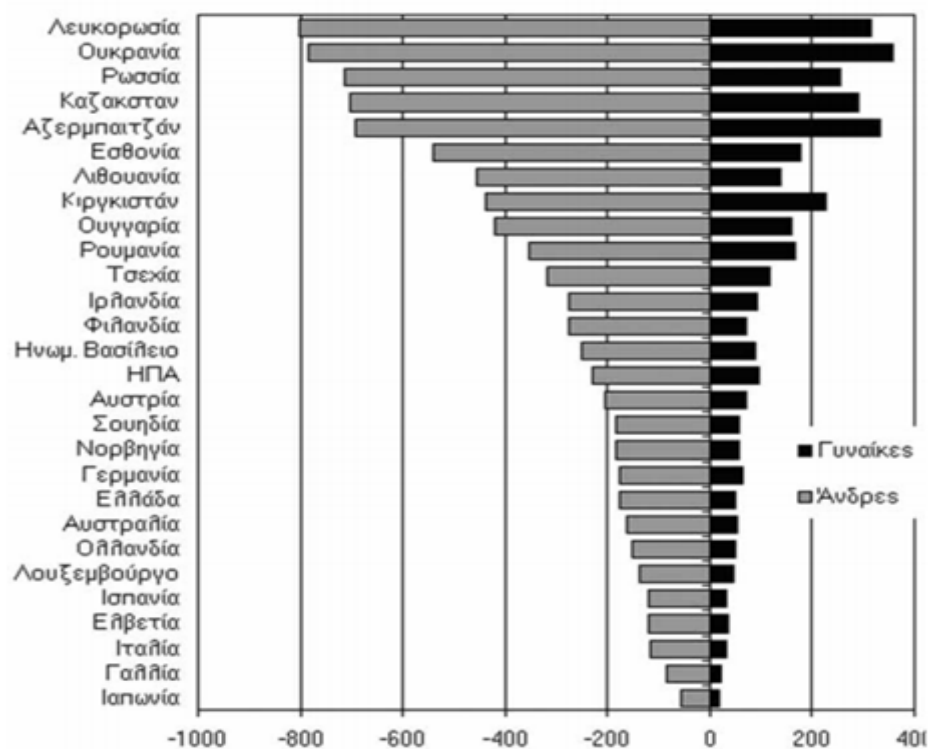


Εικόνα 15: Αρχικός πολυμερισμός και διαχωρισμός της χρωστικής αναφοράς από τον ανιχνευτή

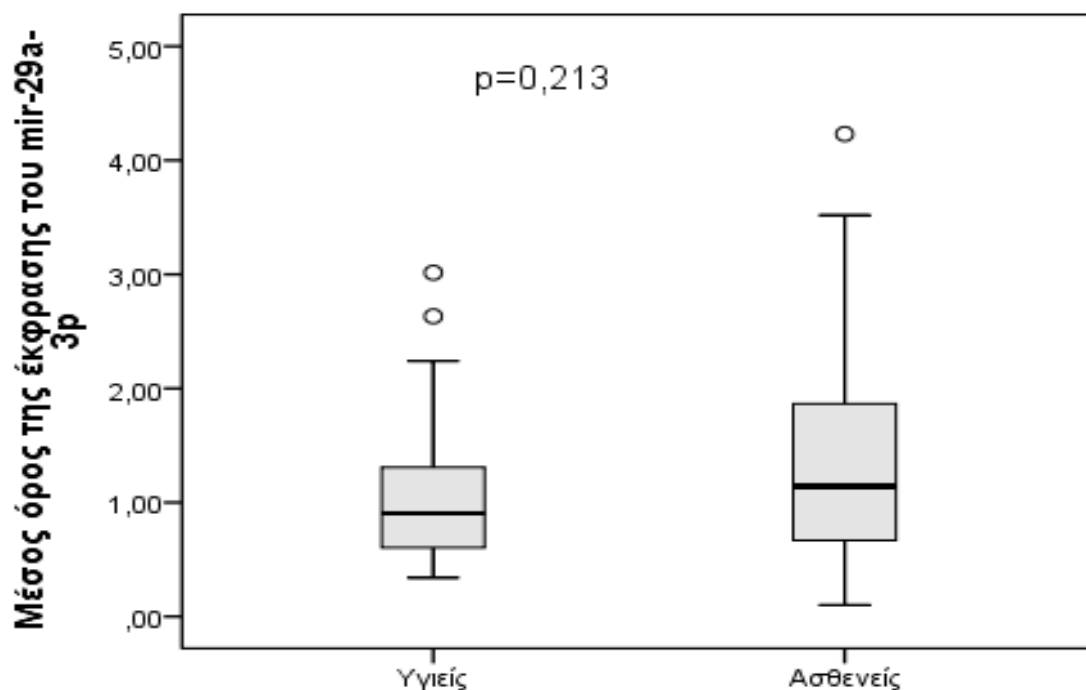


Εικόνα 16: Ολοκλήρωση του πολυμερισμού

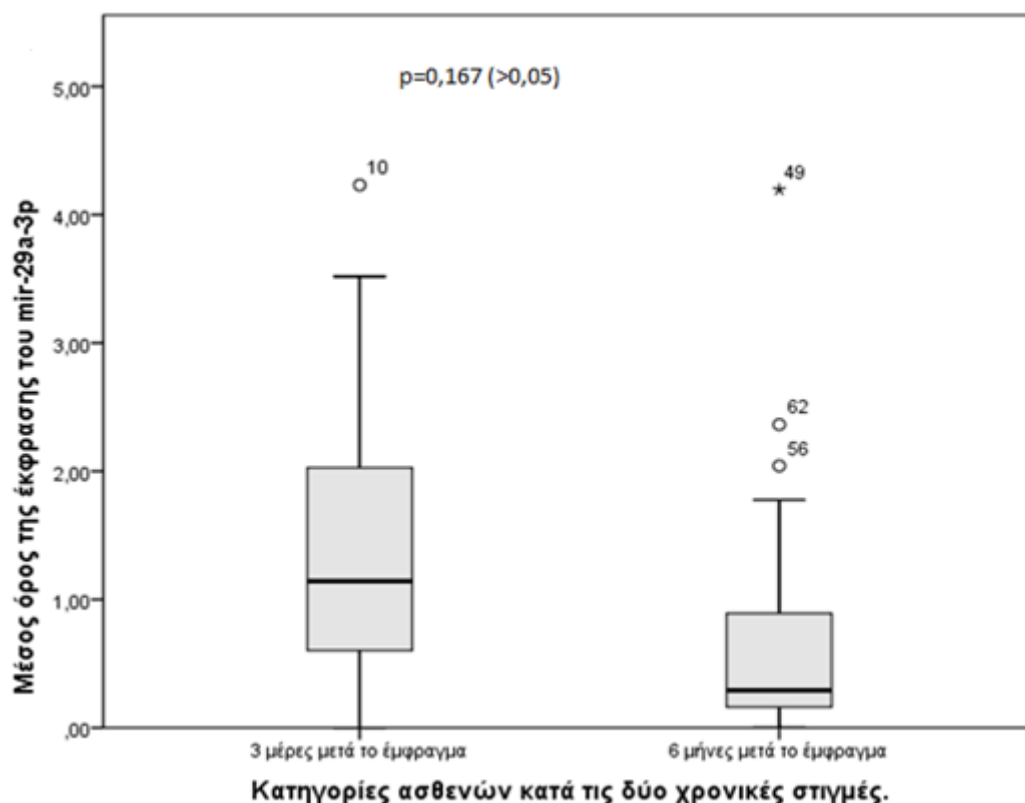
ΣΧΗΜΑΤΑ



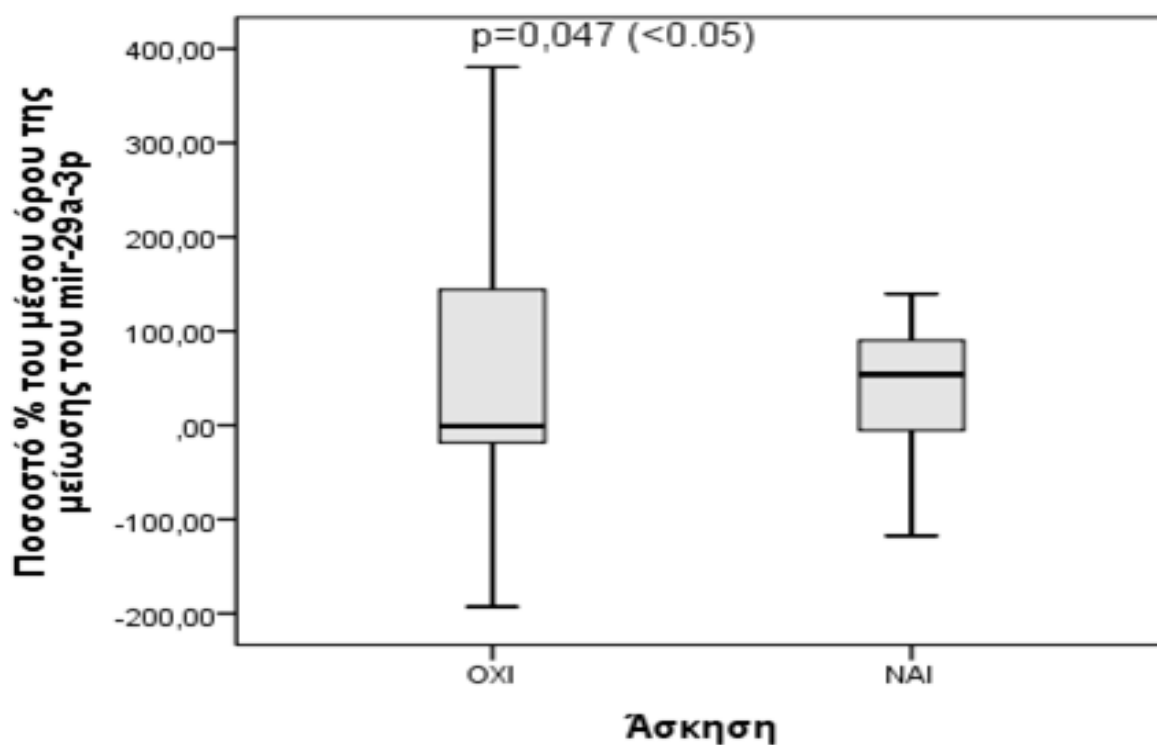
Σχήμα 1: Ρυθμός θανάτου από τη στεφανιαία νόσο σε άνδρες και γυναίκες ηλικίας 5-74 ετών [7]



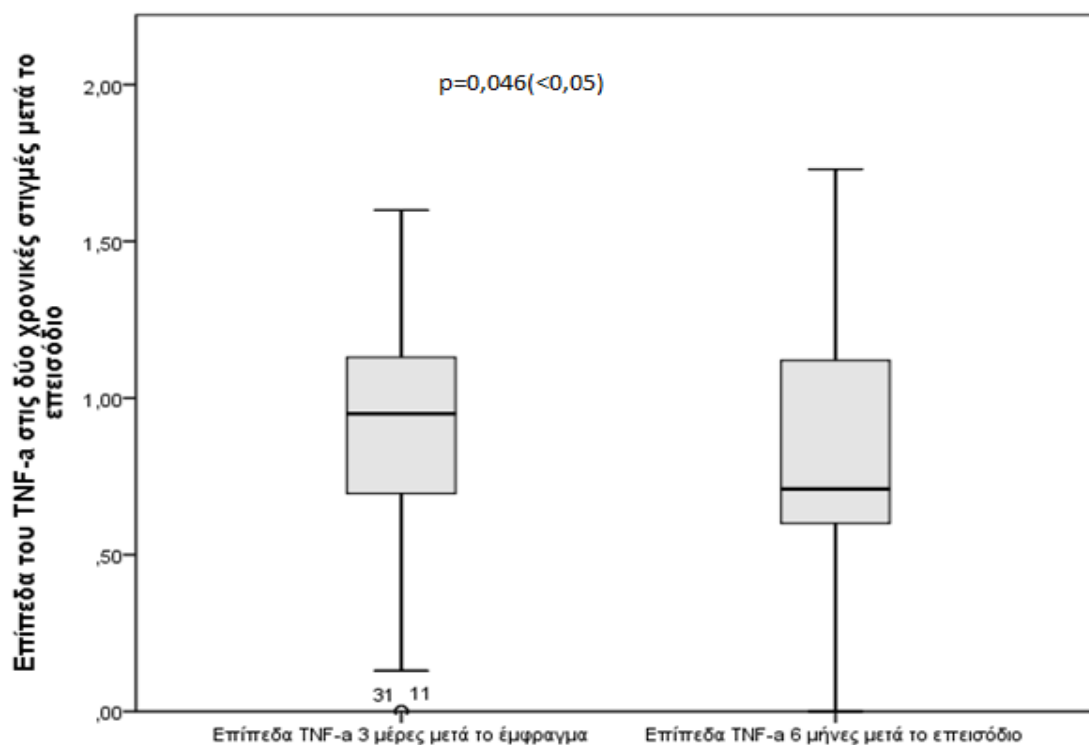
Σχήμα 2: Η έκφραση του mir-29a-3p σε RQ Units σε υγιείς και ασθενείς



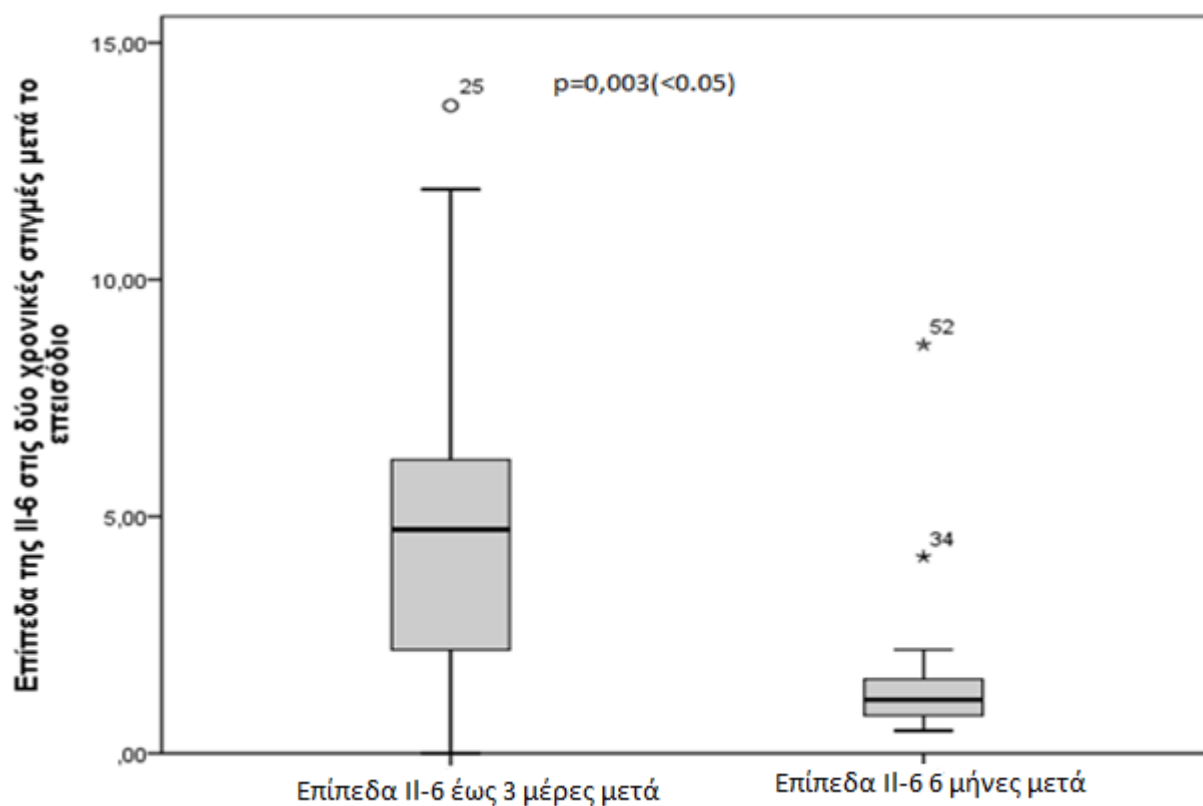
Σχήμα 3: Μέσος όρος της έκφρασης του mir-29a-3p σε RQ Units κατά τις δύο χρονικές στιγμές μετά το επεισόδιο



Σχήμα 4: Σχέση της μεταβολής της έκφρασης του mir-29a-3p με την άσκηση



Σχήμα 5: Μέσος όρος των επιπέδων του TNF- α κατά τις δύο χρονικές στιγμές μετά το επεισόδιο



Σχήμα 6: Μέσος όρος των επιπέδων της IL-6 κατά τις δύο χρονικές στιγμές μετά το επεισόδιο

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- [1] Vander A, Sherman J, Luciano D, Τσακόπουλος Μ., Φυσιολογία του ανθρώπου. Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδη 2001.
- [2] Mendis, Shanthi, Puska, Pekka, Norrving, B, World Health Organization, World Heart Federation. et al., Global atlas on cardiovascular disease prevention and control / edited, 2011.
- [3] Mozzafarian D. et. Al., Heart Disease and Stroke Statistics-Update: A Report From the American Heart Association. 2016.
- [4] Πίτσαβος ΗΧ, Παναγιωτάκος ΒΔ, Στεφανάδης ΙΧ. Η Επιδημιολογία της Στεφανιαίας Νόσου στην Ελλάδα: Οξεία Στεφανιαία Σύνδρομο. Αθήνα: Εκδόσεις Κωστάκη. 2004.
- [5] Τριχόπουλος Δ, Καλαποθάκη Β, Πετρίδου Ε. Προληπτική Ιατρική και Δημόσια Υγεία. Αθήνα: Εκδόσεις Ζήτα. 2000.
- [6] Ancel Keys et al. Mortality and Coronary Heart Disease Among Men Studied for 23 years. August 1971. Arch Intern Med. 1971;128(2):201-214.
- [7] Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control, World Health Organization in collaboration with the World Heart Federation and the World Stroke Organization, 2011, p.111.
- [8] Assmann and Schulte et. al., Prediction of risk of coronary events in middle-aged men in the Prospective Cardiovascular Münster Study (PROCAM) using neural networks. International Journal of Epidemiology, Volume 31, Issue 6, December 2002, p.1253-1262.
- [9] Guasch-Ferré et al., Frequency of nut consumption and mortality risk in the PREDIMED nutrition intervention trial. July 2013.
- [10] Menotti A. et al., Food consumption patterns in the 1960s in seven countries. May 1989.
- [11] Chrysoshoou C et al. (2002). Gender differences on the risk evaluation of acute coronary syndromes: The CARDIO2000 study. Prev Cardiol, 6(2): 71-7.
- [12] Πίτσαβος ΗΧ, Παναγιωτάκος ΒΔ, Στεφανάδης ΙΧ. Η Επιδημιολογία της Στεφανιαίας Νόσου στην Ελλάδα: Οξεία Στεφανιαία Σύνδρομο. Αθήνα: Εκδόσεις Κωστάκη. 2004.
- [13] A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. May 1994.
- [14] Fan and Watanabe et al., Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. J Atheroscler Thromb. 2003 ;10(2):63-71.
- [15] Ever D Grech et al. Acute coronary syndrome: unstable angina and non-ST segment elevation myocardial infarction. BMJ 2003; 326.
- [16] Stone GW et al. A prospective natural-history study of coronary atherosclerosis. N Engl J Med 2011, 364(3): p.226-235
- [17] Peter H. Stone et. al. Influence of Race, Sex, and Age on Management of Unstable Angina and Non—Q-Wave Myocardial Infarction. JAMA. 1996;275(14):1104-1112.
- [18] Κρεμαστινός, Δ. Θ 2009. ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΑ. ΑΘΗΝΑ: Εκδόσεις Πασχαλίδης. Σελ:452-80.
- [19] Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP. Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. 2006. JACC 36 (3): p.959-69.
- [20] Colledge N, Walker B, Ralston S. Davidson's Γενικές αρχές και κλινική πράξη της ιατρικής παθολογίας. Εκδόσεις Παρισιάνου ΑΕ. 2004.
- [21] Τούτουζας ΠΚ. Καρδιολογία. Αθήνα: Εκδόσεις Παρισιάνου 1999.

- [22] Imes CC, Lewis FM. Family history of cardiovascular disease perceived cardiovascular disease risk, and health-related behavior: a review of the literature, 2014 (2):108-29.
- [23] Forouhi NG, Sattar N. CVD risk factors and ethnicity--a homogeneous relationship. 2006 (1):11-9.
- [24] National Heart, Lung and Blood Institute. Coronary Heart Disease <http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/cad/causes> [Προσπελάστηκε 06/01/2019].
- [25] Stephen Kaptoge, Sreenivasa Rao Kondapally Seshasai, Pei Gao, Daniel F. Freitag, Adam S. Butterworth¹, Anders Borglykke, Emanuele Di Angelantonio, Vilhelm Gudnason, Ann Rumley, Gordon D.O. Lowe, Torben Jørgensen, and John Danesh. Inflammatory cytokines and risk of coronary heart disease: new prospective study and updated meta-analysis, *European Heart Journal*. 2004 p35, 578.
- [26] Βούλγαρη Π., Σημειώσεις Ανοσολογίας, Κεφ. 11, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. 2014.
- [27] Ambrose JA, Barua RS. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *Journal of the American College of Cardiology*, 2004 p.1731-7.
- [28] Mahan LK, Escott-Stump. Krause's Food Nutrition and Diet Therapy. WB Sanders Company. 2004.
- [29] Ζαμπέλας Α. Κλινική Διαιτολογία & Διατροφή με Στοιχεία Παθολογίας. Τόμος Ι. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης 2007.
- [30] Jonathan Mayers, Exercise and Cardiovascular Health, *Circulation*, AHA Journals, January 7, 2003 Vol 107, Issue 1.
- [31] Player MS, Peterson LE, Anxiety disorders, hypertension, and cardiovascular risk: a review. *Int J Psychiatry Med* 2011;41(4):365-77.
- [32] Krieger N. et. al. Measuring social class in US public health research: concepts, methodologies, and guidelines. *Annu Rev Public Health*. 1997;18:341-78.
- [33] Colditz, G. A., M. J. Stampfer, et al. "A prospective study of parental history of myocardial infarction and coronary heart disease in women." *Am J Epidemiol* 1986 123(1): 48-58.
- [34] Schildkraut, J. M., R. H. Myers, et al. "Coronary risk associated with age and sex of parental heart disease in the Framingham Study." *Am J Cardiol* 1989 64(10): 555-559.
- [35] Marenberg, M. E., N. Risch, et al. "Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins." *N Engl J Med* 1994 330 (15): 1041-1046.
- [36] Watson J, M. R., Caudy A, Witkowski J. Ανασυνδιασμένο DNA, γονίδια και γονιδιώματα-μια συνοπτική παρουσίαση, Ακαδημαϊκές εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε. 2007.
- [37] Cai Y. et al. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2009 Dec;7(4):147-54.
- [38] Ha M., Kim VN, Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Aug;15(8):509-24.
- [39] He, L. and G.J. Hannon, MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(7): p. 522-531.
- [40] He, L. and G.J. Hannon, MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(7): p. 522-531.
- [41] da Costa Martins PA, Bourajaj M, Gladka M, Kortland M, van Oort RJ, Pinto YM, Molkentin JD, De Windt LJ. Conditional dicer gene deletion in the postnatal myocardium provokes spontaneous cardiac remodeling. *Circulation*. 2008;118:1567-1576.
- [42] Wu C, So J, Davis-Dusenbery BN, Qi HH, Bloch DB, Shi Y, Lagna G, Hata A. Hypoxia potentiates microRNA-mediated gene silencing through posttranslational modification of Argonaute2. *Mol Cell Biol*. 2011; 31:4760-4774.
- [43] Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, et al. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science*. 2009; 324:1710-1713.

- [44] Fiedler J, Jazbutyte V, Kirchmaier BC, et al. MicroRNA-24 regulates vascularity after myocardial infarction. *Circulation*. 2011; 124:720–730.
- [45] Wang J, Huang W, Xu R, Nie Y, Cao X, Meng J, Xu X, Hu S, Zheng Z. MicroRNA-24 regulates cardiac fibrosis after myocardial infarction. *J Cell Mol Med*. 2012; 16:2150–2160.
- [46] Qian L, Van Laake LW, Huang Y, Liu S, Wendland MF, Srivastava D. miR-24 inhibits apoptosis and represses Bim in mouse cardiomyocytes. *J Exp Med*. 2011; 208:549–560.
- [47] Christian Schulte et al. MicroRNA-based diagnostics and therapy in cardiovascular disease—Summing up the facts. *Cardiovasc Diagn Ther*. 2015 Feb; 5(1): 17–36.
- [48] Elena Cavarretta et al. MicroRNAs in coronary heart disease: Ready to enter the clinical arena? Scientific IRCCS Network, Italian Ministry of Health. 2016.
- [49] D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2010;31(22):2765-73.
- [50] Corsten MF, Dennert R, Jochems S, et al. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ. Cardiovasc. Genet*. 2010;3(6):499-506).
- [51] Khalil A, Kamar A, Nemer G. MicroRNAs and Myocardial Infarct: Investigating the Controversial Role of Second-Generation Biomarkers. *J Cholest Heart Dis*. 2017;1(1):8-13.
- [52] Rehan Malik et al. Association Coronary Artery Disease and MicroRNA: Literature Review and Clinical Perspective. April 2017.
- [53] Karakas M., C. Schulte, S. Appelbaum et al., “Circulating microRNAs strongly predict cardiovascular death in patients with coronary artery disease—results from the large Athero-Gene study,” *European Heart Journal*, 2016.
- [54] Yvan Devaux et al. Use of Circulating MicroRNAs to Diagnose Acute Myocardial Infarction. *Clinical Chemistry*. January 2012.
- [55] Li Xiao et al. Effects of miR-29a and miR-101a Expression on Myocardial Interstitial Collagen Generation After Aerobic Exercise in Myocardial-infarcted Rats. ARCMED-D-16-00289. January 2017.
- [56] Chuanwei Li et al. Circulating microRNAs as novel and sensitive biomarkers of acute myocardial Infarction. *Clin Biochem*. 2012 July; 45(0): 727–732.
- [57] <https://www.ensembl.org/index.html> Προσπελάστηκε 11/01/2019.
- [58] Port JD, Walker LA, Polk J, Nunley K, Buttrick PM, Sucharov CC. Temporal expression of miRNAs and mRNAs in a mouse model of myocardial infarction. *Physiol Genomics*. 2011; 43:1087–1095.
- [59] Van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2008; 105:13027–13032.
- [60] Ye Y, Hu Z, Lin Y, Zhang C, Perez-Polo JR, et al. Downregulation of microRNA-29 by antisense inhibitors and a PPAR-gamma agonist protects against myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2010; 87:535–544.
- [61] Anna Slusarz and Lakshmi Pulakat, The two faces of miR-29. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2015 July ;16(7): 480–490.
- [62] Ying Lin et al., MiRNA and TF co-regulatory network analysis for the pathology and recurrence of myocardial infarction. *Scientific Reports* 13 April 2015.
- [63] Thygesen K, Albert J, Jaffe A, Simoons L, Chaitman B, White H. (202) Third universal definition of myocardial infarction. *European Heart Journal* 33, 2551-2567.
- [64] Sambrook, J. and D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.
- [65] Kubista, M., et al., The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 2006. 27(2): p. 95-125.

- [66] Brunstein, J., Interpretation of qPCR curve shapes. MEDICAL LABORATORY OBSERVER, 2015.
- [67] Aneja, A., et al., Triple-FRET Technique for Energy Transfer Between Conjugated Polymer and TAMRA Dye with Possible Applications in Medical Diagnostics. *Journal of Biological Physics*, 2008. 34(5): p. 487-493.
- [68] Dorak, M.T., Real-Time PCR. Taylor & Francis 2007.
- [69] Arya, M., et al., Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2005. 5(2): p. 209-219.
- [70] Ioanna S. Sourvinou, Athina Markou, Evi S. Lianidou. Quantification of Circulating miRNAs in Plasma. Volume 15, Issue 6, Pagew 827-834. November 2013.
- [71] Ameya Deo et al., HOW TO CHOOSE A NORMALIZATION STRATEGY FOR MIRNA QUANTITATIVE REAL-TIME (QPCR) ARRAYS. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology* Vol. 9, No. 6 pg 795–812, 2011.
- [72] Yang X-P, Reckelhoff JF. Estrogen, hormonal replacement therapy and cardiovascular disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2011; 20:133.
- [73] Andrikopoulos, G., A. Pipilis, et al. (2007). "Epidemiological characteristics, management and early outcome of acute myocardial infarction in Greece: the HELlenic Infarction Observation Study." *Hellenic J Cardiol* 48(6): 325-334.
- [74] Krishnamurthy P, Rajasingh J, Lambers E, Qin G, Losordo DW, Kishore R. IL-10 inhibits inflammation and attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction via activation of STAT3 and suppression of HuR. *Circ Res.*;104(2):e9–18. pmid:19096025 2009.
- [75] Melo SF, et al. Expression of MicroRNA-29 and Collagen in Cardiac Muscle after Swimming Training in Myocardial-Infarcted Rats, *Cell Physiol Biochem*. 2014;33(3):657-69.
- [76] Gordon JW, Shaw JA, Kirshenbaum LA. Multiple facets of NF-kappaB in the heart: to be or not to NF-kappaB. *Circ Res.*;108(9):1122–32. pmid:21527742, 2011.
- [77] Sengupta S, den Boon JA, Chen IH, Newton MA, Stanhope SA, Cheng YJ, et al. MicroRNA 29c is down-regulated in nasopharyngeal carcinomas, up-regulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(15):5874–8. pmid:18390668.
- [78] Du B, Ma LM, Huang MB, Zhou H, Huang HL, Shao P, et al. High glucose down-regulates miR-29a to increase collagen IV production in HK-2 cells. *FEBS 2010 Lett.*;584(4):811–6. pmid:20067797.