



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών



Αστραδενή  
Ευθυμιάδου

Επιβλέπουσα  
καθηγήτρια:  
Κλεονίκη  
Λάμνησου

**Διερεύνηση πιθανής συσχέτισης του  
πολυμορφισμού miR-146a rs2910164 G>C με τη  
Στεφανιαία Νόσο στον ελληνικό πληθυσμό**

Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας

Αθήνα 2015

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

## **ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

# **Διερεύνηση πιθανής συσχέτισης του πολυμορφισμού miR-146a rs2910164 G>C με τη Στεφανιαία Νόσο στον ελληνικό πληθυσμό**

Αστραδενή Ευθυμιάδου Α.Μ. 1113201100034

Υπεύθυνη καθηγήτρια

Κλεονίκη Λάμνησου

Αθήνα 2015

# Περιεχόμενα

Πρόλογος .....	4
Περίληψη .....	5
Θεωρητικό Μέρος.....	6
Κεφάλαιο 1 <sup>ο</sup> : Στεφανιαία νόσος.....	7
Ανατομία καρδιάς .....	7
Η φυσιολογική στεφανιαία κυκλοφορία .....	10
Στεφανιαία νόσος.....	17
Κεφάλαιο 2 <sup>ο</sup> : Γενετικοί πολυμορφισμοί .....	29
Γενετική πληθυσμών .....	31
Κεφάλαιο 3 <sup>ο</sup> : MicroRNA.....	34
Ιστορική αναδρομή των miRNAs.....	34
Ονοματολογία .....	35
Οργάνωση των miRNA στο γονιδίωμα.....	36
Ο μηχανισμός βιογένεσης των microRNA.....	37
Τρόπος λειτουργίας των microRNAs .....	43
Φυσιολογικός ρόλος των microRNA .....	46
Πολυμορφισμοί των miRNAs .....	48
MicroRNA-146 .....	57
Πειραματικό Μέρος.....	71
Κεφάλαιο 3 <sup>ο</sup> : Πειραματική διαδικασία .....	72
Σκοπός της διπλωματικής εργασίας.....	72
Συνοπτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε: .....	72
Πειραματικά στάδια .....	73
Απομόνωση DNA από λευκοκύτταρα ολικού περιφερικού αίματος.....	74
Μέθοδος Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης .....	76
Ηλεκτροφόρηση .....	84
πολυμορφισμός μήκους περιοριστικού θραύσματος (RFLP) .....	89
4 <sup>ο</sup> κεφάλαιο: Αποτελέσματα.....	94
Αποτελέσματα στατιστικής επεξεργασίας σχετικά με την ισορροπία Hardy-Weinberg .....	96
Στατιστική επεξεργασία με σκοπό την εύρεση ή όχι συσχέτισης.....	102

5 <sup>ο</sup> Κεφάλαιο .....	104
Συζήτηση αποτελεσμάτων .....	104
Παράθεμα .....	106
Πίνακας γονιδίων στόχων του hsa-miR-146a.....	106
Πίνακας - Ιστορικό ασθενών .....	113
Βιβλιογραφία .....	119

# Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο της κ. Λάμνησου, στον τομέα Γενετικής και Βιοτεχνολογίας του τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά το ακαδημαϊκό έτος 2014-2015.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Κλεονίκη Λάμνησου για την ευκαιρία που μου έδωσε να κάνω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριό της, για τη βοήθειά της, αλλά και για την εμπειρία και τις γνώσεις που απέκτησα κατά τη διάρκεια της συνεργασίας μου μαζί της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Κωνσταντίνο Αγιαννιτόπουλο για την καθοδήγηση και τις συμβουλές του. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλες τις κοπέλες που ασκήθηκαν το έτος 2013-2014 για τη βοήθειά τους στο διαδικαστικό κομμάτι της παρούσας εργασίας, αλλά πιο ειδικά την Παναγιώτα Παυλοπούλου αφού μέρος από τα δείγματα των ασθενών που χρησιμοποιήθηκαν στη στατιστική επεξεργασία είναι από τη διπλωματική της εργασία.

# Περίληψη

## Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση της συσχέτισης του πολυμορφισμού rs2910164 G>C του miR-146a με την εμφάνιση Στεφανιαίας νόσου στον ελληνικό πληθυσμό.

## Μέθοδος

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης διπλωματικής μελετήθηκαν 96 άτομα με Στεφανιαία Νόσο και 126 υγιή άτομα. Σε αυτά προστέθηκαν και άλλα 53 άτομα με Στεφανιαία Νόσο που είχαν μελετηθεί στα πλαίσια άλλης διπλωματικής στο εργαστήριο της κ. Λάμνησου. Ο προσδιορισμός του γονοτύπου όλων των δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο PCR-RFLP.

## Αποτελέσματα

Το αποτέλεσμα της συγκεκριμένης έρευνας είναι ότι δεν υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό rs2910164 G>C του miR-146a και την εμφάνιση Στεφανιαίας νόσου στον ελληνικό πληθυσμό.

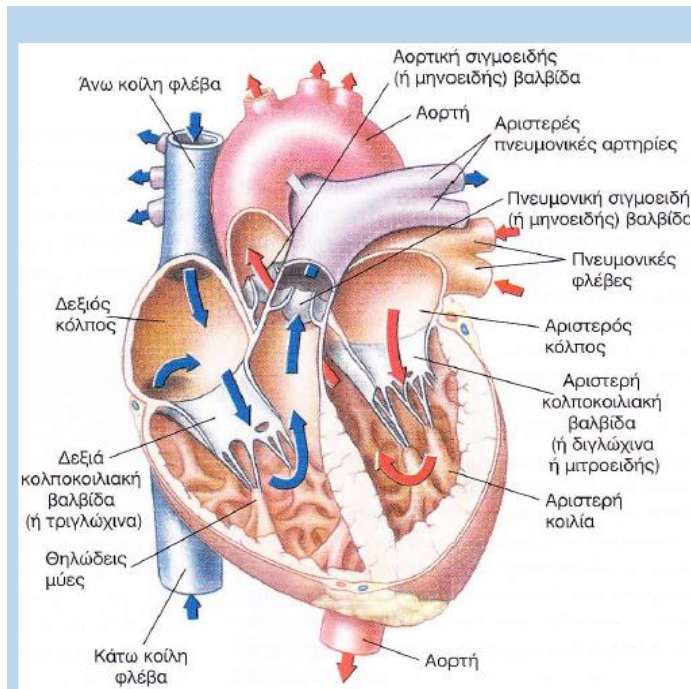
# Θεωρητικό Μέρος

## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup> : Στεφανιαία νόσος

### Ανατομία καρδιάς

Η καρδιά είναι ένα μυώδες όργανο που είναι τοποθετημένο στο θώρακα και περιβάλλεται από έναν ανθεκτικό ινώδη σάκο, το περικάρδιο. (Hickman, 2011). Ο στενός χώρος μεταξύ περικαρδίου και καρδιάς είναι γεμάτος με ένα υδατώδες υγρό το οποίο παίζει το ρόλο λιπαντικού καθώς η καρδιά μετατοπίζεται μέσα στο σάκο.

Τα τοιχώματα της καρδιάς αποτελούνται κύρια από κύτταρα καρδιακού μυός και ονομάζεται μυοκάρδιο. Η εσωτερική επιφάνεια των τοιχωμάτων, δηλαδή η επιφάνεια που βρίσκεται σε επαφή με το αίμα μέσα στους καρδιακούς θαλάμους επικαλύπτεται από ένα λεπτό στρώμα κυττάρων, γνωστών ως ενδοθηλιακών κυττάρων ή ενδοθηλίου (αυτά επικαλύπτουν όχι μόνο τους καρδιακούς θαλάμους,



Η καρδιά. Το φτωχό σε οξυγόνο αίμα εισέρχεται στη δεξιά πλευρά της καρδιάς και ωθείται προς τους πνεύμονες. Το οξυγονωμένο αίμα επιστρέφει από τους πνεύμονες, εισέρχεται στην αριστερή κοιλία της καρδιάς και ωθείται προς το σώμα. Το τοίχωμα της δεξιάς κοιλίας είναι λεπτότερο από ότι της αριστερής, διότι χρειάζεται μικρότερη μυϊκή δύναμη για να ωθεί το αίμα προς του γειτονικούς πνεύμονες. (Hickman, 2011)

αλλά και ολόκληρο το αγγειακό σύστημα). (Vander, 2011)

Το αίμα που επιστρέφει από τους πνεύμονες ρέει μέσω των πνευμονικών φλεβών και συλλέγεται στον αριστερό κόλπο, περνά στην αριστερή κοιλία και ωθείται προς τη σωματική κυκλοφορία μέσω της αορτής. Το αίμα επιστρέφει από τη σωματική κυκλοφορία μέσω της κάτω και άνω κοίλης φλέβας στο δεξιό κόλπο και περνά στη δεξιά κοιλία η οποία το ωθεί

στους πνεύμονες με τις πνευμονικές αρτηρίες. Η παλινδρόμηση του αίματος

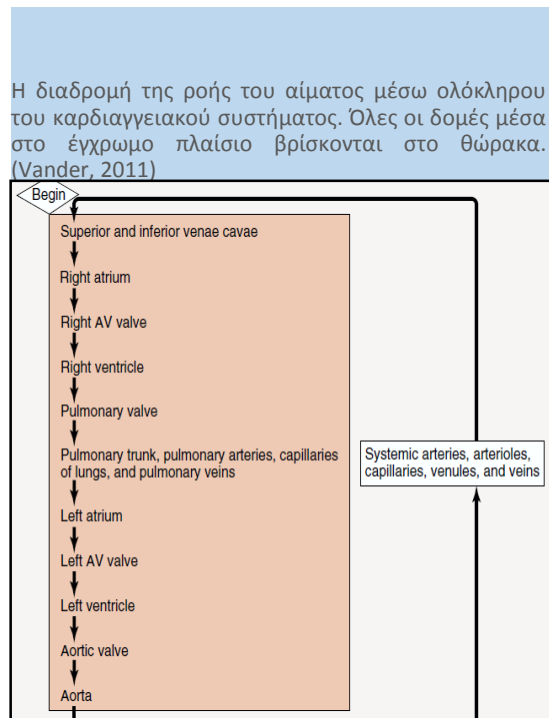


αποφεύγεται από δύο σύνολα βαλβίδων τα οποία σχηματίζονται ως προεκτάσεις του εσωτερικού τοιχώματος της καρδιάς, και ανοίγουν και κλείνουν παθητικά ανταποκρινόμενα στις διάφορες πιέσεις μεταξύ των θαλάμων της καρδιάς. Η μιτροειδής βαλβίδα (μεταξύ αριστερού κόλπου και κοιλίας) και η τριγλώχινα βαλβίδα (μεταξύ δεξιού κόλπου και κοιλίας) διαχωρίζουν τις κοιλότητες του κόλπου και της κοιλίας σε κάθε μισό της καρδιάς. Στα σημεία, όπου οι μεγαλύτερες αρτηρίες, δηλαδή η πνευμονική από τη δεξιά και η αορτή από την αριστερή κοιλία, εγκαταλείπουν την καρδιά, μηννοειδείς βαλβίδες αποτρέπουν την επιστροφή του αίματος στις κοιλίες.

Η σύσπαση ονομάζεται συστολή, ενώ η χαλάρωση διαστολή. Όταν συστέλλονται οι κόλποι (κολπική συστολή), οι κοιλίες διαστέλλονται (κοιλιακή διαστολή) και γεμίζουν με αίμα, ενώ η κοιλιακή συστολή συνοδεύεται από κολπική διαστολή. Ο ρυθμός του καρδιακού παλμού εξαρτάται από την ηλικία, το φύλο και κυρίως από την άσκηση. (Hickman, 2011)

Ένα αξιοσημείωτο γεγονός, που σχετίζεται με τη λειτουργία των βαλβίδων, είναι ότι αυτές προβάλλουν πολύ μικρή αντίσταση στη ροή αίματος. Συνεπώς, μια πολύ μικρή διαφορά πίεσης δια μέσου της βαλβίδας είναι αρκετή να παράγει μεγάλη ροή αίματος.

Δεν υπάρχουν βαλβίδες στα σημεία εισόδου της άνω και κάτω κοίλης φλέβας μέσα στο δεξιό κόλπο, και των πνευμονικών φλεβών μέσα στον αριστερό κόλπο. Όμως, η συστολή των κόλπων ωθεί λίγο αίμα πίσω στις φλέβες, γιατί η συστολή των κόλπων συμπιέζει τις φλέβες στο σημείο εισόδου τους στους κόλπους, αυξάνοντας την αντίσταση στη ροή προς τα πίσω.



Στο σχήμα δεξιά συνοψίζεται η διαδρομή της ροής του αίματος μέσω ολόκληρου του καρδιαγγειακού συστήματος.

### *Καρδιακός μυς*

Τα κύτταρα του μυοκαρδίου είναι διατεταγμένα σε στιβάδες οι οποίες είναι σφιχτά δεμένες μεταξύ τους και περικυκλώνουν τελείως τους γεμάτους με αίμα θαλάμους. Όταν τα τοιχώματα ενός θαλάμου συστέλλονται, ενώνονται σαν μια σφιγμένη γροθιά και ασκούν πίεση στο αίμα που εγκλείουν.

Ο καρδιακός μυς συνδυάζει ιδιότητες και λείου και σκελετικού μυός. Τα κύτταρα φέρουν γραμμώσεις λόγω της διάταξης των παχιών νηματίων της μυοσίνης και των λεπτών νηματίων της ακτίνης, όπως και στο σκελετικό μυ. Τα καρδιακά κύτταρα όμως είναι αρκετά κοντύτερα από τις ίνες του σκελετικού μυός και διακλαδίζονται με διάφορους τρόπους. Γειτονικά κύτταρα ενώνονται στα άκρα τους συγκροτώντας τους εμβόλιμους δίσκους ή κλιμακωτές ταινίες μέσα στους οποίους υπάρχουν δεσμοσώματα που συγκρατούν τα κύτταρα μαζί και προσδέονται τα μυοϊνίδια. Δίπλα στους εμβόλιμους δίσκους βρίσκονται χασματικές συνδέσεις όμοιες με εκείνες που παρατηρούνται σε πολλούς λείους μυς.

Περίπου 1% των μυοκαρδιακών ινών έχουν εξειδικευμένα χαρακτηριστικά που είναι βασικά για τη φυσιολογική διέγερση της καρδιάς. Αποτελούν ένα δίκτυο γνωστό ως το σύστημα αγωγής καρδιακής διέγερσης το οποίο επικοινωνεί με άλλες μυοκαρδιακές ίνες μέσω χασματικών συνδέσεων. Το σύστημα αγωγής ξεκινά τον καρδιακό παλμό και βοηθά τη γρήγορη διάδοση του ερεθίσματος σε ολόκληρη την καρδιά.

Παροχή αίματος. Το αίμα που αντλείται μέσω των καρδιακών θαλάμων δεν ανταλλάσσει θρεπτικά συστατικά και μεταβολικά παραπροϊόντα με κύτταρα του μυοκαρδίου. Αυτά, όπως και τα κύτταρα όλων των άλλων οργάνων, τροφοδοτούνται με αίμα μέσω αρτηριών που διακλαδίζονται από την αορτή. Οι αρτηρίες που τροφοδοτούν το μυοκάρδιο είναι οι στεφανιαίες αρτηρίες και το αίμα που ρέει μέσα σε αυτές λέγεται στεφανιαία αιματική ροή. Οι στεφανιαίες αρτηρίες εξέρχονται από τη ρίζα της αορτής και εισέρχονται σε ένα διακλαδισμένο δίκτυο

μικρών αρτηριών, αρτηριδίων, τριχοειδών, φλεβιδίων και φλεβών, όμοιο με εκείνο που παρατηρείται σε άλλα όργανα. Οι περισσότερες από τις στεφανιαίες φλέβες διοχετεύουν το περιεχόμενό τους σε μια μεγάλη φλέβα, το στεφανιαίο κόλπο, ο οποίος εκβάλλει στο δεξιό κόλπο της καρδιάς. (Vander, 2011)

## Η φυσιολογική στεφανιαία κυκλοφορία

Πιο πάνω αναφέρθηκαν κάποια πολύ γενικά πράγματα για τις στεφανιαίες αρτηρίες στα πλαίσια της γενικότερης ανατομίας της καρδιάς, τώρα θα αναφερθούμε πιο αναλυτικά στην στεφανιαία κυκλοφορία.

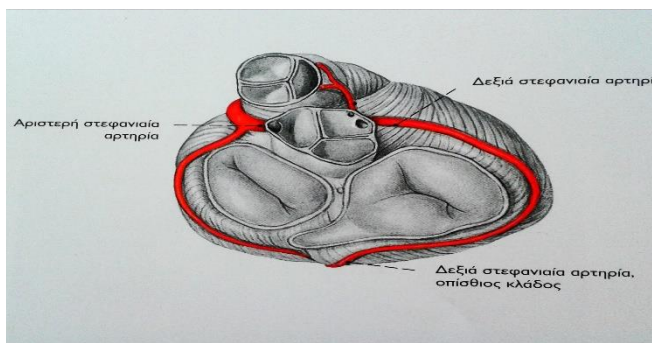
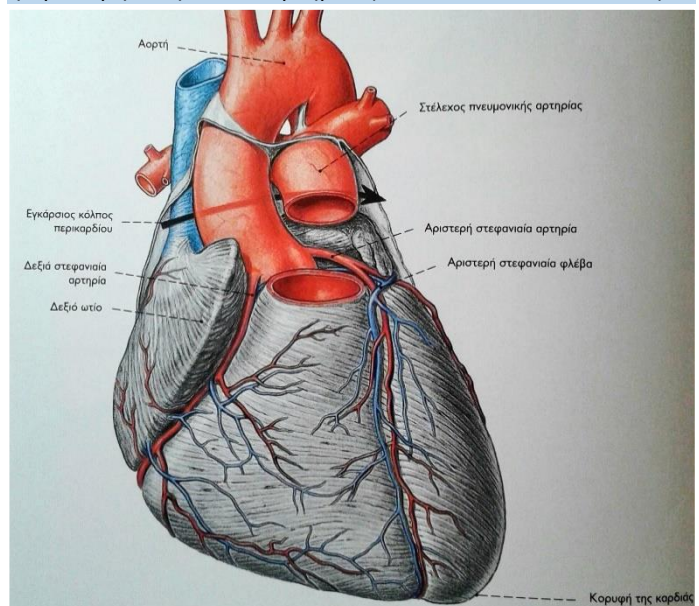
Η Στεφανιαία κυκλοφορία είναι η κυκλοφορία του αίματος στα αιμοφόρα αγγεία του καρδιακού μυός (μυοκαρδίου). Τα αγγεία που προσφέρουν πλούσιο σε οξυγόνο αίμα στο μυοκάρδιο είναι

γνωστά ως στεφανιαίες αρτηρίες. Τα αγγεία που απομακρύνουν το αποξυγονωμένο αίμα από το μυοκάρδιο είναι γνωστά ως καρδιακές φλέβες. Αυτές περιλαμβάνουν

τη μεγάλη καρδιακή φλέβα, τη μέση καρδιακή φλέβα, τη μικρή καρδιακή φλέβα και τις πρόσθιες καρδιακές φλέβες.

Καθώς η αριστερή και η δεξιά στεφανιαία αρτηρία βρίσκονται στην επιφάνεια της

Η καρδιά με τις στεφανιαίες αρτηρίες, πρόθια όψη. Έχει αφαιρεθεί μέρος του στελέχους της πνευμονικής αρτηρίας, προκειμένου να φανεί καλύτερα η διαδρομή που ακολουθεί η αριστερή στεφανιαία αρτηρία. (ΑΤΛΑΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ. 2009)



Οι στεφανιαίες αρτηρίες, όπως φαίνονται από πάνω, με τομή του άνω τμήματος της καρδιάς μέχρι το επίπεδο των βαλβίδων (βαλβιδικό επίπεδο), ώστε να φαίνεται καλύτερα η διαδρομή που ακολουθούν (ΑΤΛΑΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ. 2009)

καρδιάς, ονομάζονται επικαρδιακές στεφανιαίες αρτηρίες. Αυτές οι αρτηρίες, όταν είναι υγιείς, είναι ικανές να κάνουν αυτορρύθμιση ώστε να διατηρούν τη στεφανιαία αιματική ροή σε επίπεδα κατάλληλα για τις ανάγκες των μυών της καρδιάς. Αυτά τα σχετικά στενά αγγεία συχνά προσβάλλονται από αθηροσκλήρωση και μπορούν να μπλοκαριστούν, προκαλώντας στηθάγχη ή καρδιακή προσβολή. Οι στεφανιαίες αρτηρίες που είναι βαθιά μέσα στο μυοκάρδιο αναφέρεται ως υπενδοκαρδιακές.

### *Δομή*

Στεφανιαίες αρτηρίες παρέχουν αίμα στο μυοκάρδιο και τα άλλα συστατικά της καρδιάς. Δύο στεφανιαίες αρτηρίες ξεκινούν από την αριστερή πλευρά της καρδιάς κατά την έναρξη (ρίζα) της αορτής, ακριβώς στο σημείο που η αορτή εξέρχεται από την αριστερή κοιλία. Υπάρχουν τρεις διαστολές στο τοίχωμα της αορτής ακριβώς πάνω από την αορτική μηνοειδή βαλβίδα. Δύο από αυτές, ο αριστερός οπίσθιος αορτικός κόλπος και πρόσθιος αορτικός κόλπος, δημιουργούν την αριστερή και τη δεξιά στεφανιαία αρτηρίες, αντίστοιχα. Ο τρίτος κόλπος, ο δεξιός οπίσθιος αορτικός κόλπος, συνήθως δεν οδηγεί σε ένα αγγείο. Οι κλάδοι των στεφανιαίων αρτηριών που παραμένουν στην επιφάνεια της αρτηρίας και ακολουθούν τις αύλακες της καρδιάς ονομάζονται επικαρδιακές στεφανιαίες αρτηρίες.

Η αριστερή στεφανιαία αρτηρία διανέμει αίμα προς την αριστερή πλευρά της καρδιάς, τον αριστερό κόλπο και την κοιλία, και στο μεσοκοιλιακό διάφραγμα. Η περισπωμένη αρτηρία προκύπτει από την αριστερή στεφανιαία αρτηρία και ακολουθεί η στεφανιαία αύλακα προς τα αριστερά. Τελικά, συντήκεται με τις μικρές διακλαδώσεις της δεξιάς στεφανιαίας αρτηρίας. Η μεγαλύτερη πρόσθια μεσοκοιλιακή αρτηρία, γνωστή και ως η αριστερή πρόσθια κατιούσα αρτηρία (LAD), είναι η δεύτερη σημαντική διακλάδωση που προκύπτει από την αριστερή στεφανιαία αρτηρία. Ακολουθεί την πρόσθια μεσοκοιλιακή αύλακα γύρω από το πνευμονικό στέλεχος.

Στην πορεία δημιουργεί πολλά μικρότερα παρακλάδια που διασυνδέονται με τα παρακλάδια της οπίσθιας μεσοκοιλιακής αρτηρίας, σχηματίζοντας αναστομώσεις. Μια αναστόμωση είναι μια περιοχή όπου τα αγγεία ενωθούν για να σχηματίσουν διασυνδέσεις που κανονικά επιτρέπουν στο αίμα να κυκλοφορεί σε μια περιοχή, ακόμη και αν υπάρχει μερική απόφραξη σε άλλο κλάδο. Οι αναστομώσεις στην καρδιά είναι πολύ μικρές. Ως εκ τούτου, η ικανότητα αυτή είναι κάπως περιορισμένη στην καρδιά έτσι μια απόφραξη της στεφανιαίας αρτηρίας συχνά οδηγεί σε έμφραγμα του μυοκαρδίου που προκαλεί το θάνατο των κυττάρων που τροφοδοτούνται από το συγκεκριμένο αγγείο.

Η δεξιά στεφανιαία αρτηρία προχωρά κατά μήκος της στεφανιαίας αύλακας και διανέμει αίμα στον δεξιό κόλπο, σε τμήματα και των δύο κοιλιών, και στο σύστημα αγωγής της καρδιάς. Κανονικά, μία ή περισσότερες επιχείλιες αρτηρίες προκύπτουν από τη δεξιά στεφανιαία αρτηρία πιο κάτω από το δεξιό κόλπο. Οι επιχείλιες αρτηρίες τροφοδοτούν με αίμα τα επιφανειακά τμήματα της δεξιάς κοιλίας. Στην οπίσθια επιφάνεια της καρδιάς, η δεξιά στεφανιαία αρτηρία δημιουργεί την οπίσθια μεσοκοιλιακή αρτηρία, γνωστή και ως οπίσθια κατιούσα αρτηρία. Αυτή εκτείνεται κατά μήκος του οπίσθιου τμήματος της μεσοκοιλιακής αύλακας προς την κορυφή της καρδιάς, προκαλώντας διακλαδώσεις που τροφοδοτούν το μεσοκοιλιακό διάφραγμα και τμήματα και των δύο κοιλιών. (Betts, 2014)

### Αναστομώσεις

Υπάρχουν μερικές αναστομώσεις μεταξύ των διακλαδώσεων των δύο στεφανιαίων αρτηριών. Ωστόσο, οι στεφανιαίες αρτηρίες είναι λειτουργικά τελικές αρτηρίες και έτσι αυτές οι αναστομώσεις αναφέρονται ως ανατομικές αναστομώσεις, αφού στερούνται λειτουργίας, σε αντίθεση με τις λειτουργικές ή φυσιολογικές αναστομώσεις, όπως αυτές στην παλάμη του χεριού. Αυτό είναι επειδή η απόφραξη μιας στεφανιαίας αρτηρίας γενικά καταλήγει σε θάνατο του καρδιακού ιστού λόγω της έλλειψης επαρκούς παροχής αίματος από την άλλη διακλάδωση. Όταν δύο αρτηρίες ή οι διακλαδώσεις τους συναντώνται, η περιοχή του μυοκαρδίου λαμβάνει διπλή παροχή αίματος. Αυτοί οι κόμβοι ονομάζονται

αναστομώσεις. Εάν μια στεφανιαία αρτηρία παρεμποδίζεται από ένα αθήρωμα, η δεύτερη αρτηρία είναι ακόμη σε θέση να παρέχει οξυγονωμένο αίμα στο μυοκάρδιο. Ωστόσο, αυτό μπορεί να συμβεί μόνο εάν το αθήρωμα εξελίσσεται αργά, δίνοντας την ευκαιρία στις αναστομώσεις να πολλαπλασιαστούν.

Σύμφωνα με την πιο κοινή διαμόρφωση των στεφανιαίων αρτηριών, υπάρχουν τρεις περιοχές αναστομώσεων:

- Μικρές διακλαδώσεις της LAD (αριστερής πρόσθιας κατιούσας αρτηρίας μεσοκοιλιακής) διακλάδωσης της αριστερής στεφανιαίας ενώνονται με διακλαδώσεων της οπίσθιας δεξιάς μεσοκοιλιακής διακλάδωσης της δεξιάς στεφανιαίας της μεσοκοιλιακής αύλακας.
- Πιο πάνω, υπάρχει μια αναστόμωση μεταξύ της περισπωμένης αρτηρίας (μιας διακλάδωσης της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας) και της δεξιάς στεφανιαίας αρτηρίας της κολποκοιλιακή αύλακας.
- Υπάρχει επίσης μια αναστόμωση μεταξύ των διαφραγματικών διακλαδώσεων των δύο στεφανιαίων αρτηριών στο μεσοκοιλιακό διάφραγμα.

Υπάρχουν όμως και ποικιλομορφίες  
([en.wikipedia.org/wiki/Coronary\\_circulation](http://en.wikipedia.org/wiki/Coronary_circulation), n.d.)

### *Λειτουργία*

Η στεφανιαία αιματική ροή στον άνθρωπο σε κατάσταση ηρεμίας είναι 225ml/min, που αναλογεί στο 4-5% της συνολικής καρδιακής ροής (ΚΛΟΑ).

Κατά τη διάρκεια έντονης σωματικής άσκησης η καρδιά αυξάνει την παροχή της 4-6 φορές και προωθεί αυτό το αίμα έναντι μίας αρτηριακής πίεσης υψηλότερης από τη φυσιολογική. Κατά συνέπεια, η παραγωγή έργου από μέρος της καρδιάς, κάτω από βαριές συνθήκες μπορεί να αυξηθεί 6-8 φορές. Η στεφανιαία αιματική ροή αυξάνει σε τέτοιες περιπτώσεις 4-5 φορές, ώστε να εξασφαλίσει τις επιπλέον θρεπτικές ουσίες που είναι απαραίτητες για την καρδιά. Είναι φανερό πως η αύξηση αυτή δεν είναι απόλυτα ανάλογη με την αύξηση του έργου, πράγμα που σημαίνει πως η σχέση της στεφανιαίας αιματικής ροής προς την

κατανάλωση ενέργειας από μέρους της καρδιάς ελαττώνεται. Αυτή σχετική έλλειψη παροχής αίματος αντισταθμίζεται με αύξηση της αποτελεσματικότητας της χρησιμοποίησης της ενέργειας από μέρους της καρδιάς. (GUYTON, 1984)

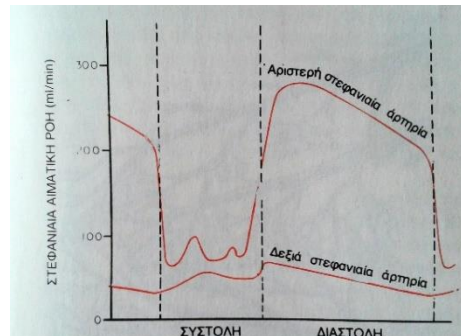
### Παροχή στους θηλοειδείς μύες

Οι θηλοειδείς μύες επισυνάπτουν τη μιτροειδή βαλβίδα (η βαλβίδα μεταξύ του αριστερού κόλπου και της αριστερής κοιλίας), και την τριγλώχινα βαλβίδα (η βαλβίδα μεταξύ του δεξιού κόλπου και της δεξιάς κοιλίας) προς το τοίχωμα της καρδιάς. Εάν οι θηλοειδείς μύες δεν λειτουργούν σωστά, η μιτροειδής βαλβίδα μπορεί να παρουσιάσει διαρροή κατά τη συστολή της αριστερής κοιλίας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα λίγο αίμα να κάνει αντίστροφη πορεία, από την αριστερή κοιλία προς τον αριστερό κόλπο, αντί να πάει προς την αορτή και το υπόλοιπο σώμα. Αυτή η διαρροή αίματος προς τον αριστερό κόλπο είναι γνωστή ως ανεπάρκεια της μιτροειδούς. Ομοίως, μπορεί να συμβεί διαρροή του αίματος από τη δεξιά κοιλία διαμέσου της τριγλώχινας βαλβίδας στο δεξιό κόλπο. Το τελευταίο ονομάζεται ανεπάρκεια της τριγλώχινας ή παλινδρόμησης της τριγλώχινας.

Ο προσθιοπλάγιος θηλοειδής μύς έχει συνήθως δύο παροχές αίματος: Από την αριστερή κατιούσα αρτηρία (LAD) και την αριστερή περισπωμένη αρτηρία (LCX). Συνεπώς, είναι συνήθως ανθεκτικός στη στεφανιαία ισχαιμία (ανεπάρκεια σε πλούσιου σε οξυγόνο του αίματος). Από την άλλη πλευρά, ο μεσοπίσθιος θηλοειδής μύς συνήθως τροφοδοτείται μόνο από την οπίσθια κατιούσα αρτηρία. Αυτό καθιστά το μεσοπίσθιοθηλοειδή μυ σημαντικά πιο επιρρεπή σε ισχαιμία. Η κλινική σημασία αυτού είναι ότι το έμφραγμα του μυοκαρδίου που αφορά την οπίσθια κατιούσα αρτηρία είναι πιο πιθανό να προκαλέσει ανεπάρκεια της μιτροειδούς. (VociP, 1995)

## Μεταβολές της στεφανιαίας αιματικής ροής στη διάρκεια της συστολής του μυοκαρδίου

Η αιματική ροή στα στεφανιαία τριχοειδή της αριστερής κοιλίας ελαττώνεται κατά τη διάρκεια της συστολής, κάτι αντίθετο από αυτό που συμβαίνει σε όλη την υπόλοιπη κυκλοφορία. Ο λόγος της διαφοράς είναι η έντονη συμπίεση, κατά τη συστολή, των μικρών ενδομυϊκών αγγείων από το μυοκάρδιο της αριστερής κοιλίας. Κατά τη διαστολή το μυοκάρδιο χαλαρώνει



Φασική αιματική ροή στα στεφανιαία τριχοειδή της αριστερής και της δεξιάς κοιλίας (Α. GUYTON. 1984)

τελείως και δεν εμποδίζεται πια η αιματική ροή στα τριχοειδή της αριστερής κοιλίας με αποτέλεσμα τη γρήγορη κίνησή του καθ' όλη τη διάρκεια της συστολής.

Η αιματική ροή στα στεφανιαία τριχοειδή της δεξιάς κοιλίας παρουσιάζει, κατά τη διάρκεια του καρδιακού κύκλου, φυσιολογικές διακυμάνσεις παρόμοιες με εκείνες των τριχοειδών της αριστερής, επειδή όμως η ένταση της συστολής της δεξιάς κοιλίας είναι πολύ πιο μικρή από ότι της αριστερής, αυτές οι αντίστροφες φασικές μεταβολές είναι πολύ πιο μικρές σε σύγκριση με της αριστερής.

### Έλεγχος της στεφανιαίας αιματικής ροής

Οι απαιτήσεις σε οξυγόνο ως κύριος παράγοντας τοπικής ρύθμισης της αιματικής ροής: Η αιματική ροή στα στεφανιαία τριχοειδή ρυθμίζεται σχεδόν ακριβώς ανάλογα με τις ανάγκες του μυοκαρδίου σε οξυγόνο. Ακόμα και στη φυσιολογική κατάσταση ηρεμίας, 65-70% από το οξυγόνο του αρτηριακού αίματος αφαιρείται από αυτό καθώς περνά την καρδιά. Και επειδή το οξυγόνο που μένει δε είναι πολύ, ελάχιστο μπορεί ακόμα να αφαιρεθεί από το αίμα, εκτός και αν αυξηθεί



η ροή του. Η αιματική ροή αυξάνει πράγματι σχεδόν ανάλογα με τη μεταβολική κατανάλωση οξυγόνου από την καρδιά.

Ένα πιθανό αίτιο του γεγονότος ότι η αύξηση της κατανάλωσης οξυγόνου προκαλεί διαστολή των στεφανιαίων είναι ότι όταν η συγκέντρωση του οξυγόνου στα μυϊκά κύτταρα είναι πολύ χαμηλή, ένα μέρος του αδενοσινοτριφωσφορικού οξέος τους διασπάται σε αδενοσίνη, που αποτελεί πολύ ισχυρό αγγειοδιασταλτικό παράγοντα. Ένα άλλο πιθανό αίτιο μπορεί να είναι το γεγονός ότι η ίδια η έλλειψη οξυγόνου θα ήταν δυνατό να προκαλέσει εύκολα τοπική αγγειοδιαστολή εξαιτίας της έλλειψης της ενέργειας (που προέρχεται από το οξυγόνο), που απαιτείται για να διατηρηθεί η συστολή των στεφανιαίων αρτηριών απέναντι στην υψηλή αρτηριακή πίεση.

#### Νευρική ρύθμιση της στεφανιαίας αιματικής ροής

Δύο είναι οι τρόποι με τους οποίους η διέγερση των αυτόνομων νευρώνων της καρδιάς μπορεί να επηρεάσει τη στεφανιαία αιματική ροή:

1. Με άμεσες επιδράσεις που οφείλονται στην κατευθείαν δράση των νευροδιαβιβαστών ακετυλοχολίνη και νοραδρεναλίνη πάνω στα ίδια τα στεφανιαία αγγεία. Συνήθως η ακετυλοχολίνη προκαλεί μικρή διαστολή και η νοραδρεναλίνη μικρή σύσπαση.
2. Με έμμεσες επιδράσεις, που εδώ παίζουν το σπουδαιότερο ρόλο. Η διέγερση του συμπαθητικού αυξάνει τη συχνότητα και την ένταση συστολής της καρδιάς, καθώς και το ρυθμό του μεταβολισμού. Με τη σειρά της η αυξημένη δραστηριότητα της καρδιάς πυροδοτεί τοπικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς της αιματικής ροής, που συντελούν στη διαστολή των στεφανιαίων αγγείων και η αιματική ροή αυξάνει περίπου ανάλογα με τις ανάγκες του καρδιακού μυός για οξυγόνο.

Αντίθετα, η διέγερση του παρασυμπαθητικού επιβραδύνει τη συχνότητα και ασκεί μικρή κατασταλτική επίδραση στην ένταση συστολής της καρδιάς, που προκαλεί

ελάττωση της κατανάλωσης οξυγόνου και έτσι συστολή των στεφανιαίων.  
(GUYTON, 1984)

### Στεφανιαία νόσος

Η ασθένεια των στεφανιαίων αρτηριών (CAD), επίσης γνωστή και ως ισχαιμική καρδιοπάθεια (IHD) (Bhatia, Sujata K , 2010), αθηροσκληρωτική καρδιοπάθεια

(<https://www.southerncross.co.nz/AboutTheGroup/HealthResources/MedicalLibrary/tabid/178/vw/1/ItemID/191/>, n.d.), αθηροσκληρωτική καρδιαγγειακή νόσος (Faxon, 2004), και ως στεφανιαία νόσος (<https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/007115.htm>, n.d.), είναι μία ομάδα ασθενειών που περιλαμβάνει: σταθερή στηθάγχη, ασταθή στηθάγχη, έμφραγμα του μυοκαρδίου, και αιφνίδιο θάνατο στεφανιαίας (Wong, 2014). Ανήκει στην ομάδα των καρδιαγγειακών παθήσεων, από τις οποίες είναι ο πιο κοινός τύπος. (Global, 2015)

Σε αυτή τη νόσο λοιπόν, μεταβολές σε μια ή περισσότερες στεφανιαίες αρτηρίες προκαλούν ανεπαρκή παροχή αίματος από την καρδιά, δηλαδή ισχαιμία. Αποτέλεσμα του παραπάνω μπορεί να είναι η βλάβη του μυοκαρδίου στην πάσχουσα περιοχή, και όταν είναι αρκετά σοβαρή, ο θάνατος του συγκεκριμένου τμήματος της καρδιάς (έμφραγμα του μυοκαρδίου ή καρδιακή προσβολή). Πολλοί ασθενείς με στεφανιαία νόσο εμφανίζουν παροδικά επεισόδια ανεπαρκούς στεφανιαίας αιματικής ροής, συνήθως σε καταστάσεις συναισθηματικής έντασης, προτού πάθουν τελικά έμφραγμα του μυοκαρδίου.

Το κύριο αίτιο της νόσου είναι η παρουσία αθηροσκλήρωσης (ή αρτηριοσκληρυνσης) στα στεφανιαία αγγεία. Αυτή είναι μια πάθηση των αρτηριών που χαρακτηρίζεται από πάχυνση του τμήματος του αιμοφόρου αγγείου που βρίσκεται πιο κοντά στον αυλό (Vander, 2011), κάτω από τον έσω χιτώνα (GUYTON, 1984) με:

- μεγάλο αριθμό παθολογικών κυττάρων λείων μυϊκών ινών, μακροφάγων και λεμφοκυττάρων,
- εναπόθεση χοληστερόλης και άλλων λιπαρών ουσιών τόσο μέσα στα κύτταρα αυτά όσο και στον εξωκυττάριο χώρο,
- πυκνά στρώματα συνδετικού ιστού στη θεμέλια ουσία των κυττάρων.

Οι μηχανισμοί με τους οποίους η αθηροσκλήρωση μειώνει τη στεφανιαία αιματική ροή είναι οι παρακάτω:

1. τα πρόσθετα μυϊκά κύτταρα και διάφορες εναποθέσεις στο τοίχωμα προβάλλουν στον αυλό του αγγείου και αυξάνουν την αντίσταση στη ροή, και
2. τα παθολογικά ενδοθηλιακά κύτταρα της αθηροσκληρωτικής περιοχής απελευθερώνουν υπέρμετρα αγγειοσυσταλτικές ουσίες (π.χ. ενδοθηλίνη-1) και ανεπαρκώς αγγειοδιασταλτικές ουσίες (μονοξειδίο του αζώτου και προστακυκλίνη).

Οι διεργασίες που οδηγούν σε ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης είναι σύνθετες και όχι πλήρως κατανοητές. Είναι πιθανό ότι η έναρξη της βλάβης γίνεται με παράγοντες που προκαλούν βλάβη του ενδοθηλίου και των υποκείμενων λείων μυών, οδηγώντας σε μια φλεγμονώδη απόκριση, που αρχικά μπορεί να έχει προστατευτικό χαρακτήρα, αλλά στη συνέχεια γίνεται υπερβολική.

Αυτές οι διαδικασίες είναι προοδευτικές, οδηγώντας τελικά μερικές φορές σε πλήρη απόφραξη. Πλήρης απόφραξη προκαλείται ωστόσο με τη δημιουργία ενός θρόμβου αίματος (θρόμβωση των στεφανιαίων) στη στενωμένη αθηροσκληρωτική αρτηρία, γεγονός που οδηγεί στην εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου (Vander, 2011). Αυτό εξηγείται αναλυτικότερα παρακάτω.

### *Οξεία απόφραξη των στεφανιαίων*

Η οξεία απόφραξη της στεφανιαίας αρτηρίας πολλές φορές παρατηρείται σε άτομα που ήδη έχουν σοβαρή αθηροσκληρωτική στεφανιαία καρδιοπάθεια.



δημιουργηθούν και παράπλευρα αγγεία. Έτσι, το άτομο μπορεί να μην παρουσιάσει ποτέ επεισόδιο καρδιακής δυσλειτουργίας. Τελικά όμως η σκληρυντική διαδικασία προχωρά πέρα από τα όρια της αιμάτωσης που μπορεί να εξασφαλίσει η παράπλευρη κυκλοφορία, ενώ ακόμα και τα ίδια τα παράπλευρα αγγεία αναπτύσσουν αθηρωματικές πλάκες.

Αμέσως μετά την οξεία απόφραξη η αιματική ροή στα στεφανιαία αγγεία περιφερικά της απόφραξης σταματά και αυτό ονομάζεται έμφραγμα του μυοκαρδίου.

Λίγο μετά από την εγκατάσταση του εμφράγματος από τα παράπλευρα αγγεία ρέουν στην περιοχή μικρές ποσότητες αίματος και αυτό σε συνδυασμό με τη διαστολή των αιμοφόρων αγγείων τοπικά, προκαλεί υπερπλήρωση της περιοχής από αίμα που λιμνάζει. Ταυτόχρονα χρησιμοποιούνται και τα τελευταία ίχνη οξυγόνου του αίματος με αποτέλεσμα η αιμοσφαιρίνη να παίρνει μπλε χρώμα. Τα κύτταρα του μυοκαρδίου αρχίζουν να διογκώνονται λόγω της ελάττωσης του μεταβολισμού τους. Τελικά αν δεν ανοίξουν παράπλευρα αγγεία μεγάλο μέρος του μυός νεκρώνεται.

#### Αίτια θανάτου μετά από οξεία απόφραξη στεφανιαίων

Τα κυριότερα αίτια θανάτου μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου είναι:

1. Ελάττωση της καρδιακής παροχής (ΚΛΟΑ)– καρδιογενής καταπληξία

Κάποιες ίνες του μυοκαρδίου δε λειτουργούν καθόλου και κάποιες λειτουργούν ανεπαρκώς και έτσι η συνολική λειτουργική ικανότητα της κοιλίας που πάσχει, ως αντλίας, ελαττώνεται ανάλογα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η καρδιά να παρουσιάζει οξεία ανεπάρκεια (κάμψη) με συνέπεια βαριά βλάβη περιφερικών ιστών. Η κατάσταση αυτή ονομάζεται καρδιογενής καταπληξία.

## 2. Στάση του αίματος στο φλεβικό σύστημα

Αυτή δημιουργείται λόγω του ότι η καρδιά δε διακινεί το αίμα ως αντλία. Το γεγονός δεν προκαλεί μεγάλες δυσκολίες κατά τις πρώτες ώρες μετά το έμφραγμα. Αντίθετα, τα συμπτώματα παρουσιάζονται λίγες μέρες αργότερα. Αυτό επειδή η ελάττωση της καρδιακής παροχής οδηγεί σε ελάττωση της αιματικής ροής προς τους νεφρούς, οι οποίοι κατακρατούν μεγάλες ποσότητες υγρών. Τα υγρά αυτά προκαλούν προοδευτική επιβάρυνση της φλεβικής συμφόρησης. Έτσι, ασθενείς που πηγαίνουν φαινομενικά καλά, αρκετές μέρες μετά το έμφραγμα παρουσιάζουν ξαφνικά οξύ πνευμονικό οίδημα και καταλήγουν μέσα σε λίγες ώρες.

## 3. Ρήξη της περιοχής του εμφράγματος

Λίγες μέρες μετά από εκτεταμένο έμφραγμα οι νεκρωμένες μυϊκές ίνες αρχίζουν να εκφυλίζονται και το νεκρωμένο μυοκάρδιο μπορεί να γίνει πολύ λεπτό και να υποστεί ρήξη κοιλίας. Το αίμα εκχυλίζεται στον περικαρδιακό χώρο και γρήγορα αρχίζει να συμπιέζει εξωτερικά την καρδιά. Εξαιτίας αυτής της συμπίεσης δυσχεραίνεται η επαναφορά αίματος στο δεξιό κόλπο και ο ασθενής καταλήγει από απότομη ελάττωση ΚΛΟΑ.

## 4. Μαρμαρυγή των κοιλιών μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου (GUYTON, 1984)

Η κοιλιακή μαρμαρυγή είναι μία κατάσταση στην οποία υπάρχει ασυντόνιστη συστολή των κοιλιών του καρδιακού μυός (Zevitz, 2014). Σε αυτό οδηγούν τέσσερις παράγοντες:

- Λόγω της αναστολής της αιμάτωσης του μυοκαρδίου μειώνονται τα αποθέματα καλίου της ισχαιμικής μυϊκής μάζας και άρα επέρχεται αύξηση της ευερεθιστότητας του μυοκαρδίου.
- Η μυϊκή ισχαιμία δημιουργεί ρεύμα βλάβης και αυτό με τη σειρά του προκαλεί εκχύλιση παθολογικών ερεθισμάτων και τελικά μαρμαρυγή

- Μετά το εκτεταμένο έμφραγμα αναπτύσσονται ισχυρά συμπαθητικά αντανακλαστικά επειδή η καρδιά δεν προωθεί αρκετό όγκο αίματος προς το αρτηριακό δέντρο. Η διέγερση του συμπαθητικού αυξάνει όμως και τη διεγερσιμότητα του καρδιακού μυός και προδιαθέτει σε μαρμαρυγή
- Το έμφραγμα από μόνο του μπορεί να προκαλέσει υπερβολική διάταση της κοιλίας και άρα να οδηγήσει στην επιμήκυνση της οδού αγωγής του ερεθίσματος ή ακόμα και την ανάπτυξη παθολογικών οδών αγωγής γύρω από την περιοχή του εμφράγματος. Και τα δύο αυτά ωθούν σε κυκλικές κινήσεις του ερεθίσματος και άρα κοιλιακή μαρμαρυγή. (GUYTON, 1984)

#### *Παράγοντες κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου*

Η στεφανιαία νόσος, ανάμεσά σε πολλές άλλες ασθένειες, δεν ακολουθεί τη Μεντελική κληρονομικότητα ούτε σχετίζεται με χρωμοσωμικές ανωμαλίες, αλλά έχει πολυπαραγοντικό χαρακτήρα και δημιουργείται από την αλληλεπίδραση πολλών περιβαλλοντικών παραγόντων και γονιδίων. Τη γενετική προδιάθεση την καθορίζει ο συνδυασμός της γενετικής ποικιλομορφίας πολλών γενετικών τόπων που ο καθένας έχει μικρή επίδραση στο φαινότυπο.

Αποτελεί την κυριότερη αιτία θανάτου στη μέση και μεγαλύτερη ηλικία στις περισσότερες αναπτυγμένες χώρες (Καναβάκης, 2005). Στην Ελλάδα το 2003 η στεφανιαία νόσος ήταν η τρίτη αιτία θανάτου και ευθυνόταν για το 13,3% του συνόλου των θανάτων (πρώτη αιτία θανάτου ήταν τα αγγειακά-εγκεφαλικά επεισόδια με 17,5% του συνόλου των θανάτων) (Μπαμπάτσικου, 2010). Ο κίνδυνος εμφάνισης στεφανιαίας νόσου σε άνδρες 70 ετών είναι 35% και σε άνδρες 90 ετών ανεβαίνει στο 50%. Στις γυναίκες ο κίνδυνος είναι αρκετά μικρότερος με 24% και 32% αντιστοίχως. Είναι πολύ σημαντικό το γεγονός ότι το 14% των ασθενών έχει επιβαρυσμένο οικογενειακό ιστορικό (Καναβάκης, 2005).

## Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που συμβάλλουν στην αύξηση του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου είναι: το κάπνισμα, η έλλειψη σωματικής άσκησης, το στρες, η παχυσαρκία, η διαίτα (πλούσια σε κορεσμένα λίπη και χοληστερόλη, φτωχή σε αντιοξειδωτικούς παράγοντες κ.α.). Η πρόληψη αυτής της νόσου εστιάζεται στην εξάλειψη ή ελαχιστοποίηση των παραγόντων αυτών με αλλαγές στον τρόπο ζωής.

Όσο αφορά την άσκηση, είναι γνωστό ότι μια ξαφνική έντονη σωματική δραστηριότητα μπορεί να προκαλέσει καρδιακή προσβολή. Αυτός ο κίνδυνος όμως εξαλείφεται σε άτομα που ακολουθούν συστηματική σωματική άσκηση και ο συνολικός κίνδυνος εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου μπορεί να μειωθεί μέχρι και 55%. Αυτή η προστατευτική δράση οφείλεται σε ποικίλους λόγους:

1. μειωμένη καρδιακή συχνότητα και αρτηριακή πίεση στην ηρεμία δύο παράγοντες που αυξάνουν την ανάγκη του μυοκαρδίου σε οξυγόνο,
2. αύξηση της διαμέτρου των στεφανιαίων αρτηριών,
3. μειωμένη σοβαρότητα της υπέρτασης και του διαβήτη, δύο σημαντικών παραγόντων για την εμφάνιση αθηροσκλήρωσης,
4. μειωμένη ολική συγκέντρωση χοληστερόλης πλάσματος, με ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσης της καλής χοληστερόλης (HDL),
5. μειωμένη τάση του αίματος για εμφάνιση θρόμβωσης και βελτίωση της θρομβολυτικής ικανότητας του αίματος.

Ένας άλλος προστατευτικός παράγοντας κατά της εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου είναι η κατανάλωση βιταμίνης E, που λειτουργεί ως αντιοξειδωτικός παράγοντας και άρα δρα εμποδίζοντας την οξείδωση της κακής χοληστερόλης (LDL), καθώς αυτή η οξείδωση ευνοεί τη δημιουργία αθηρωματικών πλακών. Προστατευτική δράση ασκεί επίσης και η κατανάλωση φυλλικού οξέος (μιας βιταμίνης B). Αυτό συμβάλλει στη μείωση της συγκέντρωσης του αμινοξέος ομοκυστεΐνη στο αίμα, ενός από τους παράγοντες κινδύνου για καρδιακή προσβολή.



Τέλος, η μέτρια κατανάλωση οινοπνεύματος μειώνει τον κίνδυνο θανάτου από έμφραγμα του μυοκαρδίου. (Vander, 2011)

### Γενετικοί παράγοντες

Σε σπάνιες περιπτώσεις ορισμένες μονογονιδιακές διαταραχές έχουν συνδεθεί με αύξηση του κινδύνου εμφάνισης της νόσου. Τέτοιες ασθένειες είναι η οικογενής υπερχοληστερινεμία, η διαταραχή του μεταβολισμού της βιταμίνης B12 τύπου 1, το σύνδρομο Williams κ.α. Ο κυριότερος, όμως, παράγοντας που προδιαθέτει σε εμφάνιση στεφανιαίας νόσου είναι η αθηρωμάτωση. Μελέτες έχουν δείξει ότι γενετικοί τόποι στις περιοχές 2q21, 1q22 και Χρ23-q26 συνδέονται πιθανώς με την εμφάνιση αθηρωματικών πλακών και επιβεβαιώνουν την ύπαρξη γενετικής συσχέτισης με νοσήματα όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η υπέρταση και η παχυσαρκία. Επίσης, υπάρχουν ενδείξεις ότι πολυμορφισμοί γονιδίων που συμμετέχουν σε ποικίλες μεταβολικές οδούς συνδέονται με τον κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου είτε άμεσα είτε τροποποιώντας το αποτέλεσμα θεραπευτικής παρέμβασης.

Στους γενετικούς παράγοντες που συνδέονται με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου έχουν προστεθεί τα τελευταία χρόνια πολλά microRNA, αλλά αυτά θα αναλυθούν εκτενώς παρακάτω.

Η γενική εκτίμηση των ασθενών για τον καθορισμό του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου περιλαμβάνει λεπτομερές ατομικό και οικογενειακό ιστορικό καθώς και βιοχημικές μετρήσεις και αποσκοπεί στον εντοπισμό ατόμων υψηλού κινδύνου, την τροποποίηση των επιβαρυντικών παραγόντων και την πρόληψη εμφάνισης της νόσου. (Καναβάκης, 2005)

Πίνακας με τα γονίδια που συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου (Καναβάκης, 2005)

<b>Μεταβολισμός λιπιδίων</b>		<b>Φλεγμονώδης αντίδραση</b>	
Apolipoprotein (a)	152200	E-Selectin	131210
Apolipoprotein B	107730	P-Selectin	173610
Apolipoprotein E	107741	Interleukin-6	147620
Cholesterol ester transfer protein (CETP)	118470	Paraoxonase	168820
Lecithin cholesterol acetyl transferase	606961	<b>Ενδοθήλιο/αγγεία</b>	
LDL receptor	606945	Connexin 37	121012
Lipoprotein Lipase	238600	Endothelial nitric oxide synthase	163729
<b>Ρύθμιση αρτηριακής πίεσης</b>		Matrix G1a protein	154870
Alpha adducin	102680	Matrix Metalloprotease-9	120361
Angiotensinogen	106150	Stomelysin-1	185250
Angiotensin II receptor, type I	106165	<b>Ευαισθησία στην ινσουλίνη</b>	
Angiotensin converting enzyme	106180	Insulin receptor substrate-1	147545
<b>Θρόμβωση</b>		<b>Μεταβολισμός ομοκυστεΐνης</b>	
Factor II (prothrombin)(G20210A)	176930	Cystathionine beta synthase	236200
Factor V(factor Leiden)	227400	Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR)	607093
Factor VII	227500	<b>Ινωδόλυση</b>	
Thrombospondin genes	188060	Fibrinogen genes	134820
	188061	Plasminogen activator inhibitor-I	173360
<b>Αιμοπετάλια</b>		Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor	603101
Glycoprotein Ia/IIb receptor	192974		
Glycoprotein IIIa receptor	173470		

### *Η διάγνωση της Στεφανιαίας νόσου*

Πολλές μέθοδοι μπορούν να διαγνώσουν πιθανές καρδιακές παθήσεις. Η επιλογή του ποια θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από τους παράγοντες κινδύνου, το ιστορικό καρδιακών προβλημάτων του ασθενή και τα συμπτώματα. Συνήθως οι εξετάσεις αρχίζουν με την πιο απλή μέθοδο και μπορεί τελικά να γίνουν και πιο περίπλοκες. Οι κυριότερες μέθοδοι αναφέρονται παρακάτω:

### 1. Εξετάσεις ρουτίνας

Συστηματικός έλεγχος της πίεσης του αίματος και των επιπέδων χοληστερόλης στο αίμα. (UNIVERSITY of MARYLAND MEDICAL CENTER, n.d.)

### 2. Ηλεκτροκαρδιογράφημα

Ηλεκτροκαρδιογράφημα (ΗΚΓ) είναι η διαδικασία καταγραφής της ηλεκτρικής δραστηριότητας της καρδιάς κατά τη διάρκεια μιας χρονικής περιόδου, χρησιμοποιώντας ηλεκτρόδια τοποθετημένα στο σώμα ενός ασθενούς. Αυτά τα ηλεκτρόδια ανιχνεύουν τις μικροσκοπικές ηλεκτρικές αλλαγές στο δέρμα που προκύπτουν από την αποπόλωση του καρδιακού μυ κατά τη διάρκεια κάθε καρδιακού παλμού. (Braunwald, 1997)

### 3. Τεστ κοπώσεως

Ενώ ο ασθενής ασκείται σωματικά, γίνεται συνεχής ηλεκτροκαρδιογραφική παρακολούθηση. Αν ο ασθενής δεν είναι σε θέση χορηγούνται φαρμακολογικές ουσίες που προσομοιάζουν το στρες της άσκησης.

### 4. Υπερηχοκαρδιογράφημα

Το υπερηχοκαρδιογράφημα είναι μη επεμβατική εξέταση που χρησιμοποιεί υπερήχους για να δημιουργήσει μια κινούμενη εικόνα της καρδιάς.

### 5. Σπινθηρογράφημα

Ανιχνεύει το πέρασμα ραδιενεργών ιχνηθετών μέσα από την περιοχή της καρδιάς.

### 6. Αγγειογραφία

Η αγγειογραφία είναι μια επεμβατική δοκιμή. Χρησιμοποιείται για ασθενείς που παρουσιάζουν ισχυρές ενδείξεις για σοβαρή απόφραξη. Απαιτείται όταν υπάρχει ανάγκη να γνωρίζουμε την ακριβή εντός των στεφανιαίων αρτηριών.

## 7. Αξονική Στεφανιογραφία

Με τη βοήθεια ακτίνων Χ δημιουργείται τρισδιάστατη εικόνα της καρδιάς και των στεφανιαίων αγγείων της (UNIVERSITY of MARYLAND MEDICAL CENTER, n.d.).

### *Η θεραπεία της Στεφανιαίας νόσου*

Η θεραπεία χωρίζεται σε φαρμακευτική και χειρουργική:

#### Φαρμακευτική θεραπεία

##### Αγγειοδιασταλτικά φάρμακα

Ο τρόπος με τον οποίον συμβάλλουν είναι: προκαλούν διαστολή αρτηριών και φλεβών με αποτέλεσμα να μειώνεται η συνολική περιφερειακή αντίσταση στα αρτηρίδια και άρα η αρτηριακή πίεση και το έργο που πρέπει να καταναλώσει η καρδιά για την εξώθηση του αίματος. Ταυτόχρονα μειώνεται η φλεβική πίεση με αποτέλεσμα τη μείωση της φλεβικής επανόδου και της διάταση της κοιλίας και τις απαιτήσεις της σε οξυγόνο κατά την επακόλουθη συστολή. Σε αυτά ανήκει η νιτρογλυκερίνη, που προκαλεί αγγειοδιαστολή διότι μετατρέπεται στο σώμα σε μονοξειδίο του αζώτου.

##### Φάρμακα που προκαλούν φραγή της λειτουργίας των β-αδρενεργικών υποδοχέων

Αυτά χρησιμοποιούνται για τη μείωση της αρτηριακής πίεσης των υπερτασικών ατόμων. Η σημαντικότερη δράση τους είναι η φραγή της δράσης του συμπαθητικού συστήματος της καρδιάς και άρα η μείωση του έργου του μυοκαρδίου και των αναγκών του σε οξυγόνο, λόγω ελάττωσης της συχνότητας και της συσταλτικότητας της καρδιάς.

### Φάρμακα που εμποδίζουν ή αναστρέφουν τη θρόμβωση

Αυτά είναι ιδιαίτερα σημαντικά για την πρόληψη και τη θεραπεία του εμφράγματος. Σε αυτά περιλαμβάνεται και η ασπιρίνη.

### Χειρουργική θεραπεία

#### Αγγειοπλαστική των στεφανιαίων αρτηριών με μπαλόνι

Πρωθείται ένας καθετήρας με μπαλόνι στο άκρο του στην αποφραγμένη αρτηρία. Αυτό το μπαλόνι στη συνέχεια φουσκώνει με αποτέλεσμα τη διάταση του αγγείου και τη ρήξη εναποθέσεων παθολογικού ιστού.

#### Μόνιμη τοποθέτηση στεφανιαίων προθεμάτων

Αυτά τοποθετούνται στον αποφραγμένο αυλό και είναι ατσάλινοι σωλήνες. Μοιάζουν με πλέγμα και προκαλούν τη διάνοιξη του των στεφανιαίων αρτηριών.

#### Παράκαμψη των στεφανιαίων

Γίνεται αντικατάσταση της αποφραγμένης στεφανιαίας αρτηρίας με μια φλέβα που λαμβάνεται από κάποιο άλλο μέρος του σώματος του ασθενή. (Vander, 2011)

## Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup> : Γενετικοί πολυμορφισμοί

Οι γενετικοί πολυμορφισμοί είναι αλληλόμορφα (εναλλακτικές μορφές) του ίδιου γενετικού τόπου που διαφέρουν ως προς τη νουκλεοτιδική τους ακολουθία. (Russell, 2005) Δεν αρκεί όμως αυτό για να θεωρηθεί μια διαφορά στη νουκλεοτιδική αλληλουχία ως πολυμορφισμός, πρέπει τα αλληλόμορφα να εμφανίζονται με συχνότητα τουλάχιστον 1%. Γενετικοί τόποι μπορούν να χαρακτηρισθούν ως πολυμορφικοί μπορούν να χαρακτηρισθούν μόνο αυτοί όπου τουλάχιστον 2% του πληθυσμού είναι ετερόζυγοι. (Παταργιάς, Αλεπόπου, 1998) Το αλληλόμορφο δεν είναι αναγκαστικά γονίδιο, μπορεί η πολυμορφική θέση να είναι οπουδήποτε στο γονιδίωμα.

Οι κυριότεροι τύποι πολυμορφισμών DNA είναι:

### 1. Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs)

Είναι ο συνηθέστερος τύπος πολυμορφισμού DNA και είναι η αιτία του 90-95% της ποικιλομορφίας. Αποτελεί μια αντικατάσταση ενός ζεύγους βάσεων από ένα άλλο σε έναν γενετικό τόπο. Η αιτία συνήθως είναι τα λάθη κατά την αντιγραφή του DNA.

Υπάρχουν δύο τρόποι ανίχνευσης SNPs, ανάλογα με το αν τροποποιούν θέση περιορισμού:

#### i. Ανίχνευση SNPs που τροποποιούν θέση περιορισμού

Μπορεί να δημιουργεί περιοριστική θέση ή να απαλείφει υπάρχουσα. Οι διαφορετικές θέσεις περιορισμού εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα κατανομής στα ομόλογα χρωμοσώματα εξαιτίας των SNPs. Έτσι, δημιουργούνται RFLPs, δηλαδή πολυμορφισμοί μήκους περιοριστικού θραύσματος. Η γονοτύπηση

γίνεται με στύπωμα Southern ή PCR και ουσιαστικά βασίζεται στο γεγονός ότι για κάθε αλληλόμορφο τα περιοριστικά τμήματα είναι χαρακτηριστικά.

ii. Ανίχνευση SNPs που δεν τροποποιούν θέση περιορισμού

Γίνεται με υβριδοποίηση με αλληλομορφοειδικό ολιγονουκλεοτίδιο (ASO). Ουσιαστικά γίνεται ανάμιξη ενός ολιγονουκλεοτιδίου, το οποίο είναι απόλυτα συμπληρωματικό με το πιο κοινό αλληλόμορφο SNP, με το DNA-στόχο και δημιουργούνται συνθήκες που επιτρέπουν υβριδοποίηση μόνο σε απόλυτα συμπληρωματικές αλληλουχίες. Έτσι, δε γίνεται υβριδοποίηση με αλληλόμορφα που φέρουν οποιοδήποτε άλλο SNP.

2. Βραχείες διαδοχικές επαναλήψεις (STR) ή μικροδορυφόροι ή απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες

Έχουν μήκος 2-6 bp και επαναλαμβάνονται μέχρι και 100 φορές. Πολλές από αυτές είναι πολυμορφικές και για αυτό είναι πολύ χρήσιμες για τη χαρτογράφηση. Η πιο συχνή μέθοδος για την ανάλυσή τους είναι η PCR. Έτσι, ανάλογα με τον αριθμό των επαναλήψεων προκύπτουν τμήματα DNA με χαρακτηριστικό μήκος. Όσο πιο μεγάλος το μήκος των μορίων DNA τόσο πιο μεγάλος ο αριθμός των επαναλήψεων.

3. Ποικίλου αριθμού διαδοχικές επαναλήψεις (VNTR)

Μοιάζουν με τις STRs, αλλά έχουν μεγαλύτερη μονάδα επανάληψης (7 έως και δεκάδες ζεύγη) και είναι πολύ πιο σπάνιες. Λόγω του μεγαλύτερου μήκους επανάληψης η PCR δεν προτιμάται. Συνήθως η ανίχνευση γίνεται με περιοριστικά ένζυμα και στύπωμα Southern. Η διαδικασία έχει ως εξής: το γονιδίωμα πέπτεται με περιοριστική ενδονουκλεάση που κόβει σε κάθε πλευρά του VNTR, ακολουθεί διαχωρισμός με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και μεταφορά σε μεμβράνη. Έπειτα, γίνεται υβριδοποίηση με ιχνηθέτη την

επαναλαμβανόμενη αλληλουχία της VNTR και έτσι γίνεται προσδιορισμός του αριθμού της επανάληψης.

## Γενετική πληθυσμών

Η γενετική μπορεί να χωριστεί σε τέσσερις μεγάλους κλάδους:

1. Κλασική γενετική
2. Μοριακή γενετική
3. Πληθυσμιακή γενετική
4. Ποσοτική γενετική

Η πληθυσμιακή γενετική είναι η εφαρμογή της κλασικής γενετικής σε μεγάλες ομάδες ατόμων και εξετάζει τη μεταβίβαση ενός ή λίγων γενετικών τόπων. Ένα πρώτο βήμα στην ανάλυση της γενετικής δομής ενός πληθυσμού είναι η ποσοτική περιγραφή του. Αυτό επιτυγχάνεται με υπολογισμό των συχνοτήτων των γονοτύπων και των αλληλομόρφων.

Υπολογισμός συχνοτήτων των γονοτύπων: Μετράμε τον αριθμό των ατόμων με συγκεκριμένο γονότυπο και διαιρούμε τον αριθμό αυτό με το συνολικό αριθμό των ατόμων του πληθυσμού. Το άθροισμα των συχνοτήτων των γονοτύπων πρέπει να ισούται με 1.

Υπολογισμός συχνοτήτων των αλληλομόρφων: Ισούται με τον αριθμό των αντιγράφων ενός συγκεκριμένου αλληλομόρφου προς το άθροισμα όλων των αλληλομόρφων του πληθυσμού. Σε αυτούς τους υπολογισμούς διπλασιάζουμε τον αριθμό των ομοζυγωτών με αλληλόμορφο που μας ενδιαφέρει και σε αυτό προσθέτουμε τον αριθμό των ετεροζυγωτών. Αυτό το διαιρούμε με τον αριθμό των ατόμων του πληθυσμού διπλασιασμένο.



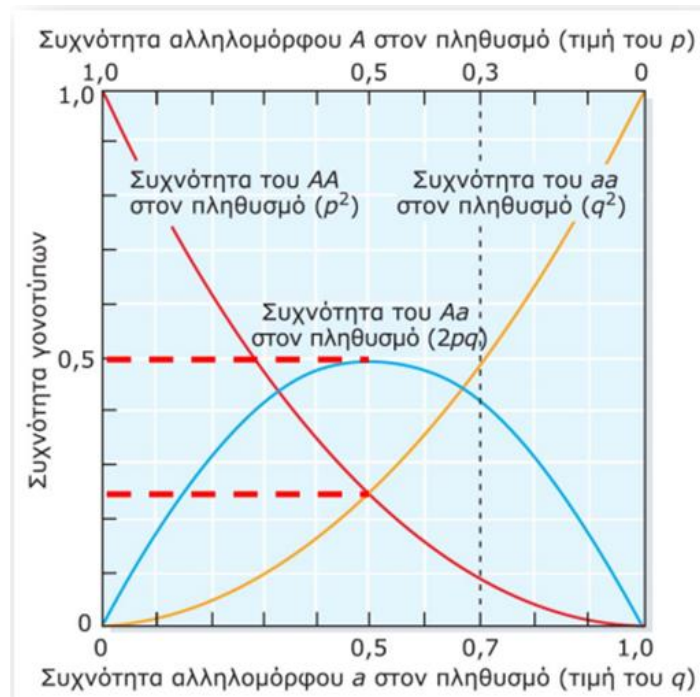
## Ισορροπία Hardy-Weinberg

Σε ένα μεγάλο πληθυσμό όπου τα άτομα διασταυρώνονται τυχαία (παμμικτικός πληθυσμός) και που δεν επηρεάζονται από εξελικτικές δυνάμεις, οι συχνότητες των αλληλομόρφων δε μεταβάλλονται και οι γονοτυπικές μετά από μια γενιά σταθεροποιούνται.

Σε έναν παμμικτικό πληθυσμό η τυχαία διασταύρωση μεταξύ ατόμων με διαφορετικούς γονότυπους ισοδυναμεί με τον τυχαίο συνδυασμό των γαμετών που παράγονται από τους γονοτύπους αυτούς. Έστω ότι τα αλληλόμορφα A και a του γονιδίου A (A, a) έχουν συχνότητα p και q αντίστοιχα ( $p + q = 1$ ) και ότι οι συχνότητες των αλληλομόρφων A και a και στα δύο φύλα είναι ίσες. Τα αποτελέσματα του τυχαίου συνδυασμού των γαμετών δίνονται στον παρακάτω πίνακα:

♀ ♀	A	a
♂ ♂	p	q
A p	AA $p^2$	Aa pq
a q	Aa pq	aa $q^2$

Το αποτέλεσμα του παραπάνω πίνακα, δηλαδή οι συχνότητες  $p^2$ ,  $2pq$  και  $q^2$  των γονοτύπων AA, Aa και aa αντίστοιχα, σε μεγάλους τυχαία διασταυρούμενους πληθυσμούς αποτελούν τον Νόμο των Hardy – Weinberg. (Russell, 2005)



Η σχέση των γονοτυπικών συχνοτήτων AA, Aa και aa και των αλληλομόρφων A και a. Μία κάθετη γραμμή ορίζει έναν πληθυσμό. Για παράδειγμα, η κάθετη γραμμή που συνδέει τα  $p=0,3$  και  $q=0,7$  ορίζει έναν πληθυσμό. (Russell, 2005)

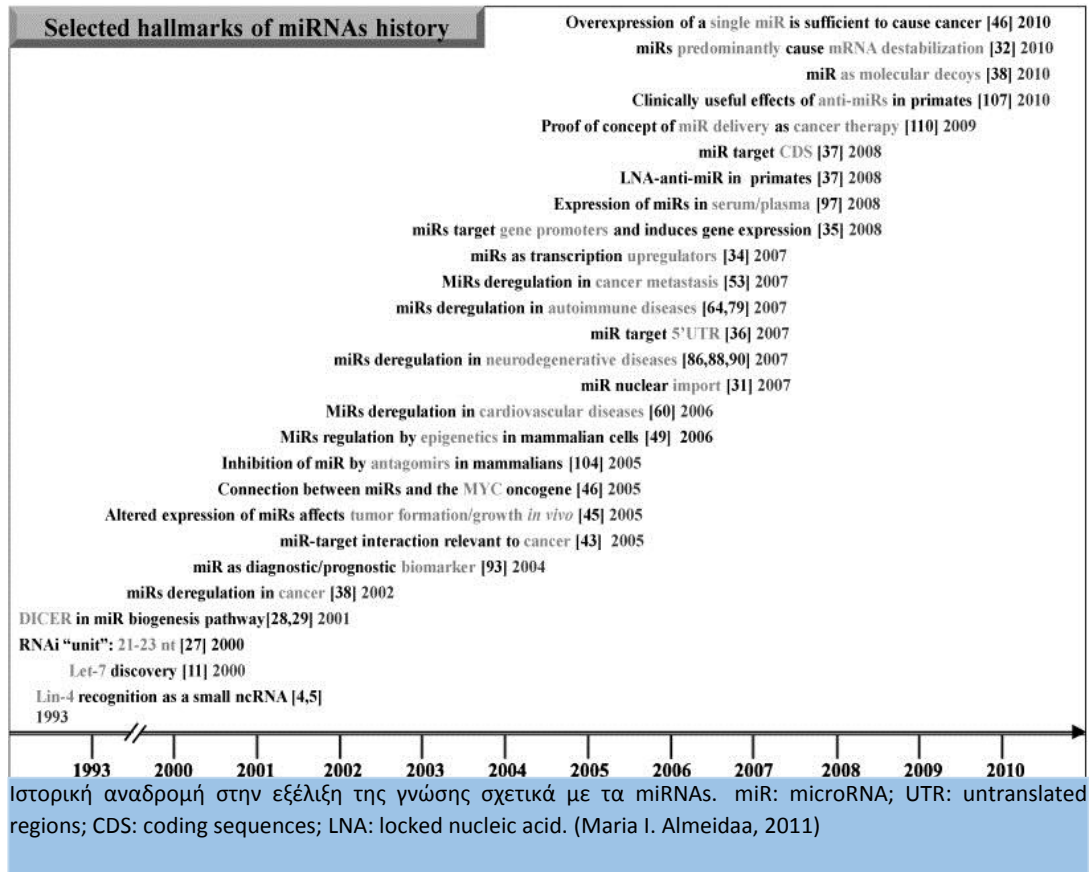
## Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: MicroRNA

Όλα τα κύτταρα σε έναν οργανισμό φέρουν το ίδιο ακριβώς γονιδίωμα, αυτό όμως οδηγεί στην ερώτηση: πώς τελικά προκύπτουν τόσοι πολλοί διαφορετικοί ιστοί και όργανα; Είναι γνωστό ότι η μεταγραφή πολλών γονιδίων στα ευκαρυωτικά κύτταρα καταστέλλεται, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις, τα γονίδια μεταγράφονται χωρίς ποτέ τελικά να μεταφραστούν. Διάφοροι μετα-μεταγραφικοί μηχανισμοί προσθέτουν ένα ακόμα επίπεδο ρύθμισης στα ήδη πολύπλοκα συστήματα που ρυθμίζουν την έκφραση των ευκαρυωτικών γονιδίων. Οι μηχανισμοί αυτοί είναι το αποτέλεσμα των μικρών, μη κωδικών RNA που ονομάζονται siRNA (small interfering RNA ), miRNA (microRNA ή MIR) ή antisense RNA. (Phillips, 2008)

Τα miRNAs έχουν μήκους 19-25 nt και η λειτουργία τους είναι να καταστέλλουν τη μετάφραση ή να προκαλούν την αποικοδόμηση των συμπληρωματικών mRNAs στόχων. Έχουν περιγραφεί σε ασπόνδυλα και σπονδυλωτά και πολλά είναι συντηρημένα μεταξύ αυτών. Ρυθμίζουν περίπου το 30% των προϊόντων γονιδίων των θηλαστικών. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπολογίζεται ότι υπάρχουν >600-1000 miRNAs.

### Ιστορική αναδρομή των miRNAs

Το πρώτο miRNA ανακαλύφθηκε το 1993 στο *C. elegans* και ονομάστηκε *lin-4*. Είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη του σκουληκιού από προνύμφη σε ενήλικα, επειδή καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου *lin-14* (Lee RC, 1993). Το επόμενο miRNA βρέθηκε το 2000 επίσης στο *C. elegans* και ονομάστηκε *let-7*. Είναι κρίσιμο μόριο που σταματά την κυτταρική διαίρεση των βλαστικών κυττάρων και προκαλεί διαφοροποίηση της κατάστασής τους. Μειωμένη έκφραση του *let-7* συνδέεται με ανθρώπινους καρκίνους. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η ιστορική αναδρομή των miRNAs.



## Ονοματολογία

Τα microRNA στην τυπική τους ονοματολογία συμβολίζονται ως miR όταν αναφερόμαστε στο ώριμο microRNA, ως miR όταν αναφερόμαστε στο pre-miRNA και στο pri-miRNA και ως MIR όταν αναφερόμαστε στο γονίδιο που το κωδικοποιεί.

Το miR ακολουθείται από μια παύλα και έναν αριθμό. Ο αριθμός αυτός είναι ενδεικτικός της σειράς με την οποία ανακαλύφθηκε και ονοματίστηκε το συγκεκριμένο miRNA.

Ο οργανισμός στον οποίο βρέθηκε το miRNA συμβολίζεται με τρία γράμματα ως πρόθεμα.

Τα miRNA που έχουν ταυτόσημες αλληλουχίες με διαφορά 1-2 βάσεων σημειώνονται με ένα πρόσθετο γράμμα: a,b,c και πάει λέγοντας.

Τα miRNA που έχουν 100% ταυτόσημες αλληλουχίες, αλλά προέρχονται από διαφορετικές θέσεις στο γονιδίωμα σημειώνονται με έναν πρόσθετο αριθμό: 1,2,3 και πάει λέγοντας.

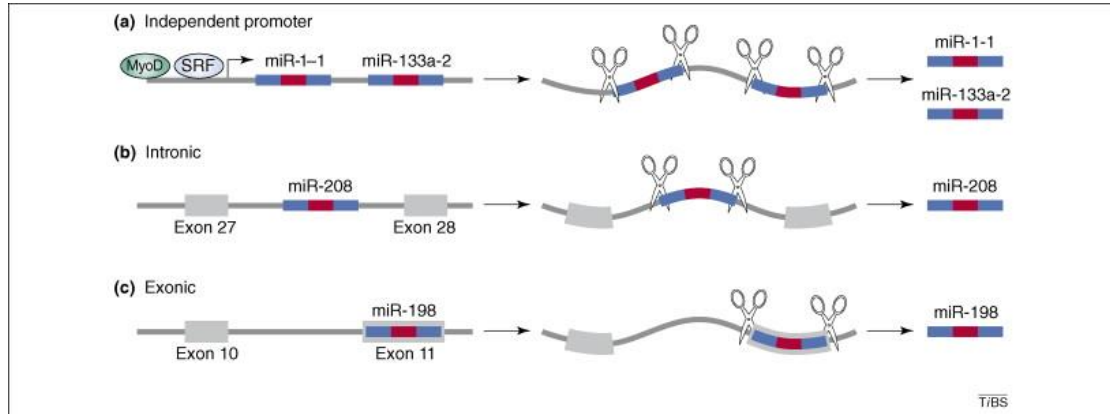
Όταν δύο ώριμα microRNAs προέρχονται από απέναντι βραχίονες του ίδιου pre-miRNA και βρίσκονται σε περίπου παρόμοια ποσά, σημειώνονται με κατάληξη -3p ή -5p. Ωστόσο, το ώριμο microRNA που προήλθε από τον ένα βραχίονα της φουρκέτας είναι συνήθως πολύ πιο άφθονο από αυτό που προήλθε από το άλλο σκέλος, σε αυτήν την περίπτωση, ένας αστερίσκος μετά το όνομα δείχνει το ώριμο μόριο που βρέθηκε σε χαμηλά επίπεδα.

Για παράδειγμα το microRNA has-miR-146a\* συμβολίζει:

- miR: το ώριμο microRNA 146
- hsa: που εντοπίστηκε στον άνθρωπο (hsa: *Homo sapien*)
- a: που έχει τουλάχιστον ένα ακόμα σχεδόν πανομοιότυπο miRNA
- \*: από τον απέναντι βραχίονα του ίδιου pre-miRNA προέρχεται άλλο ένα ώριμο miRNA, το οποίο όμως είναι πολύ πιο άφθονο

### Οργάνωση των miRNA στο γονιδίωμα

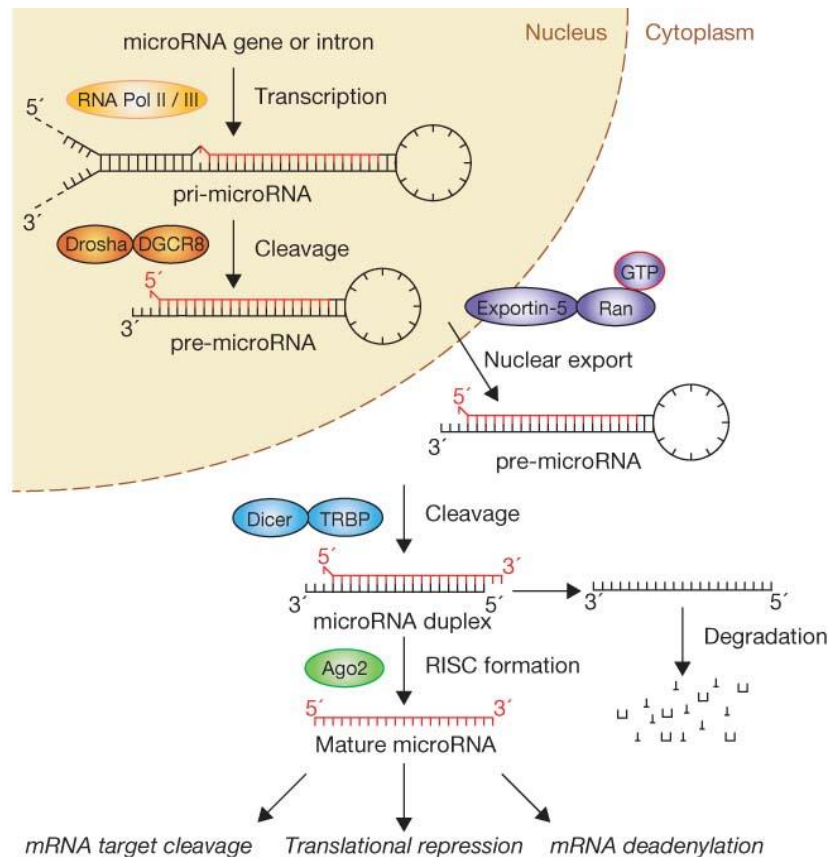
Η γονιδιωματική οργάνωση miRNAs είναι ποικίλη. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα miRNAs γονίδια περιέχουν τους δικούς τους ανεξάρτητους υποκινητές και ενισχυτές. Στους ανθρώπους και στα ποντίκια, περίπου το 40% των miRNAs βρίσκονται μέσα σε ιντρόνια (κωδικών ή μη κωδικών περιοχών), και 10% βρίσκονται σε εξόνια. Όταν είναι προσανατολισμένα στην ίδια κατεύθυνση με το γονίδιο που τα περιβάλλει, τα miRNA τυπικά προέρχονται από το μεγαλύτερο μεταγράφημα στο οποίο είναι ενσωματωμένα. Ένα επιπλέον περίπου 30% έχει αβέβαιη προέλευση μεταγραφής, και τα υπόλοιπα προέρχονται από γονιδιωματικές επαναλήψεις (Yong Zhao, 2007). Αυτά φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.



Γονιδιωματική οργάνωση των miRNAs: (α) Η μεταγραφή των miRNAs μπορεί να ρυθμιστεί από ανεξάρτητους υποκινητές. Τέτοια miRNAs μπορεί να βρίσκονται και σε ιντρόνια, αλλά συνήθως με προσανατολισμό αντίθετο ως προς το γονίδιο που τα περιβάλλει. (β) Τα περισσότερα πρόδρομα miRNA που βρίσκονται σε εσώνια έχουν τον ίδιο προσανατολισμό με το γονίδιο μέσα στο οποίο βρίσκονται και αρχικά μεταγράφονται ως μέρος του προδρόμου mRNA του. (γ) Με λίγες εξαιρέσεις, τα miRNAs που είναι ενσωματωμένα σε εξώνια ή επικαλύπτονται με εξώνια γνωστών μεταγράφων είναι πάντα στην ίδια κατεύθυνση και τα περισσότερα από αυτά τα γνωστά μετάγραφα βρίσκονται στις μη-κωδικές 5' ή 3' UTRs. Περίπου το 50% των τα miRNAs είναι σε συμπλέγματα miRNA που αρχικά κωδικοποιούνται ως πολυσιστρονικά μετάγραφα και στη συνέχεια διασπώνται σε πολλαπλά miRNAs. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα πολυσιστρονικά miRNAs μοιράζονται το ίδιο πρότυπο έκφρασης. Ωστόσο, τα σχετικά επίπεδα των miRNAs εντός του συμπλέγματος φαίνεται να ρυθμίζονται με αναπτυξιακό και ομοιοστατικό τρόπο, προτείνοντας πολυπλοκότητα στη ρύθμιση της έκφραση, που ακόμα δεν έχει περιγραφεί πλήρως. Η γονιδιωματική θέση της ακολουθίας του miRNA φαίνεται με μπλε για την pre-miRNA ακολουθία και κόκκινο για την ώριμη αλληλουχία. (Yong Zhao, 2007)

## Ο μηχανισμός βιογένεσης των microRNA

Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται συνοπτικά η συνολική διαδικασία της βιογένεσης των MIRs.



Συνοπτική παρουσίαση βιογένεσης των miRNA (Julia Winter, 2009)

Πιο αναλυτικά, μπορούμε να χωρίσουμε τη βιογένεση σε διάφορα στάδια.

## 1. Διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στον πυρήνα

### i. Μεταγραφή του pri-miRNA:

Τα γονίδια των miRNA μεταγράφονται είτε με τη βοήθεια της RNA πολυμεράσης II ή της RNA πολυμεράσης III σε αρχικά μετάγραφα miRNA (pri-miRNA), δηλαδή μακριά μόρια RNA με δομή φουρκέτας τα οποία εμπεριέχουν και το ώριμο miRNA. Πολλά pri-miRNAs είναι πολυαδενυλιωμένα και έχουν κάλυμμα, δύο σήματα κατατεθέν της RNA πολυμεράσης II. Από την άλλη πλευρά, τα miRNAs που κωδικοποιούνται από το μεγαλύτερο ανθρώπινο σύμπλεγμα miRNA, το C19MC, μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση III. Και οι δύο πολυμεράσες RNA ρυθμίζονται διαφορετικά και αναγνωρίζουν συγκεκριμένο υποκινητή και

συγκεκριμένα τερματικά στοιχεία, προάγοντας μεγάλη ποικιλία ρυθμιστικών επιλογών. Η έκφραση επιλεγμένων miRNAs είναι υπό τον έλεγχο μεταγραφικών παραγόντων, για παράδειγμα υπό τον έλεγχο των μεταγραφικών παραγόντων c-Myc ή p53, ή εξαρτάται από τη μεθυλίωση του υποκινητή τους. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι κάθε miRNA ενός γονιδιωματικού συμπλέγματος από miRNAs μπορεί να μεταγραφεί και να ρυθμιστεί ανεξάρτητα.

ii. Επεξεργασία του pri-miRNA

Η επεξεργασία των αρχικών RNA μεταγράφων από τις ADARs (απαμινάσες της αδενοσίνης που ενεργούν πάνω στο RNA) τροποποιεί την αδενοσίνη (A) σε ινοσίνη (I). Επειδή οι ιδιότητες ζευγαρώματος της ινοσίνης είναι παρόμοιες με εκείνες της γουανοσίνης (G), αυτή η επεξεργασία των προδρόμων miRNAs μπορεί να αλλάξει την αλληλουχία, το ζευγάρωμα των βάσεων και τις δομικές ιδιότητες και μπορεί να επηρεάσει την περαιτέρω επεξεργασία τους, καθώς και την ικανότητα αναγνώρισης του στόχου.

iii. Διάσπαση pri-miRNA από το σύμπλοκο Drosha-DGCR8 μικροεπεξεργαστή

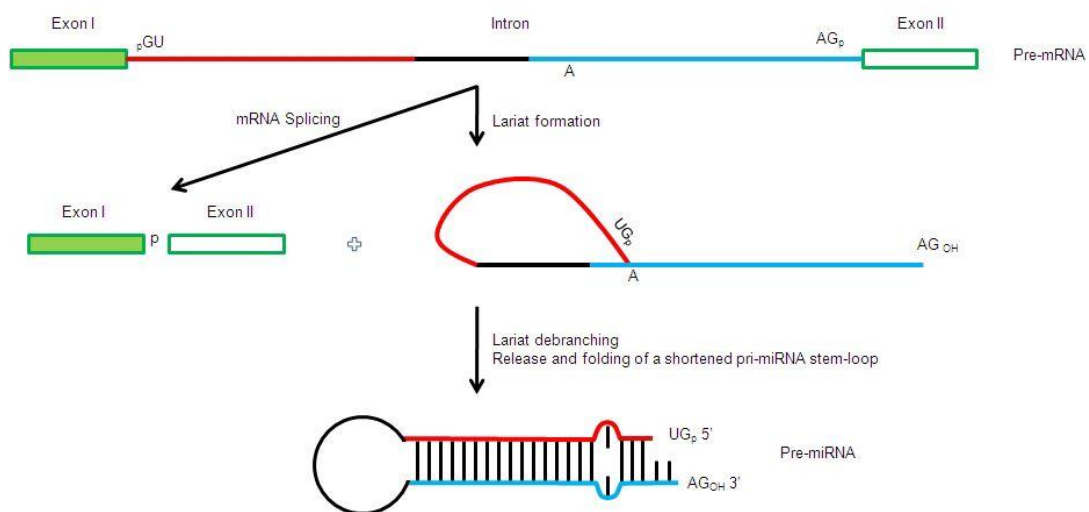
Το pri-miRNA στη συνέχεια διασπάται ενδονουκλεολυτικά από το σύμπλεγμα πυρηνικού μικροεπεξεργαστή που σχηματίζεται από την RNase III-Drosha και τη σύνδεση της DGCR8 (DiGeorge critical region 8) πρωτεΐνης (γνωστή επίσης και ως Pasha = Partner of από τη Drosha). Η DGCR8 / Pasha περιέχει δύο domains δέσμησης με δίκλωνο RNA και είναι απαραίτητη για την επεξεργασία των miRNAs σε όλους τους οργανισμούς. Ένα μέσο ανθρώπινο pri-miRNA περιέχει μίσχο φουρκέτας με 33 ζεύγη βάσεων, έναν τερματικό βρόχο και δύο μονόκλωνες πλευρικές περιοχές ανοδικά και καθοδικά της φουρκέτας. Το δίκλωνο στέλεχος και οι ασύζευκτες πλευρικές περιοχές είναι κρίσιμες για τη σύνδεση της DGCR8 και τη διάσπαση από τη Drosha, αλλά η περιοχή του βρόγχου ή οι ειδικές αλληλουχίες είναι λιγότερο σημαντικές για αυτό το βήμα. Ένα SNP στο pri-miRNA μπορεί να εμποδίσει την επεξεργασία του από τη Drosha.



Τα δύο domains ριβονουκλεάσης της Drosha διασπούν τους 5' και 3' βραχίονες της pri-miRNA φουρκέτας, ενώ η DGCR8 αλληλεπιδρά άμεσα και σταθερά με το pri-miRNA και λειτουργεί ως μοριακό χάρακας για να καθορίσει την ακριβή θέση διάσπασης. Η Drosha διασπά 11 ζεύγη βάσεων μακριά από τον κόμβο του μονόκλωνου RNA με το δίκλωνο RNA στη βάση της φουρκέτας και έτσι δημιουργείται τελικά το pre-miRNA.

Η διαμεσολαβούμενη από Drosha διάσπαση του pri-miRNA γίνεται συμμεταγραφικά και προηγείται του ματίσματος.

Υπάρχει, όμως, και μη διαμεσολαβούμενη από Drosha διάσπαση. Τα miRNAs που προέρχονται από ιντρόνια απελευθερώνονται από τα μετάγραφα που τα περιβάλλουν μετά το μάτισμα και αν είναι κατάλληλα ώστε να σχηματίσουν φουρκέτα που μοιάζει με pre-miRNA, τότε παρακάμπτουν τη διάσπαση από Drosha. Αυτά τα miRNAs ονομάζονται mirtrons. Αυτό φαίνεται πολύ καθαρά στην παρακάτω εικόνα.



iv. Διαμεσολάβηση Exportin-5-Ran-GTP για την εξαγωγή του pre-miRNA από τον πυρήνα

Μετά την επεξεργασία στον πυρήνα, το pre-miRNA εξάγεται στο κυτταρόπλασμα από η exportin-5 (XPO5) σε σύμπλοκο με τη Ran GTP. Η exportin-5 αναγνωρίζει το pre-miRNA ανεξάρτητα της αλληλουχίας του ή της δομής του βρόχου. Η επιτυχής σύνδεση της exportin-5 εξαρτάται από το μήκος της διπλής

έλικας και της 3' προεξοχής, εξασφαλίζοντας έτσι την εξαγωγή μόνο σωστά επεξεργασμένων pre-miRNAs.

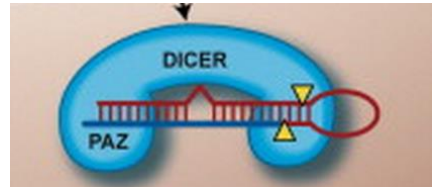
## 2. Διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στο κυτταρόπλασμα

Το RISC είναι ο κυτταροπλασματικός τελεστής του μονοπατιού των miRNAs και περιέχει ένα μονόκλωνο miRNA που το καθοδηγεί προς το mRNA στόχο του. Η κυτταροπλασματική επεξεργασία των miRNAs και η συναρμολόγηση του RISC επιτελούνται από το RISC loading complex (το RLC). Το RLC είναι σύμπλοκο πολλών πρωτεϊνών, συγκεκριμένα αποτελείται από την RNάση Dicer, τις TRBP και PACT (πρωτεΐνες με domain δέσμησης δίκλωνου RNA) και την πρωτεΐνη Αργοναύτη-2 (Ago2).

Η TRBP και η PACT δεν είναι απαραίτητες για τη διάσπαση των pre-miRNAs μέσω Dicer αλλά τη διευκολύνουν. Η εξάντληση των TRBP ή της PACT μειώνει την αποδοτικότητα της μετα-μεταγραφικής γονιδιακής αποσιώπησης. Παρά το γεγονός ότι και οι δύο συμμετέχουν στη στρατολόγηση της Ago2, η in vitro ανασύσταση της φόρτωσης και της ενεργοποίησης του RISC επιτυγχάνεται μέσω των: Dicer, TRBP και Ago2 μόνο. Ο σχηματισμός του συμπλόκου RLC ενεργοποιείται ανεξάρτητα από την υδρόλυση ATP με τη συναρμολόγηση των: Dicer, TRBP και Ago2. Αφού συμπλοκοποιηθούν αυτά τα τρία, ενώνεται μαζί τους η εξαγόμενη από τον πυρήνα φουρκέτα.

Η διάσπαση pre-miRNA που διαμεσολαβείτε από Ago2: Το ac-pre-miRNA. Τα miRNAs που εμφανίζουν ένα υψηλό βαθμό συμπληρωματικότητας κατά μήκος του στελέχους της φουρκέτας, απαιτείται ένα πρόσθετο βήμα ενδονουκλεολυτικής διάσπασης πριν από τη δράση της Dicer: Η Ago2 διασπά τον 3' βραχίονα της φουρκέτας (το μελλοντικό κλώνο-επιβάτη) στη μέση δημιουργώντας μια τσακισμένη φουρκέτα και έτσι δημιουργεί το ac-pre-miRNA (Ago2-cleaved precursor miRNA). Η Dicer επεξεργάζεται αυτό το πρόδρομο εξίσου καλά με το pre-miRNA. Αυτό το στάδιο πιθανότατα διευκολύνει το μετέπειτα διαχωρισμό των δύο κλώνων και την ενεργοποίηση του RISC. (Julia Winter, 2009)

Αφού το pre-miRNA βγει στο κυτταρόπλασμα το domain PAZ της Dicer προσδένεται στα δύο νουκλεοτίδια του 3' μονόκλωνου άκρου του pre-miRNA (Cullen, 2004) (ή του ac-pre-miRNA) (Julia Winter, 2009). Η απόσταση ανάμεσα στη θέση πρόσδεσης της PAZ και στο ενεργό κέντρο της RNάσης III (ενδομοριακό διμερές που σχηματίζεται από δύο domains RNάσης) είναι περίπου 65 Å και αντιστοιχεί στο μήκος περίπου 22 ζευγών βάσεων του δίκλωνου RNA. Συνεπώς η λειτουργεί σαν μοριακός χάρακας που μετρά και κόβει ανά περίπου 25 νουκλεοτίδια από το άκρο του δίκλωνου RNA. Αυτό φαίνεται πολύ καθαρά στη διπλανή εικόνα.



Λειτουργία της Dicer ως «μοριακός χάρακας». (Cullen, 2004)

Λόγω του γεγονότος ότι η Dicer κόβει σε απόσταση 22 nt από το σημείο πρόσδεσής της, στο τέλος της δράσης της προκύπτει ένα διμερές RNA με δύο μονόκλιωνα 3' άκρα, των 2 nt το καθένα. Στη συνέχεια, αυτό το μικρό dsRNA ξετυλίγεται από μια RNA ελικάση και ο ένας κλώνος του miRNA, που ονομάζεται ώριμος κλώνος, ενσωματώνεται στο σύμπλοκο RISC, που περιεγράφηκε παραπάνω. (Cullen, 2004)

Δέσμευση των AGO στο miRNA: Ένα πρώτο θέμα για τη δέσμευση των Αργοναυτών είναι σε ποιόν από τους δύο κλώνους θα προσδεθούν τελικά, δηλαδή ποιος θα είναι τελικά ο κλώνος οδηγός. Καθοριστικός παράγοντας για την επιλογή κλώνου έγκειται στο ίδιο το διμερές RNA, ο κλώνος με τα λιγότερα σταθερά ζεύγη στο 5' άκρο προτιμάται για την πρόσδεση των AGO. Αυτές οι θερμοδυναμικές διαφορές μεταξύ των άκρων είναι γνωστές ως κανόνας ασυμμετρίας. (Meister, 2013) Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ένα ένζυμο που μοιάζει με ελικάση δοκιμάζει να χαλαρώσει το διμερές και από τα δύο 5' άκρα και τελικά καταλήγει να χαλαρώσει πρώτο αυτό με το πιο ασταθές, αφού αυτό είναι το πιο εύκολο, άρα και το πιθανότερο. (Bartel, MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function, 2004)

Οι πρωτεΐνες Ago είναι ρυθμιστές και τελεστές. Έχουν πολλαπλές λειτουργίες στο μονοπάτι των miRNAs: συμμετέχουν στην επεξεργασία των miRNAs δημιουργώντας το ac-pre-miRNA και είναι οι πρωτεΐνες του RISC που επιτελούν την

αποικοδόμηση, την αποσταθεροποίηση ή την αναστολή της έκφρασης του mRNA. Επιπλέον οι πρωτεΐνες Ago ρυθμίζουν μετα-μεταγραφικά την αφθονία των miRNAs. Πιθανότατα, η ικανότητα των Ago να δεσμεύονται στα ώριμα miRNAs τα σταθεροποιεί. Ως εκ τούτου, η Ago2 συντονίζει τη ρύθμιση των miRNAs, τη βιογένεση και τη λειτουργία τους (Julia Winter, 2009)

## Τρόπος λειτουργίας των microRNAs

Όπως προαναφέρθηκε τα miRNAs συμμετέχουν στη μετα-μεταγραφική γονιδιακή έκφραση. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω συμπληρωματικότητας του miRNA-οδηγού του RISC με το mRNA στόχο, η συμπληρωματικότητα αυτή μπορεί να είναι μερική ή πλήρης με αποτέλεσμα την καταστολή της έκφρασης ή την αποικοδόμηση του mRNA αντίστοιχα.

Τα τρία είναι τα κύρια ερωτήματα που τίθενται για τον τρόπο λειτουργίας των MIRs:

1. Πώς διαλέγουν το στόχο τους;
2. Αφού γίνει η αλληλεπίδραση miRNA-mRNA, με ποιο τρόπο γίνεται η ρύθμιση;
3. Ποιοι μοριακοί μηχανισμοί διέπουν τη διαμεσολαβούμενη από miRNA μεταφραστική αναστολή, την επιταχυνόμενη εξωνουκλεολυτική αναστολή και τον τεμαχισμό;

### Τρόπος διαλογής στόχου

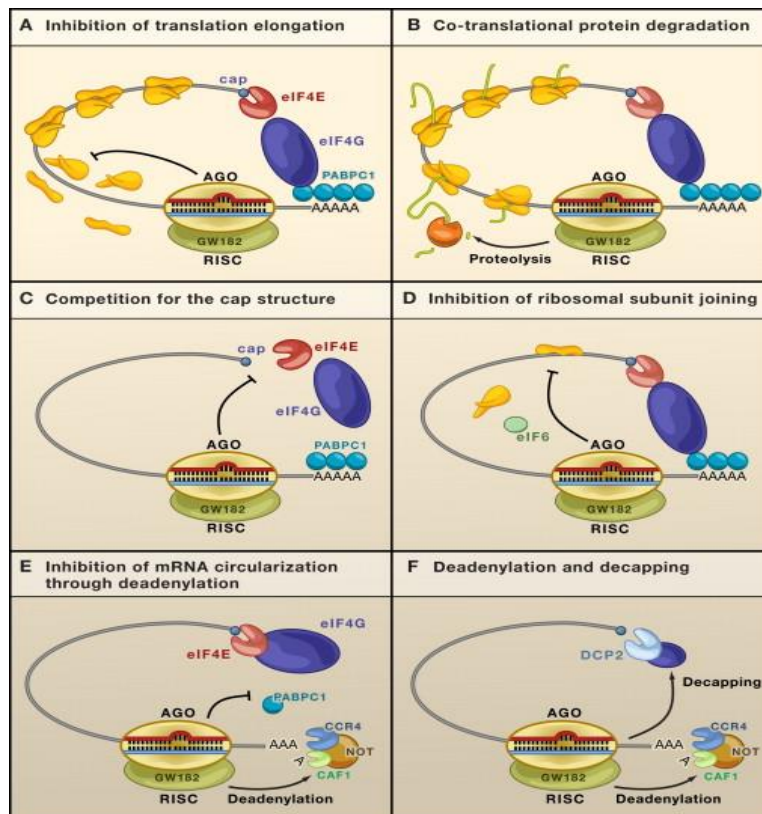
Στα ζωικά microRNAs η διαλογή του στόχου γίνεται μέσω:

- ατελούς ζευγαρώματος στις 3' και 5' αμετάφραστες περιοχές (3' και 5' UTRs) του mRNA,
- συμπληρωματικότητας κατά Watson-Crick στο 5' άκρο των MIRs, ειδικά στα νουκλεοτίδια 2-7 (περιοχή seed),

- αν και είναι λιγότερο σημαντικό, συμπληρωματικότητα στο 3' άκρο μπορεί να συμβάλει (κυρίως όταν το ζευγάρι των νουκλεοτιδίων 2-7 του 5' είναι ασθενές).

Τρόπος ρύθμισης μετά το σχηματισμό του υβριδίου miRNA-mRNA

Ο βαθμός της συμπληρωματικότητας του υβριδίου παρουσιάζεται συχνά ως καθοριστικός παράγοντας που καθορίζει αν θα γίνει καταστολή της έκφρασης ή αποικοδόμηση του mRNA. Η ύπαρξη πληθώρας θέσεων συμπληρωματικότητας είναι συχνά αναγκαία για την αποτελεσματική μεταφραστική αναστολή. (Peter Brodersen and Olivier Voinnet, 2009)



Μηχανισμοί γονιδιακής αποσιώπησης μέσα miRNA (Ana Eulalia, 2008)

1. Αναστολή μεταφραστικής έκφρασης (A-E στην παραπάνω εικόνα)

Στα ζώα σχεδόν όλα τα miRNAs συνδέονται ατελώς με το mRNA-στόχο τους και προκαλούν καταστολή έκφρασης και όχι αποικοδόμηση του mRNA. (Natascha Bushati and Stephen M. Cohen, 2007)

(A) Μηχανισμοί μετά την έναρξη: Τα miRNA (κόκκινα) καταστέλλουν τη μετάφραση του RNA-στόχου ή μπλοκάροντας την επιμήκυνση της μετάφρασης ή προωθώντας το διαχωρισμό των ριβοσωμάτων.

(B) Συμμεταφραστική αποικοδόμηση πρωτεϊνών: Αυτό το μοντέλο προτείνει ότι η μετάφραση δεν αναστέλλεται, αλλά μάλλον η εκκολαπτόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα διασπάται ταυτόχρονα με τη μετάφραση. Η υποθετική πρωτεάση είναι άγνωστη.

(C-E) Μηχανισμοί κατά την έναρξη: Τα miRNAs επεμβαίνουν σε ένα πολύ πρώιμο στάδιο της μετάφρασης, πριν από την επιμήκυνση:

(C) Οι πρωτεΐνες Αργοναύτες ανταγωνίζονται με την eIF4E για τη σύνδεση με το κάλυμμα.

(D) Οι πρωτεΐνες Αργοναύτες προσλαμβάνουν την eIF6, η οποία εμποδίζει τη μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα να συνδεθεί με τη μικρή υπομονάδα.

(E) Οι πρωτεΐνες Αργοναύτες εμποδίζουν το σχηματισμό κλειστού βρόγχου mRNA με έναν ασαφή μηχανισμό που περιλαμβάνει αποαδενυλίωση. (Ana Eulalio, 2008)

Κάποια από τα mRNAs που συνδέονται στο miRISC μεταφέρονται στα P-bodies (Zhonghan Li & Tariq M. Rana, 2014). Τα P-bodies αποκλείουν τα συστατικά του ριβοσώματος και μπορεί για αυτό να χρησιμεύουν ως θέσεις αποθήκευσης mRNAs που δε μεταφράζονται. Αρκετές πρωτεΐνες που βρίσκονται στα P-bodies (GW182, Dcp1/Dcp2 decapping complex και η RCK/p54 ελικάση) μπορούν και συνδέονται στις πρωτεΐνες Αργοναύτες, και αυτή η αλληλεπίδραση προκαλεί μεταφραστική καταστολή.

Ωστόσο, εξακολουθούν να υπάρχουν αμφιβολίες πάνω στη σημασία των P-bodies στην καταστολή. Διαταράσσοντας τα P-bodies δεν επηρεάστηκε ο βαθμός μεταφραστικής καταστολής, και επομένως ο εντοπισμός των P-bodies μπορεί να είναι συνέπεια της καταστολής και όχι αιτία της. Επιπλέον, η καταστολή και ο εντοπισμός των P-σώματος είναι αντιστρεπτά, υποδεικνύοντας ότι οι τα P-bodies μπορεί να χρησιμεύουν ως χώροι προσωρινής αποθήκευσης μεταφραστικά κατεσταλμένων mRNAs. (Natascha Bushati and Stephen M. Cohen, 2007)

## 2. Διαμεσολαβούμενη από miRNA αποικοδόμηση mRNA (F στην εικόνα)

Τα miRNAs προκαλούν αποαδενυλίωση που ακολουθείται από απομάκρυνση του καλύμματος. Στην εικόνα φαίνονται οι πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένου του μείζονος συμπλέγματος αποαδενυλίωσης (CAF1, CCR4, και το σύμπλοκο NOT), του ενζύματος απομάκρυνσης του καλύμματος DCP2 και πολλών ενεργοποιητών της αποβολής του καλύμματος. (Η αποικοδόμηση του mRNA θα μπορούσε να είναι ένας ανεξάρτητος μηχανισμός σίγησης, ή συνέπεια της μεταφραστικής καταστολής, ανεξάρτητα από το αν η καταστολή συμβαίνει κατά την έναρξη ή μετά την έναρξη της μετάφρασης). Το RISC σύμπλοκο εμφανίζεται απλουστευμένο να περιλαμβάνει μια πρωτεΐνη Αργοναύτη (κίτρινο) και το GW182 (πράσινο). Το mRNA αντιπροσωπεύεται σε μια διαμόρφωση κλειστού βρόχου που επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ της PABPC (κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που συνδέεται στην poly-(A) ουρά) και της eIF4G (πρωτεΐνη που είναι δεσμευμένη στην κυτταροπλασματική πρωτεΐνη eIF4E που με τη σειρά είναι συνδεδεμένη στο κάλυμμα). (Ana Eulalio, 2008)

## Φυσιολογικός ρόλος των microRNA

Τα MIRs έχουν ρόλους που αφορούν: την ανάπτυξη, τον κυτταρικό θάνατο, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την αιμοποίηση και τη διαμόρφωση του

νευρικού συστήματος (Ambros, 2004) και για αυτό οι πολυμορφισμοί έχουν σχετιστεί με ασθένειες.

### Ο ρόλος των miRNAs στην ανάπτυξη

Στα έμβρυα των θηλαστικών οι δύο πρώτες αποφάσεις της κυτταρικής τύχης δίνουν τρεις διαφορετικές κυτταρικές γραμμές: την εμβρυονική, την επιβλάστη και δύο εξωεμβρυϊκές, την τροφοβλάστη και το αρχέγονο ενδόδερμα. Τα miRNAs είναι απαραίτητα για την πρώιμη ανάπτυξη, αλλά δεν είναι γνωστό εάν χρησιμοποιούνται με τον ίδιο τρόπο σε αυτές τις τρεις κυτταρικές σειρές. Στην πολυδύναμη επιβλάστη τα MIRs αναστέλλουν την απόπτωση αναστέλλοντας την έκφραση της προαποπτωτική πρωτεΐνη Bcl2l11 (Bim), αλλά παίζουν μικρό ρόλο στην έναρξη της γαστριδίωσης. Αντίθετα, στο τροφοεκτόδερμα τα microRNAs διατηρούν τα βλαστικά κύτταρα της τροφοβλάστης αναστέλλοντας την έκφραση των Cdkn1a (p21) και Cdkn1c (P57), και στο πρώιμο ενδόδερμα αποτρέπουν εμποδίζουν τη διαφοροποίηση διατηρώντας τη ERK1/2 φωσφορυλίωση μέσω παρεμπόδισης της έκφρασης Mark αναστολέων (Thomas Spruce, 2010).

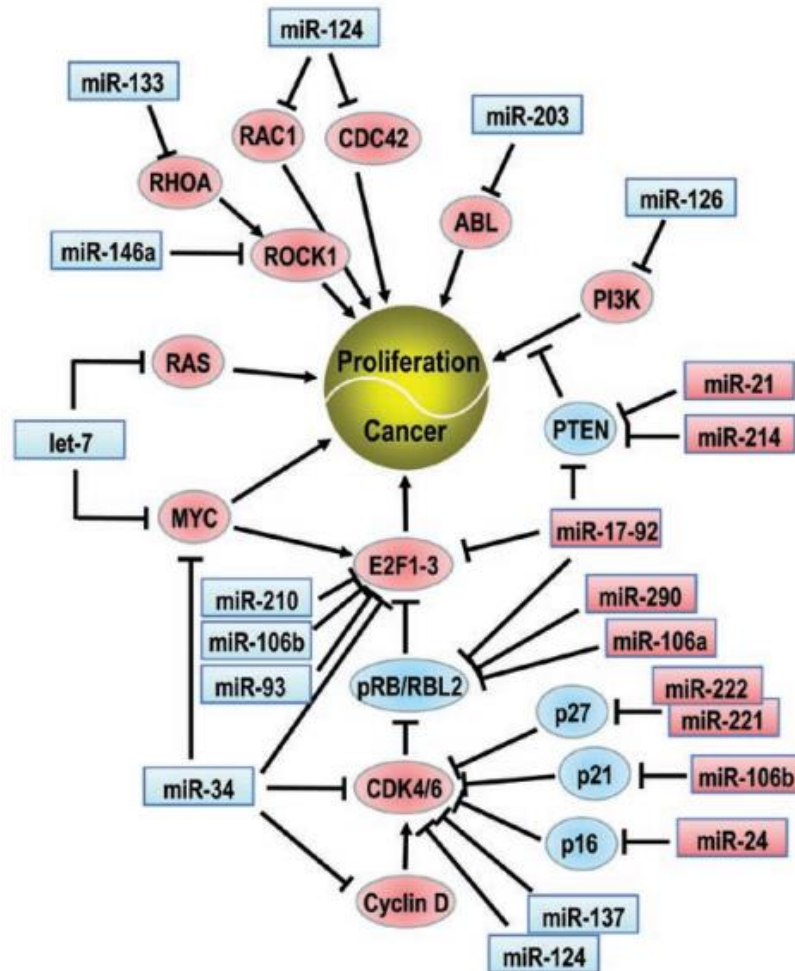
### Ο ρόλος των miRNAs στον κυτταρικό θάνατο

Τα miRNAs ελέγχουν τον κυτταρικό θάνατο είτε προάγοντάς τον είτε καταστέλλοντάς τον. Τα miRNAs ως αντιαποπτωτικοί παράγοντες στοχεύουν σε προαποπτωτικά mRNAs ή σε θετικούς ρυθμιστές των προαποπτωτικών mRNAs. Από την άλλη, ως προαποπτωτικοί παράγοντες τα MIRs στοχεύουν σε αντιαποπτωτικά mRNAs ή σε θετικούς ρυθμιστές αντιαποπτωτικών mRNAs. (Raquel T. Lima, 2010)

### Ο ρόλος των miRNAs στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Αυτός τους ο ρόλος φαίνεται πολύ καλά στην παρακάτω εικόνα:





Έλεγχος αντιπροσωπευτικών ρυθμιστών των κύριων οδών πολλαπλασιασμού από τα MIRs. (María José Bueno, 2008)

## Πολυμορφισμοί των miRNAs

Οι πολυμορφισμοί στα pre-miRNAs θα μπορούσε να είναι μια από τις αιτίες του διαταραγμένου προτύπου έκφρασης των miRNAs. Κυρίως σημειακές μεταλλαγές (SNPs) στην 3' UTR του pre-miRNA είναι πιθανόν να αλλάξουν τον τρόπο λειτουργίας του miRNA, δηλαδή να αλλάξουν τη διαδικασία αποαδενυλίωσης και τις ρυθμιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεΐνης και mRNA και ως αποτέλεσμα αλλάζουν τη σταθερότητα και τη μετάφραση των mRNA-στόχων. (Bartel, MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions, 2009)

## Ρόλος των miRNAs σε ασθένειες

Είδαμε παραπάνω ότι τα microRNAs φυσιολογικά συμμετέχουν στη ρύθμιση ποικίλων διαδικασιών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι πολυμορφισμοί τους να συσχετίζονται με πολλές ασθένειες. Μερικές από αυτές είναι: διάφοροι τύποι καρκίνου (Brid M. Ryan, 2010), η στεφανιαία νόσος (Hong Zhi, 2011), οι αυτόματες αποβολές (Young Joo Jeona, 2012), ο διαβήτης τύπου II (Ke Lv, 2008) ορισμένες νευρολογικές διαταραχές (Peter T. Nelson, 2008), η μυϊκή δυστροφία (Davide Cacchiarelli, 2011) κ.α. Οι πολυμορφισμοί των miRNAs δε σχετίζονται μόνο με την εμφάνιση μιας ασθένειας, αλλά και με την έκβαση της ασθένειας. Δηλαδή κάποιοι πολυμορφισμοί έχουν δείξει συσχέτιση με θετική έκβαση της ασθένειας και άλλοι με αρνητική.

## miRNAs και καρκίνος

Μέχρι σήμερα, miRNAs έχουν συνδεθεί με την αιτιολογία, την εξέλιξη και την πρόγνωση του καρκίνου και με τα προφίλ έκφρασης των miRNAs μπορούμε να ταυτοποιήσουμε τους τύπους καρκίνου. Μπορούν να λειτουργήσουν ως ογκοκατασταλτικά ή ως ογκογονίδια. Επίσης, κάποια έχουν διπλό ρόλο, ογκογόνο και κατασταλτικό, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου. (Brid M. Ryan, 2010)

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται ορισμένα από τα miRNAs που έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση διαφόρων τύπων καρκίνου:

**Table 1** MiRNA-associated SNPs in various cancers

Disease	miRNA	SNP	Risk allele	Target gene	SNP in
Colorectal cancer	miR-337 miR-582 miR-200a* miR-184 miR-212	rs17281995	C	CD86	Target site
Colorectal cancer	miR-618 miR-612	rs1051690	A	INSR	Target site
Lung cancer	let-7 miR-196a2	rs61764370 rs11614913	G T (Chinese population)	KRAS	KRAS 3' UTR pre-miR
Papillary thyroid carcinoma	miR-221/222 miR-146a	rs17084733 rs2910164	A GC (heterozygous genotype)	KIT	KIT 3' UTR Pre-miR-146a
Hepatocellular carcinoma	miR-146a	rs2910164	G	RAF1	MiRNA gene
Breast cancer	miR-196a2 hsa-mir-499	rs11614913 rs3746444	C (Chinese population) G		Pre-miR Pre-miR
Oesophageal cancer	miR-423	rs6505162	C		Pre-miR

miRNA, microRNA; SNP, single nucleotide polymorphism; UTR, untranslated region.

(T Paranjape, 2009)

### miRNAs στις αυτόματες αποβολές

Αυτόματη αποβολή είναι ο φυσικός θάνατος του εμβρύου πριν να είναι σε θέση να επιβιώσει ανεξάρτητα (Lippincott Williams & Wilkins, 2012). Οι αιτίες είναι διάφορες: γενετικές, ανατομία της μήτρας, ορμονικές ανωμαλίες, λοιμώξεις αναπαραγωγικού συστήματος και ανοσολογικές (απόρριψη των ιστών). Αποβολή που προκαλείται από επεμβατική προγεννητική διάγνωση (βιοψία χοριακών λαχνών (CVS) και η αμνιοκέντηση) είναι σπάνια (περίπου 1%) (Tabor A, 2010). Σε ηλικία κάτω των 35 ο κίνδυνος είναι περίπου 10%, ενώ είναι περίπου 45% σε άτομα ηλικίας άνω των 40 (Lippincott Williams & Wilkins, 2012). Ο κίνδυνος αρχίζει να αυξάνεται περίπου στην ηλικία των 30 (<http://www.nichd.nih.gov>, 2012). Περίπου το 80% των αποβολών συμβαίνουν στο οι πρώτες 12 εβδομάδες της εγκυμοσύνης (το πρώτο τρίμηνο) (Lippincott Williams & Wilkins, 2012).

Έχει αποδειχθεί ότι τα miRNAs έχουν κρίσιμο ρυθμιστικό ρόλο στην ενδομητρίωση, στην προεκλαμψία, στη στειρότητας και σε άλλες ασθένειες του αναπαραγωγικού συστήματος (Fulu Dong, Yuan Zhang<sup>1</sup>, Fei Xia, Yi Yang, Sidong Xiong, Liping Jin and Jinping Zhang, 2014). Μερικά miRNAs που έχουν αποδεδειγμένη συσχέτιση με τις αυτόματες αποβολές είναι τα:

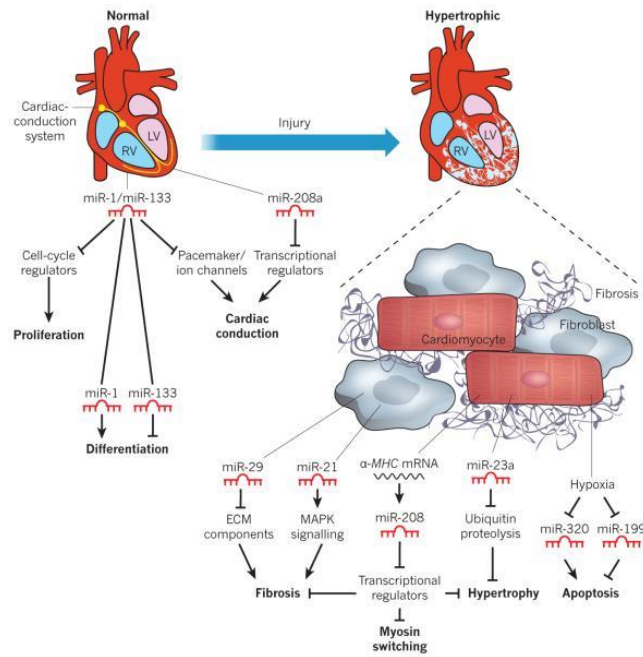
- miR-146a rs2910164 C→G,

- miR-149 rs2292832 T→C,
- miR-196a2 rs11614913 T→C,
- miR-499 rs3746444 A→G (Farah Parveen and Suraksha Agrawal, 2014)

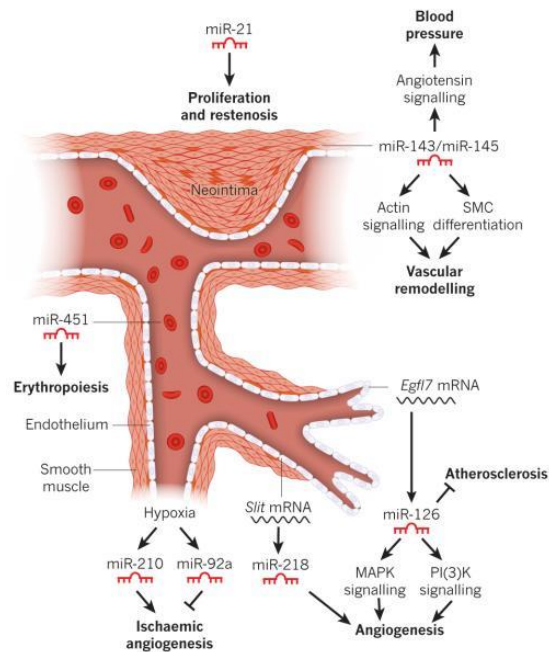
### miRNAs και Καρδιακά γενικά

Τα microRNAs έχουν εξέχοντα ρόλο στην καρδιαγγειακή βιολογία, ο οποίος αντικατοπτρίζει πιθανώς την ευαισθησία του καρδιαγγειακού συστήματος σε σχετικά λεπτές διαταραχές στην έκφραση γονιδίων, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές και συχνά μοιραίες ανωμαλίες ( Eric M. Small and Eric N. Olson, 2011). Στο καρδιαγγειακό σύστημα, τα miRNAs δεν είναι σημαντικά μόνο για την καρδιακή και την αγγειακή ανάπτυξη, αλλά επίσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της καρδιακής, όπως στην αρρυθμία, την ισχαιμία και τη στεφανιαία αθηρογένεση (Hong Zhi, 2011).

Ο σχηματισμός της καρδιάς απαιτεί ακριβείς και πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφόρων τύπων κυττάρων από διάφορες γενεαλογίες. Συγκεκριμένα miRNAs είναι άφθονα σε συγκεκριμένους τύπους καρδιακών κυττάρων και σε μερικές περιπτώσεις, έχουν βρεθεί να συμμετάσχουν στην προδιαγραφή της ταυτότητας των κυττάρων. Πειράματα έχουν δείξει συνεισφορά των MIRs σε αναπτυξιακές διεργασίες όπως: η διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων, τον πολλαπλασιασμό των καρδιομυοκυττάρων, τη συσταλτικότητα, τη ρύθμιση των διαύλων ιόντων και την καρδιακή αγωγιμότητα.



Λειτουργικός ρόλος των miRNAs στη φυσιολογική και στην παθολογική καρδιά ( Eric M. Small and Eric N. Olson, 2011)



Ρόλος των miRNAs στο αγγειακό σύστημα ( Eric M. Small and Eric N. Olson, 2011)

## miRNAs και Στεφανιαία Νόσος

Όσον αφορά τη στεφανιαία νόσο συγκεκριμένα, τα MIRs που σχετίζονται είναι:

miRNA	Αύξηση/Μείωση σε άτομα με Στεφανιαία Νόσο	Εντοπισμός	Λειτουργία
miR-1	Υπερεκφράζεται (Zhang, 2008)	Στους μυς (Maegdefessel, 2014)	
miR-17	μειώνεται σημαντικά (Stephan Fichtlscherer, 2010)	Ενδοθηλιακά κύτταρα (Stephan Fichtlscherer, 2010)	
miR-19a	Μειώνεται (Ali Sheikh Sayed, 2014)		
miR-21			μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργία και τη μετανάστευση των αγγειογόνων προγονικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της ασθένειας της Στεφανιαίας νόσου ( Eric M. Small and Eric N. Olson, 2011)
miR-29a	Μειώνεται (Ali Sheikh Sayed, 2014)		
miR-30e-5p	Μειώνεται (Ali Sheikh Sayed, 2014)		
miR-92a	μειώνεται σημαντικά (Stephan Fichtlscherer, 2010)	Ενδοθηλιακά κύτταρα (Stephan Fichtlscherer, 2010)	Αγγειογένεση (Angelika Bonauer, 2009)

miR-106b/25 cluster			βιοδείκτης για την ταυτοποίηση ευπαθών ασθενών με Στεφανιαία νόσο (Salvatore De Rosa, 2014)
miR-126	μειώνεται σημαντικά (Stephan Fichtlscherer, 2010)	Ενδοθηλιακά κύτταρα (Stephan Fichtlscherer, 2010)	Αγγειογένεση σε άτομα με Στεφανιαία νόσο (van Solingen, 2009)
miR-133a	Τείνουν να είναι υψηλότερα (Stephan Fichtlscherer, 2010)	Καρδιακοί μυς (Stephan Fichtlscherer, 2010)	
miR-135	αυξάνεται (κατά πέντε φορές) (Ali Sheikh Sayed, 2014)		
miR-145	μειώνεται (Stephan Fichtlscherer, 2010)	Λείοι μυς (Stephan Fichtlscherer, 2010)	
miR-147	Μειώνεται (κατά 4 φορές) (Ali Sheikh Sayed, 2014)		
miR-150	Μειώνεται (Ali Sheikh Sayed, 2014)		
miR-155	μειώνεται σημαντικά (Stephan Fichtlscherer, 2010)		Σχετίζεται με τη φλεγμονή (Stephan Fichtlscherer, 2010)
miR-181	Μειώνεται (Ali Sheikh Sayed, 2014)		
miR-197	Διαγνωστική αξία για τη νόσο μυς (Maegdefessel, 2014)		
miR-	Τείνουν να είναι	Καρδιακοί μυς	

208a	υψηλότερα (Stephan Fichtlscherer, 2010)	(Stephan Fichtlscherer, 2010)	
miR-222	Μειώνεται (Ali Sheikh Sayed, 2014)		
miR-340	Αυξάνονται (Salvatore De Rosa, 2014)	Αιμοπετάλια νεαρών ασθενών με Στεφανιαία νόσο (Salvatore De Rosa, 2014)	
miR-342	Μειώνεται (Ali Sheikh Sayed, 2014)		
miR-378	Μειώνεται (Ali Sheikh Sayed, 2014)		
miR-451			βιοδείκτης για την ταυτοποίηση ευπαθών ασθενών με Στεφανιαία νόσο (Salvatore De Rosa, 2014)
miR-499		Στους μυς (Maegdefessel, 2014)	Δείκτης της σοβαρότητας της νόσου μυς (Maegdefessel, 2014)
miR-584	Μειώνεται (Ali Sheikh Sayed, 2014)		
miR-624	Αυξάνονται (Salvatore De Rosa, 2014)	Αιμοπετάλια νεαρών ασθενών με Στεφανιαία νόσο (Salvatore De Rosa, 2014)	



miRs που αυξάνονται ή μειώνονται και σχετίζονται με την εμφάνιση της Στεφανιαίας νόσου

microRNA	Πολυμορφισμός	Γονότυπος ή αλληλόμορφο	Τύπος συσχέτισης
miR-1	rs9548934 C>T	CT	34% μείωση κινδύνου CAD (Lina Wang, 2014)
		CT+TT μαζί	26% μείωση κινδύνου CAD (Lina Wang, 2014)
			49% μείωση μειζόνων ανεπιθύμητων καρδιαγγειακών επεισοδίων σε ασθενής με CAD (Lina Wang, 2014)
TT	76% μείωση μειζόνων ανεπιθύμητων καρδιαγγειακών επεισοδίων σε ασθενής με CAD (Lina Wang, 2014)		
mir-196a2*	rs11614913 T > C	CC+CT μαζί	Αυξημένος κίνδυνος καρδιαγγειακού επεισοδίου σε αυτά τα άτομα με CAD σε σχέση με άτομα με CAD με γονότυπο TT (Hong Zhi, 2011)
			Κακός προγνωστικός παράγοντας σε αυτά τα άτομα με CAD σε σχέση με άτομα με CAD με γονότυπο TT (Hong Zhi, 2011)
		CC	Κακός προγνωστικός παράγοντας σε αυτά τα άτομα με CAD σε σχέση με άτομα με CAD με γονότυπο TT (Hong Zhi, 2011) Αυξημένος κίνδυνος καρδιαγγειακού επεισοδίου σε αυτά τα άτομα με CAD σε σχέση με άτομα με CAD και γονοτύπους TT+CT μαζί (Hong Zhi, 2011)
miR-146a**	rs2910164 G>C	C	Αυξημένη πιθανότητας εμφάνισης CAD σε σχέση με τα άτομα με G στον κινέζικο πληθυσμό (Xing-dong Xiong, 2014)
		GC	Αυξημένη πιθανότητας εμφάνισης CAD σε σχέση με τα άτομα με GG στον κινέζικο πληθυσμό (Xing-dong Xiong, 2014)
		CC	Αυξημένη πιθανότητας εμφάνισης CAD σε σχέση με τα άτομα με GG στον κινέζικο πληθυσμό (Xing-dong Xiong, 2014)
		CC+GC μαζί	Αυξημένη πιθανότητας εμφάνισης CAD σε σχέση με τα άτομα με GG

			στον κινέζικο πληθυσμό (Xing-dong Xiong, 2014)
mir-499	rs3746444 A > G	GG	Αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης CAD σε σχέση με τα άτομα με AA (Hong Zhi, 2011)
*miR-196a2: Δεν έχει βρεθεί καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ υγιών και ασθενών (Xing-dong Xiong, 2014)			
**miR-146a: Δεν έχει βρεθεί συσχέτιση σε μελέτες που έχουν γίνει σε Ινδούς της Νότιας Αφρικής (Prithiksha Ramkaran, 2013)			
Πίνακας πολυμορφισμών των miRs που σχετίζονται με την εμφάνιση της Στεφανιαίας νόσου και την εξέλιξή της			

## MicroRNA-146

Το miR-146 είναι μια οικογένεια πρόδρομων microRNA που έχουν βρεθεί σε θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου. Αρχικά βρίσκεται σε μια πρόδρομη φουρκέτα, από την οποία αποκόπτεται με τη βοήθεια του ενζύμου Dicer ώστε να καταλήξει ως ώριμο microRNA με μήκος 22 νουκλεοτιδίων. Αυτή η αλληλουχία αλληλοεπιδρά με το RISC, το οποίο κάνει παρεμβολή RNA (RNAi).

### Λειτουργία του miR-146

Το miR-146 πιστεύεται ότι είναι μεσολαβητής της φλεγμονής μαζί με ένα άλλο microRNA, miR-155. Η έκφραση του miR-146 ρυθμίζεται θετικά από φλεγμονώδεις παράγοντες, όπως η ιντερλευκίνη-1 και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-άλφα. Το miR-146 ρυθμίζει αρνητικά μια σειρά από στόχους που εμπλέκονται ως επί το πλείστον σε μονοπάτια των υποδοχέων τύπου toll που επιφέρουν ως αποτέλεσμα απάντηση από κυτοκίνες, ως μέρος του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος. Το miR-146 συμμετέχει σε ένα σύστημα ανάδρασης ώστε να συντονίσει λεπτομερώς τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις.

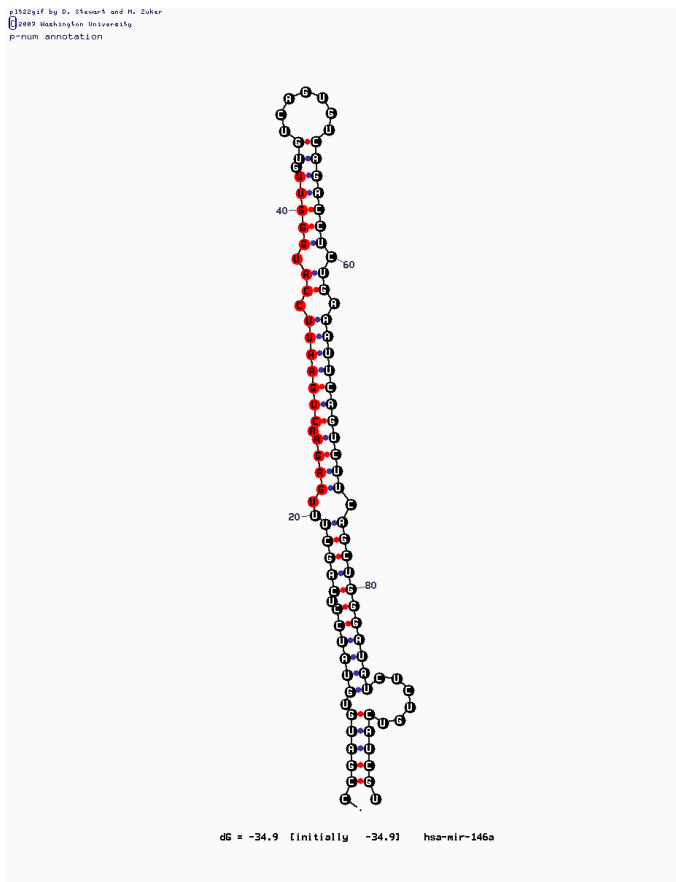
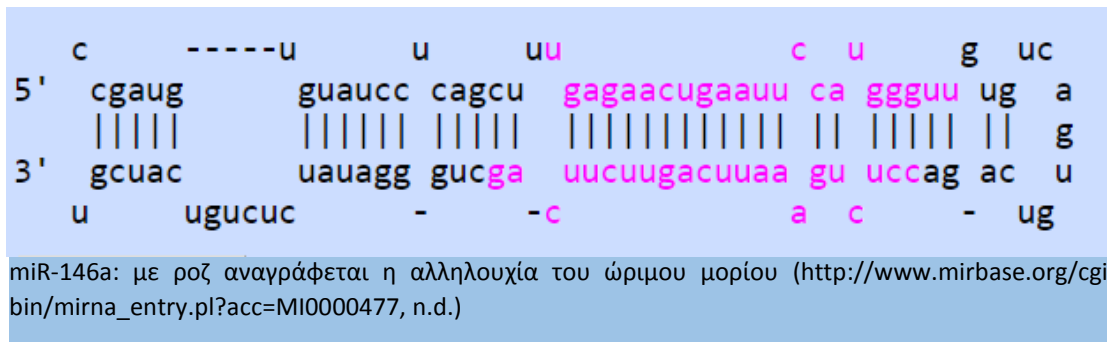
Υπάρχουν δύο miR-146, το miR-146a και το miR-146b, τα οποία διαφέρουν ελάχιστα στην αλληλουχία τους.

## miR-146a

Η αλληλουχία του μορίου σε fasta format είναι:

```
>hsa-mir-146a MI0000477
CCGAUGUGUAUCCUCAGC UUGAGAACUGAAUCCAUGGGUUGUGUCAGUGUCAGAC
CUCUGAAAUUCAGUUCUUCAGCUGGGAUAUCUCUGUCAUCGU
```

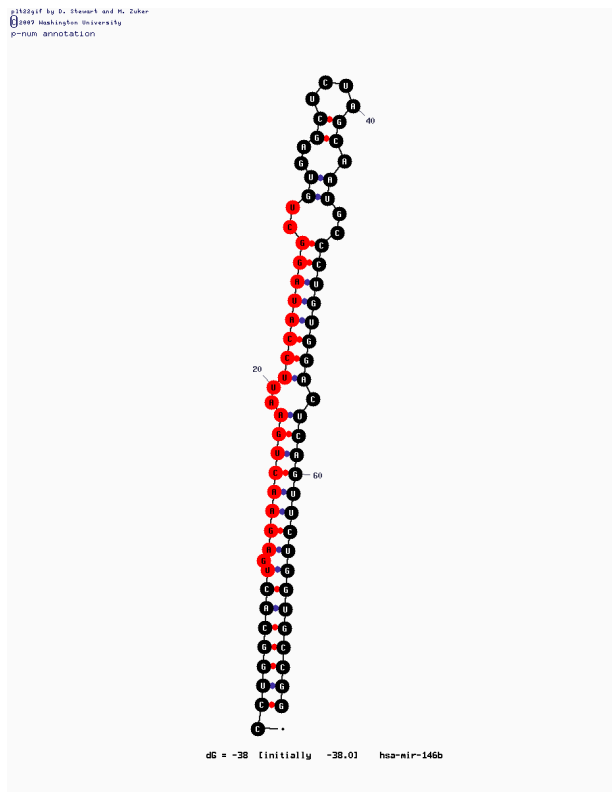
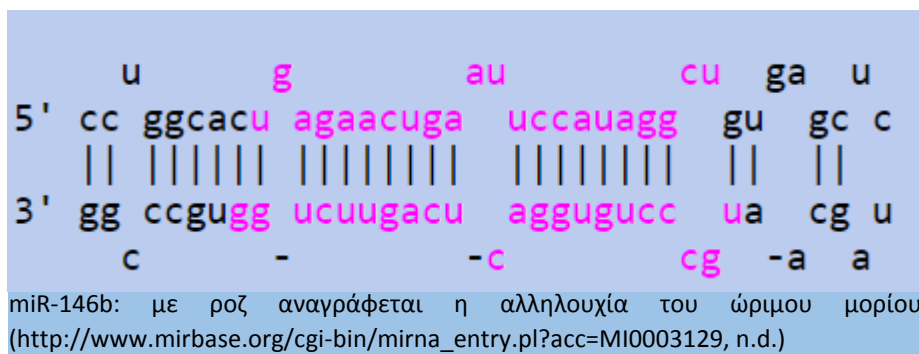
([http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna\\_entry.pl?acc=MI0000477](http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000477), n.d.)  
Βρίσκεται στη χρωμοσωμική θέση 5q33.3 ([http://www.genenames.org/cgi-bin/gene\\_symbol\\_report?q=data/hgnc\\_data.php&hgnc\\_id=HGNC:31533](http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?q=data/hgnc_data.php&hgnc_id=HGNC:31533), n.d.)



## miR-146b

Η αλληλουχία του μορίου σε fasta format είναι:

```
>hsa-mir-146b MI0003129
CCUGGCACUGAGAACUGAAUCCAUAGGCUGUGAGCUCUAGCAAUGCCCUGUGGACUCAGUUCUGGUGC
CCGG
(http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna\_entry.pl?acc=MI0003129, n.d.)
      Βρίσκεται      στη      χρωμοσωμική      θέση      10q24.32
(http://www.genenames.org/cgi-bin/gene\_symbol\_report?q=data/hgnc\_data.php&hgnc\_id=HGNC:32079, n.d.)
```



Δευτεροταγής δομή του miR-146b. Με κόκκινο φαίνεται η αλληλουχία του ώριμου μορίου. ([http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw/php/mirna\\_entry.php?acc=MI0000477](http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw/php/mirna_entry.php?acc=MI0000477), n.d.)



πολυμορφισμό του, που είναι και αλληλένδετα). Σε αυτή την παράγραφο θα ασχοληθούμε συγκεκριμένα με τον πολυμορφισμό rs2910164 του miR-146a.

Η μετατροπή του G σε C στον κλώνο επιβάτη οδηγεί μετατροπή του G:U ζεύγους σε C:U στο πρόδρομο μόριο και δημιουργία μια λιγότερο σταθερή δευτεροταγή δομή και άρα σε μείωση των επιπέδων miR-146a στο κύτταρο (Yuqing He Jie Yang, 2015) και σε λιγότερο αποτελεσματική αναστολή των γονιδίων στόχων, συμπεριλαμβανομένων των TRAF6, IRAK1 και PTC1. (L. Li, X.-P. Chen & Y.-J. Li. , 2010)

Μερικές από τις ασθένειες που επηρεάζει ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός είναι:

- καρκίνος του τραχήλου της μήτρας (σε Ασιάτες) (Cong Yuea, 2011),
- καρκίνος του στομάχου (σε Ασιάτες) (Fengying Zhou, 2012),
- καρκίνος του παχέος εντέρου (σε Ασιάτες) (σχετίζεται όχι μόνο με την εμφάνιση της ασθένειας, αλλά και με την εξέλιξη της νόσου) (YEE SOO CHAE, 2013),
- οισοφαγικό καρκίνωμα των πλακωδών κυττάρων (σε Ασιάτες) (Hong Guo, 2010),
- στοματικό ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (σε Ασιάτες) (συσχέτιση με την εξέλιξη της νόσου και όχι την εμφάνισή της) (Pei-Shi Hunga, 2012),
- ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα της κεφαλής και του αυχένα (HNSCC) (ZSUZSA ORSÓS, 2013)
- θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς (σε Καυκάσιους),
- καρκίνο του μαστού (σε ανάμεικτο πληθυσμό),
- καρκίνο των ωοθηκών (σε ανάμεικτο πληθυσμό),
- ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (σε Ασιάτες),
- προστατικό καρκίνο (σε Ασιάτες),
- γενικότερα την ογκογένεση (L. Li, X.-P. Chen & Y.-J. Li. , 2010)
- καρδιαγγειακά,
- αυτόματες αποβολές (από μη δημοσιευμένα αποτελέσματα του εργαστηρίου μας),

- αυτοάνοσα νοσήματα (Yuqing He Jie Yang, 2015)

miR-164a: Ο πολυμορφισμός rs2910164 και Αγγειακές νόσοι της καρδιάς και του εγκεφάλου

Σε αυτήν την παράγραφο θα αναλυθεί η συσχέτιση του πολυμορφισμού με τις αγγειακές νόσους αφού είναι και το θέμα που προσπαθεί να αναλύσει η παρούσα εργασία.

Ασθένεια	Γονότυπος ή αλληλόμορφο	Πληθυσμός	Αποτέλεσμα	Αποτελέσματα από μετα-ανάλυση	Αποτελ. από 2η μετα-ανάλυση		
Στεφανιαία νόσος (CAD)	GC	Ινδοί της Νότιας Αφρικής	Δεν υπάρχει συσχέτιση (Prithiksha Ramkaran, 2013)	Δεν υπάρχει συσχέτιση (Yuqing He Jie Yang, 2015)*	Τα άτομα που φέρουν GG, (GG+GC), G έχουν μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης Στεφανιαίας Νόσου (Mei-Hua Bao, 2015)*		
		Κινέζοι	Αύξηση προδιάθεσης (Xing-dong Xiong, 2014)				
		Καυκάσιοι	Δεν υπάρχει συσχέτιση (L. Hamann, 2014)	-			
	CC	Ινδοί της Νότιας Αφρικής	Δεν υπάρχει συσχέτιση (Prithiksha Ramkaran, 2013)	Μείωση κινδύνου (Yuqing He Jie Yang, 2015)*			
		Κινέζοι	Αύξηση προδιάθεσης (Xing-dong Xiong, 2014)				
		Καυκάσιοι	Δεν υπάρχει συσχέτιση (L. Hamann, 2014)	-			
	C	Ινδοί της Νότιας Αφρικής	Δεν υπάρχει συσχέτιση (Prithiksha Ramkaran, 2013)	Αύξηση προδιάθεσης (Yuqing He Jie Yang, 2015)*			
		Κινέζοι	Αύξηση προδιάθεσης (Xing-dong Xiong, 2014)				
		Καυκάσιοι	Δεν υπάρχει συσχέτιση (L. Hamann, 2014)	-			
			Κινέζοι	Δεν υπάρχει συσχέτιση (Huang S, 2015)			



Ισχαιμικό εγκεφαλικό (IS)	GC	Κινέζοι	Δεν υπάρχει συσχέτιση (Yun Liu, 2013)	Δεν υπάρχει συσχέτιση (Yuqing He Jie Yang, 2015)	Δεν υπάρχει συσχέτιση (Mei-Hua Bao, 2015)
		Κινέζοι Χαν	Δεν υπάρχει συσχέτιση (Ruixia Zhu, 2014)		
		Κορεάτες	Δεν υπάρχει συσχέτιση (Young Joo Jeon, 2012)		
	CC	Κινέζοι	Αύξηση προδιάθεσης (Huang S, 2015)	Δεν υπάρχει συσχέτιση (Yuqing He Jie Yang, 2015)	
		Κινέζοι	Δεν υπάρχει συσχέτιση (Yun Liu, 2013)		
		Κινέζοι Χαν	Δεν υπάρχει συσχέτιση (Ruixia Zhu, 2014)		
		Κορεάτες	Αύξηση προδιάθεσης (Young Joo Jeon, 2012)		
	GC+CC	Κινέζοι	Αύξηση προδιάθεσης (Huang S, 2015)	Δεν υπάρχει συσχέτιση (Yuqing He Jie Yang, 2015)	
		Κινέζοι	Δεν υπάρχει συσχέτιση (Yun Liu, 2013)		
		Κινέζοι Χαν	Δεν υπάρχει συσχέτιση (Ruixia Zhu, 2014)		
		Κορεάτες	Δεν υπάρχει συσχέτιση (Young Joo Jeon, 2012)		
	CC (σε	Κινέζοι	Αύξηση προδιάθεσης (Huang S, 2015)		

	σύγκριση με GG+GC)	Κινέζοι Χαν	Δεν υπάρχει συσχέτιση (Ruixia Zhu, 2014)	Δεν υπάρχει συσχέτιση (Yuqing He Jie Yang, 2015)	
		Κορεάτες	Αύξηση προδιάθεσης (Young Joo Jeon, 2012)		
	C	Κινέζοι	Αύξηση προδιάθεσης (Huang S, 2015)	Δεν υπάρχει συσχέτιση (Yuqing He Jie Yang, 2015)	
		Κινέζοι	Δεν υπάρχει συσχέτιση (Yun Liu, 2013)		
		Κινέζοι Χαν	Δεν υπάρχει συσχέτιση (Ruixia Zhu, 2014)		
		Κορεάτες	Αύξηση προδιάθεσης (Young Joo Jeon, 2012)		
Συγγενής καρδιοπάθεια (CHD)	GC	Κινέζοι	Δεν υπάρχει συσχέτιση (Jing Xu, 2009)	Δεν υπάρχει συσχέτιση (Yuqing He Jie Yang, 2015)**	
	CC				
διατακτική καρδιομυοπάθεια (DCM)	GC	Κινέζοι Χαν	Δεν υπάρχει συσχέτιση (Zhou B, 2010)		
	CC				
Σιωπηλό εγκεφαλικό έμφραγμα (SBI)	GC	Κορεάτες	Δεν υπάρχει συσχέτιση (Young Joo Jeon, 2012)		
	CC	Κορεάτες	Δεν υπάρχει συσχέτιση (Young Joo Jeon, 2012)		
	C	Κορεάτες	Δεν υπάρχει συσχέτιση (Young Joo Jeon, 2012)		
	GC	Κινέζοι	Δεν υπάρχει συσχέτιση		

Έμφραγμα του μυοκαρδίου (MI)			(Cunrong Chen, 2014)		
	CC	Κινέζοι	Αύξηση προδιάθεσης (Cunrong Chen, 2014)		
Alzheimer (AD)	GC	Κινέζοι	Δεν υπάρχει συσχέτιση (Lili Cui, 2014)		
	CC	Κινέζοι	Δεν υπάρχει συσχέτιση (Lili Cui, 2014)		
	C	Κινέζοι	Δεν υπάρχει συσχέτιση (Lili Cui, 2014)		
Συνολικά για εγκεφαλικές αγγειακές νόσοι	GC	Κινέζοι, Κινέζοι Χαν, Κορεάτες		Δεν υπάρχει συσχέτιση (Yuqing He Jie Yang, 2015)	
	CC	Κινέζοι, Κινέζοι Χαν, Κορεάτες		Δεν υπάρχει συσχέτιση (Yuqing He Jie Yang, 2015)	
	CC+GC	Κινέζοι, Κινέζοι Χαν, Κορεάτες		Δεν υπάρχει συσχέτιση (Yuqing He Jie Yang, 2015)	
	CC (σε σχέση με GC + GG)	Κινέζοι, Κινέζοι Χαν, Κορεάτες		Δεν υπάρχει συσχέτιση (Yuqing He Jie Yang, 2015)	
	C	Κινέζοι, Κινέζοι Χαν, Κορεάτες		Δεν υπάρχει συσχέτιση (Yuqing He Jie Yang, 2015)	
Συνολικά καρδιαγγειακές νόσοι	GC	Κινέζοι, Κινέζοι Χαν, Κορεάτες, Ινδοί της Νότιας		Δεν υπάρχει συσχέτιση (Yuqing He Jie Yang, 2015)	

		Αφρικής			
	CC	Κινέζοι, Κινέζοι Χαν, Κορεάτες, Ινδοί της Νότιας Αφρικής		Μείωση κινδύνου (Yuqing He Jie Yang, 2015)	
	CC+GC	Κινέζοι, Κινέζοι Χαν, Κορεάτες, Ινδοί της Νότιας Αφρικής		Δεν υπάρχει συσχέτιση (Yuqing He Jie Yang, 2015)	
	CC (σε σχέση με GC + GG)	Κινέζοι, Κινέζοι Χαν, Κορεάτες, Ινδοί της Νότιας Αφρικής		Δεν υπάρχει συσχέτιση (Yuqing He Jie Yang, 2015)	
	C	Κινέζοι, Κινέζοι Χαν, Κορεάτες, Ινδοί της Νότιας Αφρικής		Αύξηση προδιάθεση ς (Yuqing He Jie Yang, 2015)	
Συνολικά καρδιακές και εγκεφαλικές αγγειακές νόσοι (CCDs)	GC	Κινέζοι, Κινέζοι Χαν, Κορεάτες, Ινδοί της Νότιας Αφρικής		Δεν υπάρχει συσχέτιση (Yuqing He Jie Yang, 2015)	
	CC	Κινέζοι, Κινέζοι Χαν, Κορεάτες, Ινδοί της Νότιας Αφρικής		Δεν υπάρχει συσχέτιση (Yuqing He Jie Yang, 2015)	
		Κινέζοι, Κινέζοι		Δεν υπάρχει	

	CC+GC	Χαν, Κορεάτες, Ινδοί της Νότιας Αφρικής		συσχέτιση (Yuqing He Jie Yang, 2015)	
	CC (σε σχέση με GC + GG)	Κινέζοι, Κινέζοι Χαν, Κορεάτες, Ινδοί της Νότιας Αφρικής		Δεν υπάρχει συσχέτιση (Yuqing He Jie Yang, 2015)	
	C	Κινέζοι, Κινέζοι Χαν, Κορεάτες, Ινδοί της Νότιας Αφρικής		Δεν υπάρχει συσχέτιση (Yuqing He Jie Yang, 2015)	
<p>*Στη μετα-ανάλυση χρησιμοποιήθηκε άλλη μια έρευνα (Chen and Wu, 2013) στην οποία δεν είχα πρόσβαση</p> <p>** Στη μετα-ανάλυση χρησιμοποιήθηκε άλλη μια έρευνα (Wang et al., 2013) στην οποία δεν είχα πρόσβαση</p>					

Από τη μια μετα-ανάλυση βρέθηκε ότι ο γονότυπος CC του πολυμορφισμού rs2910164 του miR-146a είναι προστατευτικός παράγοντας για τα καρδιαγγειακά για τον κινέζικο πληθυσμό, ενώ είναι παράγοντας κινδύνου για τους Κορεάτες και τους Ινδούς. Αυτό μπορεί να οφείλεται και στο γεγονός ότι οι διάφορες ομάδες πληθυσμών (άτομα από διαφορετικά έθνη) έχουν τελείως διαφορετικές γονοτυπικές και αλληλομορφικές συχνότητες. (Yuqing He Jie Yang, 2015). Από την άλλη μετα-ανάλυση βρέθηκε ότι τα άτομα που φέρουν GG, (GG+GC), G έχουν μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης Στεφανιαίας Νόσου (Mei-Hua Bao, 2015).

Μετά από εξέταση της μεταβολής της έκφρασης του miR-146a σε μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος σε ασθενείς με Στεφανιαία νόσο, φάνηκε ότι οι ασθενείς με σταθερή στηθάγχη έχουν μειωμένη έκφρασή του σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, αλλά ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο αυξημένη έκφρασή του. (L. Li, X.-P. Chen & Y.-J. Li. , 2010)

### *Εφαρμογές του miR-146*

Βλέποντας την πληθώρα των ασθενειών με τις οποίες συσχετίζεται το miR-146a είναι αναμενόμενο το γεγονός ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για την ανίχνευση προδιάθεσης για πολλές ασθένειες, αλλά και την πρόγνωση της εξέλιξης υπάρχουσας ασθένειας. Επίσης, το miR-146a μπορεί να χρησιμοποιηθεί και θεραπευτικά, αφού η ελάττωσή του εμπλέκεται στην εγρήγορση της απόκρισης του ανοσοποιητικού. ([http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna\\_entry.pl?acc=MI0000477](http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000477), n.d.)

# Πειραματικό Μέρος

## Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Πειραματική διαδικασία

### Σκοπός της διπλωματικής εργασίας

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της πιθανής συσχέτισης του πολυμορφισμού rs2910164 G>C του miR-146a με την εμφάνιση της Στεφανιαίας νόσου στον ελληνικό πληθυσμό.

### Συνοπτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε:

#### 1. Συλλογή δείγματος DNA

Για το σκοπό της εργασίας απομονώθηκε γενετικό υλικό από περιφερικό αίμα 282 ατόμων του ελληνικού πληθυσμού, συγκεκριμένα 156 ασθενών (διαγνωσμένων με στεφανιογραφία) και 126 υγιών. Τα άτομα δεν ήταν συγγενή μεταξύ τους. Η συλλογή του βιολογικού δείγματος έγινε από περιφερικό αίμα

#### 2. Επεξεργασία του δείγματος DNA

Ο πολυμορφισμός miR146a rs2910164 G>C μελετήθηκε με ενίσχυση του γονιδιακού τμήματος με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και χρήση κατάλληλων εκκινητών. Τα προϊόντα της PCR επωάστηκαν με το περιοριστικό ένζυμο Sac I και τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης και έγιναν ορατά μετά από παρατήρηση του πηκτώματος σε UV.

#### 3. Καταγραφή των γονοτυπικών συχνοτήτων

Πραγματοποιήθηκε καταγραφή των γονοτύπων των ατόμων και υπολογίστηκαν οι γονοτυπικές (GG, GC, CC) και αλληλομορφικές (G, C) συχνότητες.



#### 4. Στατιστική επεξεργασία

Έγινε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με τη μέθοδο του  $\chi^2$  προκειμένου να διαπιστωθεί αν υπάρχει συσχέτιση του πολυμορφισμού miR-146a rs2910164 G>C με την εμφάνιση Στεφανιαίας νόσου στον ελληνικό πληθυσμό.

### Πειραματικά στάδια

1. Απομόνωση του γενετικού υλικού από λευκά αιμοσφαίρια προερχόμενα από το περιφερικό αίμα των υπό μελέτη ατόμων.
2. Εφαρμογή αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης με σκοπό τον πολλαπλασιασμό του DNA τμήματος που μας ενδιαφέρει, άρα και της περιοχής που αναγνωρίζεται από την περιοριστική ενδονουκλεάση (pcr-RFLP).
3. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR, μετά από χρώση τους με βρωμιούχου αιθίδιο, σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%.
4. Παρατήρηση με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) και φωτογράφιση του αποτελέσματος ώστε να επαληθευτεί ο σωστός πολλαπλασιασμός της επιθυμητής αλληλουχίας.
5. Πέψη του προϊόντος με συγκεκριμένο περιοριστικό ένζυμο
6. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης, μετά από χρώση τους με βρωμιούχου αιθίδιο, σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%.
7. Παρατήρηση με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) και φωτογράφιση του αποτελέσματος.
8. Καταγραφή των γονοτύπων των ατόμων.
9. Υπολογισμός των γονοτυπικών και αλληλομορφικών συχνοτήτων.
10. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με ανάλυση  $\chi^2$ .

## Απομόνωση DNA από λευκοκύτταρα ολικού περιφερικού αίματος

Η απομόνωση του DNA έγινε από λευκά αιμοσφαίρια του περιφερικού αίματος με τη μέθοδο απομόνωσης DNA με kit (NucleoSpin Blood procedure).

Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατή η απομόνωση DNA από εμπύρνα κύτταρα ολικού αίματος, καλλιιεργειών, ορού, πλάσματος και άλλων σωματικών υγρών.

Υλικά και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν:

- Lysis Buffer B3
- Buffer BW
- Buffer B5
- Elution Buffer BE
- Πρωτεΐνάση K
- 96% διάλυμα αιθανόλης
- NucleoSpin® Blood collection Tubes
- Πιπέτες
- Tips
- Σωλήνες erpendorf
- Υδατόλουτρο
- Φυγόκεντρος
- Συσκευή Vortex

Πειραματική διαδικασία

### 1. Λύση

- Μεταφορά 200μl περιφερικού αίματος σε σωλήνες Eppendorf
- Προσθήκη σε κάθε σωλήνα 25μl πρωτεΐνάσης K και 200μl διαλύματος B3
- Ισχυρή ανάδευση σε Vortex

- Επώαση των σωλήνων στο υδατόλουτρο, στους 70°C για 15 λεπτά
- 2. Προσαρμογή συνθηκών πρόσδεσης του DNA**
- Προσθήκη 210μl αιθανόλης σε κάθε σωλήνα
  - Ισχυρό vortex
- 3. Πρόσδεση του DNA**
- Μεταφορά του περιεχομένου των σωλήνων Eppendorf σε NucleoSpin® Blood collection Tubes (σωλήνες συλλογής στους οποίους εμπεριέχονται στήλες με μεμβράνη)
  - Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11.000 στροφές
  - Απόρριψη του υπερκείμενου
  - Το DNA έχει προσδεθεί στη μεμβράνη της στήλης
- 4. Πλύσεις της μεμβράνης**
- Μεταφορά των εσωτερικών στηλών σε καινούργια NucleoSpin® Blood collection Tubes
  - Προσθήκη 500μl διαλύματος BW
  - Φυγοκέντρηση 1 λεπτό στις 11.000 στροφές
  - Τα NucleoSpin® Blood collection Tubes απορρίπτονται
  - Οι στήλες μεταφέρονται σε καινούργια NucleoSpin® Blood collection Tubes
  - Προστίθενται 600μl διαλύματος B5
  - Φυγοκέντρηση 1 λεπτό στις 11.000 στροφές
  - Απόρριψη υπερκείμενου
- 5. Στέγνωμα της μεμβράνης**
- Οι στήλες επανατοποθετούνται στα collection tubes

- Φυγοκέντρηση 1 λεπτό στις 11.000 στροφές
- Έχει απομακρυνθεί το υπόλοιπο της αιθανόλης

#### 6. Συλλογή του καθαρού DNA

- Οι στήλες τοποθετούνται σε νέους σωλήνες erpendorf
- Προσθήκη 100μl διάλυμα BE θερμοκρασίας 70°C
- Οι σωλήνες αφήνονται σε ηρεμία για 1 λεπτό
- Φυγοκέντρηση 1 λεπτό στις 11.000 στροφές
- Απόρριψη των στηλών

Στους σωλήνες erpendorf πλέον βρίσκεται απομονωμένο DNA χωρίς προσμίξεις.

### Μέθοδος Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης

Η PCR είναι μια επαναστατική μέθοδος που αναπτύχθηκε από τον Karry Mullis τη δεκαετία του 1980. Η τεχνική αυτή μας δίνει τη δυνατότητα να πολλαπλασιάσουμε με πολύ μεγάλη πιστότητα, πολύ γρήγορα και με πολύ μικρό οικονομικό κόστος μικρά τμήματα DNA. Αυτό είναι απαραίτητο αφού για να γίνει ανάλυση πολυμορφισμών πρέπει να έχουμε πολύ μεγάλες ποσότητες της επιθυμητής αλληλουχίας.

Η PCR εκμεταλλεύεται την ικανότητα της DNA πολυμεράσης να συνθέτει ένα νέο κλώνο DNA συμπληρωματικό προς τον παλιό κλώνο-εκμαγείο. Επειδή η DNA πολυμεράση μπορεί να προσθέσει ένα νέο νουκλεοτίδιο μόνο αν προϋπάρχει ένα 3'-OH άκρο, χρειάζεται εκκινητές (primers) μετά από τους οποίους μπορεί να προσθέσει το πρώτο νουκλεοτίδιο. Η απαίτηση αυτή δίνει στον ερευνητή τη δυνατότητα να οριοθετήσει την περιοχή που θέλει να χρησιμοποιήσει ως εκμαγείο. Στο τέλος της αντίδρασης PCR, η ειδική αλληλουχία θα συσσωρευτεί σε δισεκατομμύρια αντίγραφα. (ncbi, n.d.)

Σε γενικές γραμμές διαδικασία της PCR περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Αρχική αποδιάταξη

Το μείγμα θερμαίνεται αρχικά στους 94°C για περίπου 5 λεπτά ώστε να σπάσουν οι δεσμοί υδρογόνου και να καταστραφούν οι δευτεροταγείς και τριτοταγείς δομές και να ανοίξει η διπλή έλικα. Οι δύο μονόκλωνες αλυσίδες θα χρησιμοποιηθούν μετά ως μήτρες για την αντιγραφή.

2. Επαναλαμβανόμενος κύκλος των εξής τριών σταδίων (περίπου 35 φορές)

- I. Αποδιάταξη: Το μείγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 94°C για 1 λεπτό ώστε να διαχωριστούν οι δύο αλυσίδες του DNA και να αποτελέσουν πάλι εκμαγεία για τον επόμενο κύκλο σύνθεσης DNA.
- II. Υβριδοποίηση: Το διάλυμα ψύχεται στους 50-70°C για 1 περίπου λεπτό, ώστε να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές με τα άκρα της αλληλουχίας-στόχου. Η θερμοκρασία υβριδισμού εκκινητές μήκους περίπου 20 βάσεων είναι 2-3°C κάτω από το  $T_m$  τους. Το  $T_m$  υπολογίζεται θεωρητικά από τον τύπο:  $T_m=2(A+T)+4(G+C)$ .  
Η θερμοκρασία τήξης  $T_m$  ορίζεται ως η θερμοκρασία κατά την οποία πραγματοποιείται μετάβαση από το δίκλωνο DNA στο μονόκλωνο κατά 50%.
- III. Επιμήκυνση: Η DNA-πολυμεράση επεκτείνει του εκκινητές προχωρώντας με κατεύθυνση 5'→3'. Για να γίνει αυτό η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C, που είναι η βέλτιστη θερμοκρασία για την Taq πολυμεράση. Ο χρόνος επώασης σε αυτό το στάδιο είναι 1-3 λεπτά και εξαρτάται από το μέγεθος του DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε.

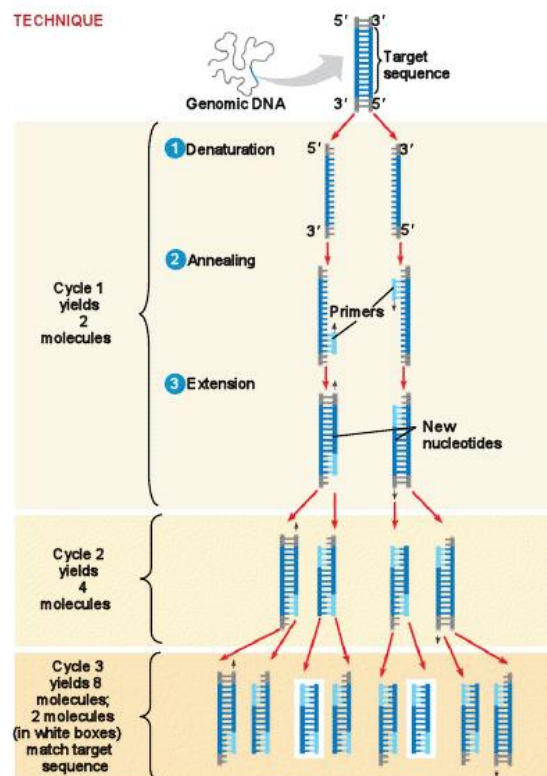
Αυτά τα στάδια οδηγούν σε μια αλυσιδωτή αντίδραση με την οποία παράγεται ένας εκθετικά αυξανόμενος πληθυσμός πανομοιότυπων μορίων DNA (Campbell, 2010).

### 3. Τελικό στάδιο

Στους 72°C για περίπου 10 λεπτά, ώστε όσα κομμάτια δεν έχουν προλάβει να ολοκληρώσουν την αντιγραφή να έχουν την ευκαιρία να το κάνουν σε αυτό το στάδιο.

### 4. Μετά το τέλος της PCR

Το μηχάνημα πέφτει στους 4 °C και παραμένει εκεί.



Τα βήματα της PCR. Παρατηρούμε ότι κατά τους δύο πρώτους κύκλους δεν έχουμε κανένα προϊόν επιθυμητού μεγέθους, αφού όλα αρχίζουν από το σημείο πρόσδεσης του εκκινητή και τελειώνουν εκεί που σταματά η δράση της DNA-pol. Στον τρίτο κύκλο από τις 8 αλυσίδες DNA που έχουμε, οι 2 είναι επιθυμητού μεγέθους. Μετά από 30 κύκλους το ποσοστό αυτό είναι πάνω από 99,99% (Campbell, 2010). Η θεωρητική απόδοση της PCR με βάση το παραπάνω είναι  $(2^{n-2}) \cdot \chi$ , όπου n είναι ο αριθμός των κύκλων και χ ο αριθμός των μορίων DNA στο αρχικό δείγμα.

Οι κύκλοι της PCR δε μπορούν να είναι άπειροι, μετά από κάποιο σημείο εμφανίζεται ένα πλατώ λόγω εξάντλησης των αντιδραστηρίων, δηλαδή ο αριθμός των μορίων σταματά να αυξάνεται.

Πιο αναλυτικά, τα απαραίτητα συστατικά της PCR είναι:

#### 1. DNA-εκμαγείο

Το δείγμα DNA που περιέχει την αλληλουχία-στόχο που θέλουμε να πολλαπλασιαστεί. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμη και σε μη καθαρό δείγμα, σε ελάχιστη ποσότητα DNA, αλλά και σε διασπασμένο DNA αρκεί η αλληλουχία στόχος να είναι ακέραια. Μπορεί η αλληλουχία των βάσεων να είναι άγνωστη, αλλά πρέπει οπωσδήποτε να γνωρίζουμε την αλληλουχία των βάσεων των πλευρικών περιοχών ώστε να κατασκευασθούν οι εκκινητές.

Το DNA που απαιτείται για την αντίδραση είναι 10-500ng. Όταν η επιθυμητή αλληλουχία υπάρχει πολλές φορές μέσα στο γονιδίωμα η ποσότητα DNA που απαιτείται είναι 10-100ng, ενώ όταν ο στόχος είναι μοναδική αλληλουχία αυτή η ποσότητα κυμαίνεται μεταξύ 100-500ng

#### 2. DNA πολυμεράση

Η DNA πολυμεράση είναι το ένζυμο της αντιγραφής, δηλαδή το ένζυμο που συνθέτει νέους κλώνους έχοντας ως εκμαγείο τους παλιούς. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη DNA πολυμεράση είναι η Taq. Η πολυμεράση αυτή απομονώθηκε από τον οργανισμό *Thermis aquaticus* (ncbi, n.d.) που ζει σε θερμές πηγές και άρα είναι ανθεκτική στις υψηλές θερμοκρασίες που εφαρμόζονται στην αρχή κάθε κύκλου της PCR (Campbell, 2010).

Στο εργαστήριο χρησιμοποιήσαμε την Taq πολυμεράση της εταιρίας KAPA. Η KAPA Taq βασίζεται στην απλή υπομονάδα, άγριου τύπου Taq DNA πολυμεράση του θερμόφιλου βακτηρίου *Thermis aquaticus*. Αυτή έχει ενεργότητα 5'→3' πολυμεράσης, 5'→3' εξωνουκλεάσης, αλλά όχι 3'→5' εξωνουκλεάσης. Το ένζυμο αυτό έχει ποσοστό σφάλματος 1 στα 2,2\*10<sup>5</sup> νουκλεοτίδια που ενσωματώνονται.

(<https://www.kapabiosystems.com/product-applications/products/pcr-2/kapa-taq-pcr-kits/>, n.d.)

### 3. Εκκινητές (primers)

Μικρά κομμάτια μονόκλωνου DNA (περίπου 20 νουκλεοτιδίων) τα οποία είναι συμπληρωματικά προς τα άκρα της αλληλουχίας στόχου. Η πολυμεράση αρχίζει τη σύνθεση νέου DNA από το άκρο του εκκινητή. Αυτό είναι λογικό γιατί η πολυμεράση σε όλους τους οργανισμούς χρειάζεται έναν RNA εκκινητή για να ξεκινήσει την αντιγραφή (εδώ βέβαια οι εκκινητές είναι DNA). Πέρα όμως από το ότι είναι απαραίτητοι οι εκκινητές, στη μέθοδο της PCR εκμεταλλευόμαστε αυτήν την ανάγκη ώστε να οριοθετήσουμε το τμήμα που θέλουμε πολλαπλασιαστεί.

Κάποια σημαντικά χαρακτηριστικά των εκκινητών είναι:

- Το μήκος τους. Είναι σημαντικό το μήκος των εκκινητών που θα επιλεγεί, διότι κάτω από κάποιο μέγεθος ενδέχεται να συνδεθούν με μη επιθυμητά τμήματα του DNA και να δώσουν μη ειδικά προϊόντα.
- Το ποσοστό G+C που θα επιλεγεί. Αυτό πρέπει να είναι αρκετά μεγάλο ώστε οι εκκινητές να είναι σταθεροί, αλλά να μην ξεπερνά κάποιο ποσοστό, γιατί επαναλαμβανόμενες δομές με υψηλό αυτό το ποσοστό μπορεί να δημιουργήσουν αναδιπλώσεις φορκέτας.
- Το 5' άκρο κάθε εκκινητή να μην είναι συμπληρωματικό με το 3' άκρο ούτε του ίδιου, ούτε του άλλου εκκινητή. Αυτό ώστε να μη δημιουργηθούν διμερή εκκινητών.

Οι primers που χρησιμοποιήσαμε εμείς έχουν τις εξής αλληλουχίες:

- rs2910164F (Forward) 5'-CAT GGG TTG TGT CAG TGT CAG AGG-3'
- rs2910164R (Reverse) 5'-TGC CTT CTG TCT CCA GTC TTC CAA -3'



#### 4. Νουκλεοτίδια (dNTPs)

Μεμονωμένες βάσεις (A, T, G και C), οι οποίες είναι ουσιαστικά τα «δομικά στοιχεία» για τους νέους κλώνους DNA. Οι συγκεντρώσεις μεταξύ των dATPs, dTTPs, dCTPs, dGTPs πρέπει να είναι ίσες. Συνήθως χρησιμοποιείται σε συγκεντρώσεις 20-200μΜ. Χαμηλότερες μπορεί να φτάνουν, ενώ μεγαλύτερες ελαττώνουν την ειδικότητα της αντίδρασης.

Η βέλτιστη συγκέντρωση των dNTPs εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως η συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου, η συγκέντρωση των primers, το μήκος των αντιγράφων του DNA και ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης.

#### 5. Buffer (ρυθμιστικό διάλυμα)

Κάθε ένζυμο συνοδεύεται με το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα που ρυθμίζει το pH ώστε να είναι κατάλληλο για τη δράση του. Τα περισσότερα ρυθμιστικά περιέχουν:

- 100 mM Tris-HCl, pH 8,3,
- 500 mM KCl και
- Προαιρετικά 15mM MgCl<sub>2</sub>

Το Taq buffer C της εταιρείας KAPA που χρησιμοποιήσαμε εμείς διευκολύνει τη συγκεκριμένη σύνδεση των εκκινητών στο DNA εκμαγείο και άρα έχει μεγαλύτερη απόδοση σε σχέση με τα παραδοσιακά Taq buffers και βελτιώνει την ενίσχυση περιοχών πλούσιων σε GC και AT

#### 6. MgCl<sub>2</sub>

Είναι η μορφή με την οποία εισάγονται στο διάλυμα τα απαραίτητα για την αντίδραση ιόντα Mg<sup>2+</sup>. Αυτά σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs και άρα διευκολύνουν την ενσωμάτωσή τους στη νεοσυντηθέμενη αλυσίδα του DNA. Επίσης, είναι απαραίτητα για τη δράση της Taq πολυμεράσης, αυξάνουν την T<sub>m</sub> του δίκλωνου μορίου DNA και επηρεάζουν την υβριδίαση των εκκινητών.

## 7. Νερό

Αυτό παρέχει το υγρό περιβάλλον ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση, είναι το μέσο μέσα στο οποίο αντιδρούν τα υπόλοιπα συστατικά. Το νερό που χρησιμοποιούμε είναι διπλά απεσταγμένο νερό και αποστειρωμένο.

Το πειραματικό πρωτόκολλο της PCR και παρασκευής των αντιδραστηρίων της

Πρωτόκολλο παρασκευής διαλύματος dNTPs

- Βάζουμε στον πάγο τα 4 σωληνάκια με τα dATPs, dTTPs, dCTPs, dGTPs, δις απεσταγμένο νερό και ένα eppendorf.
- Μέσα στο eppendorf μεταφέρουμε 10μl από κάθε τύπο dNTP και 460μl δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O (συνολικός όγκος 500μl)
- Ανάδευση με πολύ ήπιο vortex
- Χωρίζουμε το μείγμα σε δύο eppendorfs των 250μl.

Πρωτόκολλο παρασκευής διαλύματος εκκινητών

- Διαλυτοποίηση των εκκινητών που αρχικά βρίσκονται σε στερεή μορφή (οι αναλογίες εκκινητών-απεσταγμένου νερού ορίζονται από την εταιρεία παρασκευής τους)
- σε ένα eppendorf βάζουμε 10μl primer F και σε ένα άλλο eppendorf 10μl primer R
- Προσθέτουμε 190μl δις απεσταγμένο νερό σε κάθε eppendorf
- Αναδεύουμε με ήπιο vortex

## Πρωτόκολλο PCR

Κάθε erpendorf έχει τα εξής αντιδραστήρια:

Buffer C	5 μl
MgCl <sub>2</sub>	1,5 μl
dNTPs	0,5 μl
Primer F	1 μl
Primer R	1 μl
H <sub>2</sub> O	13,9 μl
Kapa Taq	0,1 μl
Δείγμα DNA	2 μl

Αναλυτικά τα βήματα που ακολουθήθηκαν:

- Αναδεύουμε στο Vortex τα δείγματα DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε με PCR
- Μεταφέρουμε 2μl από κάθε δείγμα σε καινούργια erpendorf
- Αναδεύουμε στο Vortex τα αντιδραστήρια Buffer C, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, Primer F, Primer R
- Φτιάχνουμε το master mix σε ένα καινούργιο erpendorf, βάζοντας τις ποσότητες Buffer C, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, Primer F, Primer R, H<sub>2</sub>O, Kapa Taq που αναφέρονται παραπάνω πολλαπλασιασμένες επί τον αριθμό των δειγμάτων συν 1
- Μεταφέρουμε 23μl master mix σε κάθε ένα από τα erpendorf που έχουμε προσθέσει τα 2μl DNA
- Έτσι έχουμε 25μl όγκο αντίδρασης σε κάθε ένα από τα erpendorf με το DNA και το master mix στο οποίο έχει περισσέψει (αφού έχουμε βάλει για ένα παραπάνω από ότι ήταν τα δείγματα). Αυτό θα χρησιμοποιηθεί ως τυφλό για την PCR.
- Τα erpendorf μπαίνουν στο μηχάνημα της PCR όπου πραγματοποιείται η αντίδραση σύμφωνα με τις συνθήκες του παρακάτω πίνακα:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	94 °C	5min
Αποδιάταξη	94 °C	45sec
Υβριδισμός	64 °C	45sec
Επιμήκυνση	72 °C	1min
Επανάληψη των τριών τελευταίων σταδίων 35 φορές		
Τελική επιμήκυνση	72 °C	7min
Παύση	4 °C	Για όσο τα αφήσουμε

Πρέπει να σημειωθεί ότι:

- η Kara Taq δε βγαίνει καθόλου από την κατάψυξη και ότι από τη στιγμή που θα μπει η κατάλληλη ποσότητα στο master mix θα πρέπει οι κινήσεις να είναι πολύ γρήγορες ώστε να μη χάσει τη δραστηκότητά της.
- Το DNA δείγμα αποθηκεύεται στο ψυγείο (περίπου 4°C) και βγαίνει μόνο κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας της PCR.
- Όλα τα υπόλοιπα αντιδραστήρια διατηρούνται στην κατάψυξη και βγαίνουν μόνο κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας της PCR. Πρέπει πριν τη χρήση τους να έχουν ξεπαγώσει πλήρως ώστε να είναι ομοιογενή και τα πάρουμε την κατάλληλη συγκέντρωση (προφανώς το τελευταίο δεν ισχύει για το νερό).

## Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα είναι μια μέθοδος διαχωρισμού και ανάλυσης μακρομορίων (DNA, RNA και πρωτεϊνών) και των θραυσμάτων τους, που στηρίζεται στο μέγεθος και το φορτίο τους.

Τα μόρια νουκλεϊκού οξέος (που είναι αρνητικά φορτισμένα λόγω των φωσφορικών ομάδων) διαχωρίζονται με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Το μέσο στο οποίο κινούνται είναι πήκτωμα αγαρόζης ή άλλες ουσίες. Τα μικρότερα μόρια

κινούνται γρηγορότερα και φτάνουν μακρύτερα από ότι τα μεγαλύτερα, διότι κινούνται πιο εύκολα μέσα από τους πόρους του πηκτώματος.

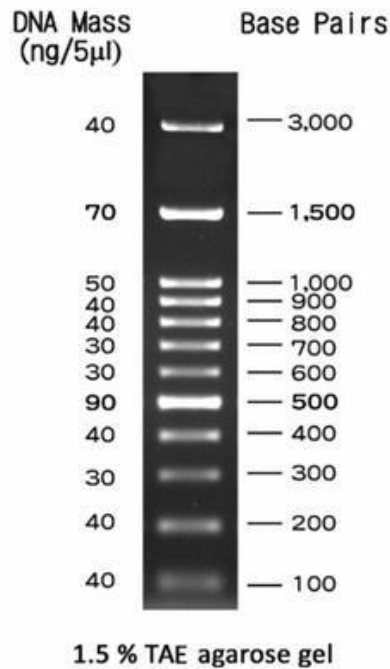
Οι πιο συνηθισμένοι τύποι πηκτώματος που χρησιμοποιούνται είναι αγαρόζης και πολυακρυλαμίδης. Η πολυακρυλαμίδη επειδή έχει μικρότερους πόρους από ότι η αγαρόζη χρησιμοποιείται κυρίως για πρωτεΐνες (έχουν μικρότερο μέγεθος από το αντίστοιχο DNA), όταν θέλουμε να διαχωρίσουμε μεταξύ τους αλυσίδες DNA που διαφέρουν κατά μια μόνο βάση (πικρότεροι πόροι προσδίδουν καλύτερη διαχωριστική ικανότητα) και όταν θέλουμε να διαχωρίσουμε μεταξύ τους μικρά DNA θραύσματα (5-500 bp). Όταν θέλουμε να διαχωρίσουμε μεγαλύτερα κομμάτια DNA (50-20,000 bp) απαιτούνται πιο μεγάλοι πόροι στο πήκτωμα για να γίνει διαχωρισμός και άρα χρησιμοποιείται πήκτωμα αγαρόζης.

Το πήκτωμα αγαρόζης αποτελείται από πυκνό δίκτυο ουδέτερων πολυσακχαριτών (επαναλαμβανόμενων μονάδων αγαρόζης), των οποίων οι αλυσίδες σχηματίζουν πόρους κατά το σχηματισμό του πηκτώματος. Το διάλυμα αγαρόζης πολυμερίζεται σε θερμοκρασία περίπου 100°C και πήζει σε θερμοκρασία μικρότερη των 45 °C.

Το δείγμα που φορτώνουμε στα πηγαδάκια του πηκτώματος πρέπει να είναι σημασμένο με μπλε χρωστική της οποίας η κύρια αρμοδιότητα είναι να βαρύνει το DNA και δευτερευόντως να το χρωματίσει.

Το πήκτωμα έχει μέσα βρωμιούχο αιθίδιο. Αυτό είναι απαραίτητο γιατί μπαίνει ανάμεσα στις έλικες του DNA και προκαλεί φθορισμό κάτω από υπεριώδες φως. Αν το DNA ήταν ευθυγραμμισμένο δεν θα μπορούσε να γίνει αυτή η παρεμβολή.

Για να καταλάβουμε το μέγεθος των DNA τμημάτων που θα δούμε μετά την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούμε ladder. Αυτός είναι ένα δείκτης που αποτελείται από γνωστού μεγέθους τμήματα DNA. Αυτός που χρησιμοποιήσαμε εμείς είναι ο 100bp DNA Ladder RTU της εταιρίας NIPPON genetics. Αυτός περιλαμβάνει θραύσματα 100-3.000 βάσεων.



Παράγοντες που επηρεάζουν την ταχύτητα μετακίνησης του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης:

1. Το μοριακό βάρος του DNA

Το γραμμικό, δίκλωνο DNA κινείται με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του log του αριθμού των ζευγών βάσεων τους. Τα πιο μεγάλα μόρια κινούνται πιο αργά λόγω μεγαλύτερης τριβής με τους πόρους του πηκτώματος από ότι τα μικρότερα.

2. Η συγκέντρωση της αγαρόζης

Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της αγαρόζης, τόσο πιο μικρή είναι η διάμετρος των πόρων της και άρα τόσο πιο μικρό είναι το μέγεθος του DNA μπορεί να διαχωριστεί ικανοποιητικά.

3. Η διαμόρφωση του DNA

Τα κυκλικά μόρια DNA τρέχουν υπερελικωμένα με μέσα στο πήκτωμα και άρα αλλάζει η ταχύτητα της μετακίνησής τους. Όταν χειριζόμαστε τέτοια μόρια είναι προτιμότερο να πέπτονται πρώτα με κατάλληλο ένζυμο ώστε να γίνονται πρώτα ευθύγραμμα.

#### 4. Από την τάση του ρεύματος

Όσο πιο μικρή η τάση που χρησιμοποιούμε τόσο πιο μικρή η ταχύτητα μετακίνησης του DNA.

Εμείς σε πρώτη φάση κάνουμε ηλεκτροφόρηση των PCR-products ώστε να ελέγξουμε αν πραγματοποιήθηκε όντως η αντίδραση PCR και ήταν καθαρή η αντίδραση (χωρίς μόλυνση).

### Πρωτόκολλο παρασκευής πηκτώματος αγαρόζης

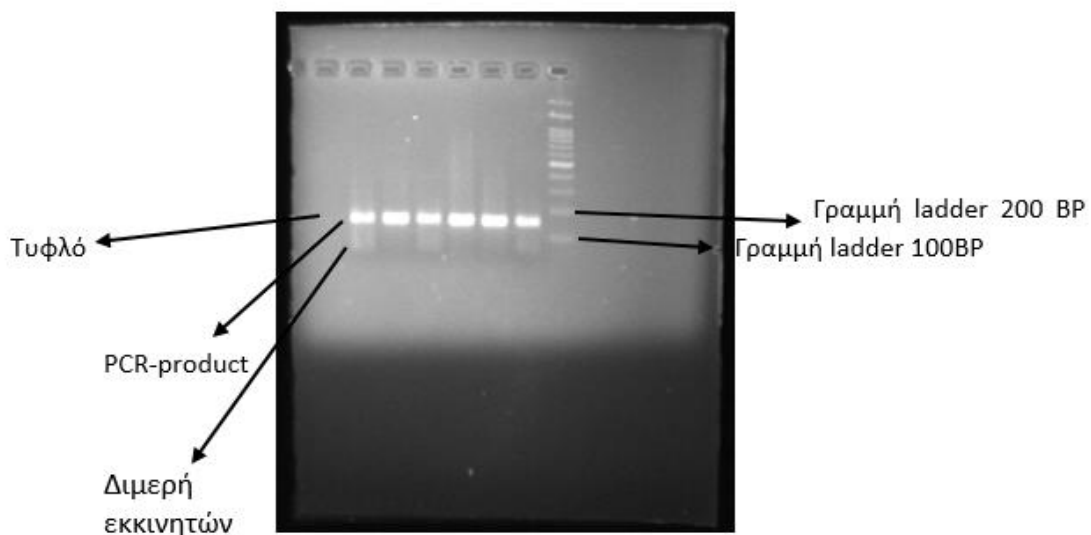
Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την Παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης είναι η εξής:

1. Ζυγίζουμε 1,5-1,6g αγαρόζης και τα τοποθετούμε σε καθαρή κωνική φιάλη
2. Σε ογκομετρικό σωλήνα των 100ml προσθέτουμε 10ml ρυθμιστικού διαλύματος PBE και 90ml απεσταγμένο νερό.
3. Αδειάζουμε το περιεχόμενο του ογκομετρικού κυλίνδρου στην κωνική φιάλη με την αγαρόζη
4. Αναδεύουμε με κυκλικές κινήσεις
5. Τοποθετούμε την κωνική φιάλη στο φούρνο μικροκυμάτων για 2 λεπτά
6. Συναρμολογούμε τη συσκευή της αγαρόζης (σκαφάκι) τοποθετώντας στα άκρα της χαρτοταινία και τα χτενάκια στις κατάλληλες θέσεις
7. Βγάζουμε την κωνική φιάλη από το φούρνο και μικροκυμάτων και κρυνώνουμε το διάλυμα κάτω από τη βρύση μέχρι να φτάσει περίπου στους 45°C
8. Προσθέτουμε 5,5ml βρωμιούχο αιθίδιο
9. Αναδεύουμε με κυκλικές κινήσεις

10. Αδειάζουμε το περιεχόμενο της κωνικής στη συσκευή αγαρόζης
  11. Αφήνουμε το διάλυμα να κρυώσει και να στερεοποιηθεί
  12. Αφαιρούμε τα χτενάκια από τη συσκευή
  13. Το πήκτωμα αγαρόζης 1,5% είναι έτοιμο να χρησιμοποιηθεί
- Πρέπει να σημειωθεί ότι η αποθήκευση του πηκτώματος γίνεται στους 4°C (στο ψυγείο)

### Πρωτόκολλο της ηλεκτροφόρησης των PCR-products

1. Το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης
  2. Σε κομμάτι parafilm αναμιγνύουμε 3μl μπλε χρωστικής με 3μl PCR-product από κάθε erpendorf.
  3. Φορτώνουμε τα 6μl μέσα στα πηγαδάκια του πηκτώματος
  4. Στο τελευταίο πηγαδάκι φορτώνουμε τον ladder
  5. Ρυθμίζουμε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης στα: 170 V, 100 A και 25 min
- Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα ακτινοβολείται με UV. Έτσι καθίστανται ορατές οι ζώνες του DNA. Η εικόνα φωτογραφίζεται και αποθηκεύεται.

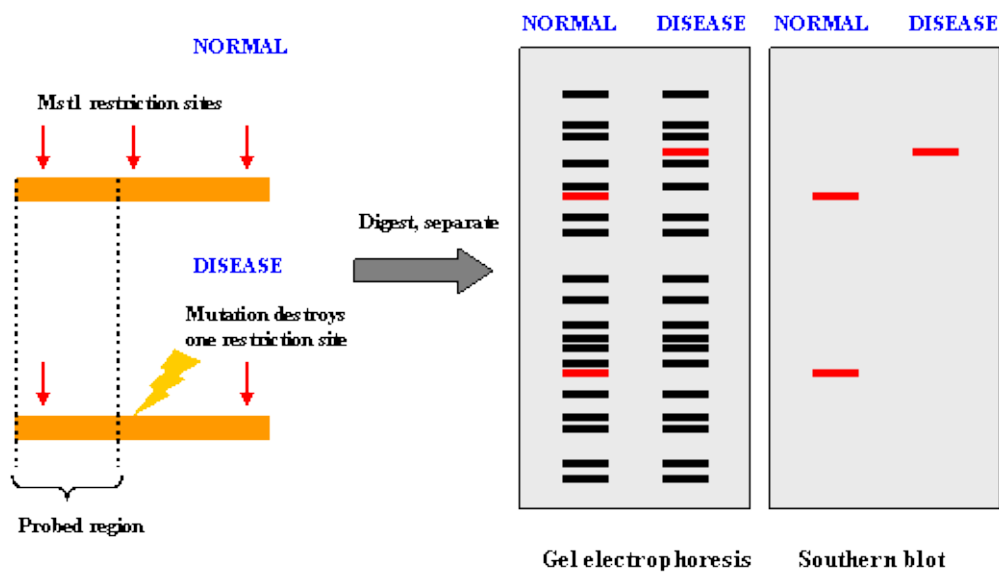




## Πολυμορφισμός μήκους περιοριστικού θραύσματος (RFLP)

Ο πολυμορφισμός μήκους περιοριστικού θραύσματος είναι μια διαφορά στις ομόλογες αλληλουχίες DNA που μπορούν να ανιχνευθούν από την παρουσία θραυσμάτων διαφορετικών μηκών μετά από πέψη των δειγμάτων DNA με συγκεκριμένες ενδονουκλεάσες περιορισμού.

Ένα καλό παράδειγμα των RFLPs στην παρακάτω εικόνα



Στα άτομα με φυσιολογικό φαινότυπο η συγκεκριμένη αλληλουχία DNA μετά από πέψη με ειδική περιοριστική ενδονουκλεάση κόβεται και παίρνουμε την εικόνα που φαίνεται στην αριστερή στήλη (NORMAL) με τα δύο θραύσματα. Τα άτομα που εμφανίζουν τη συγκεκριμένη υποθετική ασθένεια έχουν μια μεταλλαγή στη θέση που κανονικά κόβει η περιοριστική αυτή ενδονουκλεάση και δε μπορεί πλέον να κόψει, έτσι παίρνουμε την εικόνα που φαίνεται στη δεξιά στήλη (DISEASE) όπου η συγκεκριμένη αλληλουχία δεν είναι σε θραύσματα. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/probe/doc/TechRFLP.shtml>, n.d.)

### Περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Είναι ένζυμα που κόβουν το DNA σε ειδικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες αναγνώρισης ή κοντά σε αυτές. (Roberts, 1976). Φυσιολογικά παράγονται από

βακτήρια και στόχο έχουν την προστασία του βακτηριακού κυττάρου από ξένο DNA (Pray, 2008).

Οι θέσεις στις οποίες κόβουν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι γνωστές ως θέσεις περιορισμού (Roberts, 1976). Αυτές συνήθως έχουν μέγεθος 4-6 βάσεις και είναι παλινδρομικές.

Τα πρώτα τρία γράμματα του ονόματος ενός ενζύμου περιορισμού είναι συντμήσεις των βακτηριακών ειδών από τα οποία έχει απομονωθεί το ένζυμο (π.χ. Eco- για την *E. coli* και Hin- για το *H. influenzae*), και το τέταρτο γράμμα αντιπροσωπεύει το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος. Λατινικοί αριθμοί χρησιμοποιούνται επίσης ως μέρος του ονόματος όταν έχουν απομονωθεί περισσότερα από ένα ένζυμα περιορισμού από το ίδιο βακτηριακό στέλεχος.

Τα περιοριστικά ένζυμα χωρίζονται σε τρεις τύπους:

- Τύπου I, τα οποία αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες DNA, αλλά κόβουν σε φαινομενικά τυχαίες θέσεις που μπορεί να είναι μέχρι και 1000 ζεύγη βάσεων μακριά από τη θέση αναγνώρισης.
- Τύπου II, τα οποία αναγνωρίζουν και κόβουν ακριβώς στο σημείο αναγνώρισης.
- Τύπου III, τα οποία αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες, αλλά κόβουν σε μία διαφορετική επίσης συγκεκριμένη θέση που συνήθως δεν απέχει πάνω 25 ζεύγη βάσεων από τη θέσης αναγνώρισης (Pray, 2008).

Εμείς χρησιμοποιήσαμε το ένζυμο ScaI που κόβει την εξής αλληλουχία:



Το ένζυμο αυτό είναι της εταιρείας New England Biolabs, παρασκευάζεται από στέλεχος *E.coli* που φέρει το γονίδιο ScaI του *Streptomyces achromogenes* και έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

- Χρειάζεται 5-15 λεπτά στους 37°C για να κόψει
- Η πέψη μπορεί να γίνει και over night
- Χάνει τη δραστικότητα μετά από παραμονή 20 λεπτών στους 65°C
- Η πέψη αναστέλλεται όταν το DNA υπόστρωμα έχει μεθυλιωθεί από CpG μεθυλάσες
- Αναστέλλεται σε συγκέντρωση αλάτων > 10 mM (αυτά μπορούν να απομακρυνθούν μετά από πλύση με 70% αλκοόλη).
- Αποθηκεύεται στους -20°C

Η New England Biolabs παρέχει 3 διαφορετικά ένζυμα Sac1:

Catalog #	Size	Concentration
R0156S	2,000 units	20,000 units/ml
R0156L	10,000 units	20,000 units/ml
R0156M	10,000 units	100,000 units/ml

Ένα unit ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την πέψη 1 μg λ DNA (HindIII πέψη) σε 1 ώρα στους 37 ° C σε συνολικό όγκο αντίδρασης 50 μl (<https://www.neb.com/products/r0156-saci#tabselect0>, n.d.)

Από αυτά τα 3 εμείς χρησιμοποιήσαμε το R0156S.

Αυτό συνοδεύεται από την εταιρία με το NEbuffer 1.1 που αποτελείται από:

- 10 mM Bis-Tris-Propane-HCl
- 10 mM MgCl<sub>2</sub>
- 100 μg/ml BSA

Και έχει pH 7

Αυτό το ένζυμο κόβει όταν το G γίνεται C στον πολυμορφισμό που μελετάμε και δεν κόβει όταν υπάρχει G. Άρα

- όταν ο γονότυπος είναι GG βλέπουμε μια ζώνη στο ύψος του PCR-product (στα 147 BP),
- όταν ο γονότυπος είναι GC βλέπουμε μια ζώνη στο ύψος του PCR-product (στα 147 BP) και άλλη μια λίγο πιο κάτω (στα 122 BP). Το υπόλοιπο θραύσμα

που προέκυψε μετά το κόψιμο του τελευταίου είναι 25 BP αλλά δε φαίνεται γιατί είναι πολύ μικρό και έχει τρέξει πολύ κάτω (έφυγε από το gel της ηλεκτροφόρησης),

- όταν ο γονότυπος είναι CC βλέπουμε μια ζώνη στα 122 BP και η 25 BP δε φαίνεται.

## Πρωτόκολλο πέψης

Το πρωτόκολλο πέψης αλλάζει ανάλογα με την ποσότητα του PCR-product που έχουμε πάρει. Όσο πιο αχνές είναι οι ζώνες που βλέπουμε στην ηλεκτροφόρηση των PCR-products, τόσο παραπάνω PCR-product χρειάζεται να βάλουμε για να πάρουμε καλά αποτελέσματα. Ο όγκος που προστίθεται από το PCR-product αφαιρείται από το νερό ώστε να έχουμε πάντα τελικό όγκο αντίδρασης 20μl.

Αντιδραστήρια	Έντονες ζώνες	Μέτριες ζώνες	Αχνές ζώνες
Buffer	2 μl	2 μl	2 μl
SacI	0.5 μl	0.5 μl	0.5 μl
ddH <sub>2</sub> O	15 μl	13.5 μl	11.5 μl
PCR-product	2,5 μl	4 μl	6 μl
Σύνολο	20 μl	20 μl	20 μl

Αναλυτικά τα βήματα που ακολουθούνται αν οι ζώνες είναι έντονες:

- Αναδεύονται με ήπιο vortex όλα τα PCR-products
- Μεταφέρουμε 2,5μl από κάθε PCR-product σε ξεχωριστά erpendorfs
- Σε ένα άλλο erpendorf φτιάχνουμε το master mix βάζοντας τις ποσότητες των αντιδραστηρίων (εκτός του DNA) που αναφέρονται στον πίνακα πολλαπλασιασμένες επί τον αριθμό των δειγμάτων συν ένα (για το τυφλό)
- Κάνουμε ήπιο vortex
- Μεταφέρουμε 17,5μl από το master mix σε κάθε erpendorf που προηγουμένως είχαμε προσθέσει PCR-product (περισσεύουν 17,5μl στο master mix για τυφλό).

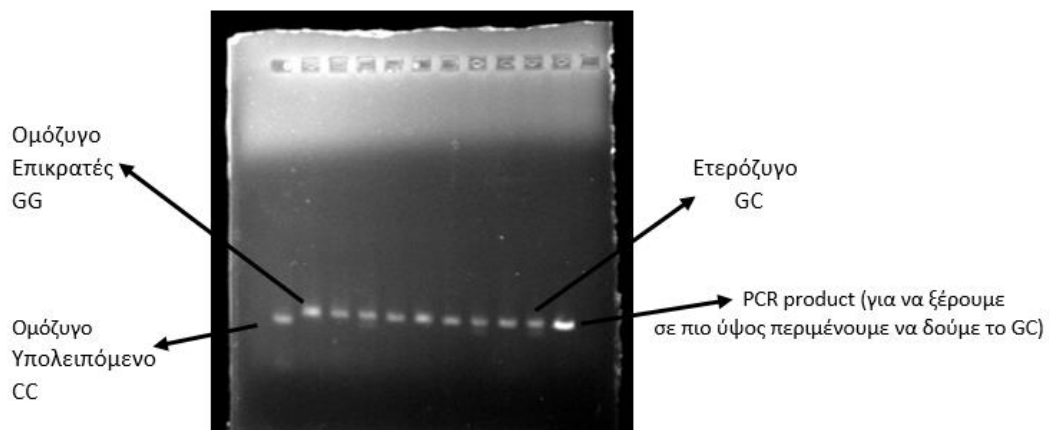
- Τοποθετούμε τα erpendorfs στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37°C
- Αν και το ένζυμο θεωρητικά λειτουργεί στα 5-15 λεπτά εμείς παίρνουμε καλά αποτελέσματα στις 4 ώρες πέψης.

### Πρωτόκολλο ηλεκτροφόρησης της πέψης

Σε πήκτωμα αγαρόζης που το φτιάξαμε με το πρωτόκολλο που αναφέραμε στην πέψη των PCR-products φορτώνουμε 10 μl διαλύματος του προϊόντος της πέψης με τη μπλε χρωστική (3 μl μπλε χρωστικής με 7 μl προϊόν πέψης).

Το ηλεκτροφορούμε για 45 λεπτά στα 170 V, 100 A.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα ακτινοβολείται με UV. Έτσι καθίστανται ορατές οι ζώνες του DNA. Η εικόνα φωτογραφίζεται και αποθηκεύεται.



## 4<sup>ο</sup> κεφάλαιο: Αποτελέσματα

Ακολουθώντας τη διαδικασία που περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο μελετήσαμε 149 ασθενείς που έχουν διαγνωστεί με Στεφανιαία Νόσο μέσω στεφανιογραφίας και 126 υγιή άτομα του γενικού ελληνικού πληθυσμού με φυσιολογικά ηλεκτροκαρδιογραφήματα, που αποτελούν την ομάδα ελέγχου.

Το ιστορικό των ασθενών φαίνεται αναλυτικά στο παράθεμα. Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνεται συνοπτικά το ιστορικό των ασθενών σε σύγκριση με τον ελληνικό πληθυσμό συνολικά.

	Δείγμα ασθενών	Στον ελληνικό πληθυσμό (από ΕΘΝΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ ΥΓΕΙΑΣ: Έτος 2009 από την ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΡΧΗ)	P <sub>value</sub>
Αρσενικά	82,69%	49,00%	< 0.0001 στατιστικά πολύ σημαντικό αποτέλεσμα
Θηλυκά	17,31%	51,00%	
Κανονικοί Υπέρβαροι Παχύσαρκοι	15,56% 55,56% 28,89%	42,40% 38,50% 17,30%	< 0.0001 στατιστικά πολύ σημαντικό αποτέλεσμα
Υπέρταση	68,13%	20,20%	< 0.0001 στατιστικά πολύ σημαντικό αποτέλεσμα
Καπνιστές	69,47%	32,50%	< 0.0001 στατιστικά πολύ σημαντικό αποτέλεσμα
Σακχαρώδη Διαβήτη	32,58%	7,92%	< 0.0001 στατιστικά πολύ σημαντικό αποτέλεσμα
Χοληστερίνη (Φ.Τ. < 200 mg/dL)	43,01%	Διαταραχή σε αυτά	στατιστικά
LDL* (Φ.Τ. < 130)	37,50%		

mg/dL)		έχει το 14,98% του πληθυσμού	σημαντικό αποτέλεσμα
HDL (Φ.Τ. > 88 mg/dL)	96,59%		
Τριγλυκερίδια (Φ.Τ. < 150 mg/dL)	29,35%		
Έμφραγμα	45,00%	1,45%	< 0.0001 στατιστικά πολύ σημαντικό αποτέλεσμα
Οικογενειακό ιστορικό Στεφανιαίας Νόσου	48,35%		

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι:

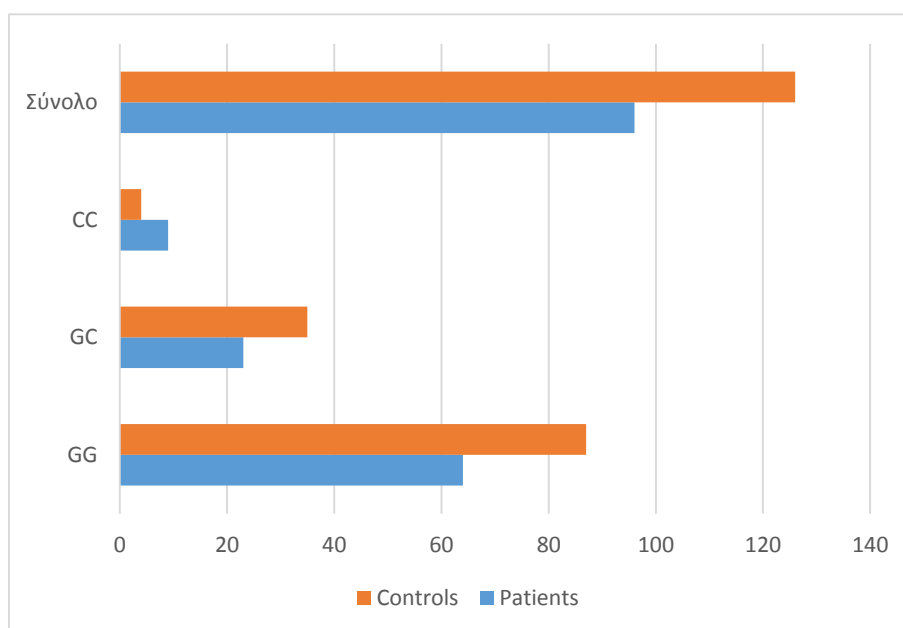
- τα αρσενικά έχουν στατιστικά σημαντικότερη πιθανότητα να εμφανίσουν Στεφανιαία Νόσο σε σχέση με τα θηλυκά,
- τα άτομα που είναι κανονικά, υπέρβαρα και παχύσαρκα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους στην πιθανότητα εμφάνισης Στεφανιαίας Νόσου,
- η υπέρταση και η Στεφανιαία Νόσος σχετίζονται στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους,
- οι καπνιστές έχουν στατιστικά σημαντικότερη πιθανότητα εμφάνισης Στεφανιαίας Νόσου συγκριτικά με τους μη καπνιστές,
- ο Σακχαρώδης Διαβήτης και η Στεφανιαία Νόσος σχετίζονται στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους,
- τα υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων, χοληστερόλης, LDL και τα χαμηλά επίπεδα HDL σχετίζονται στατιστικά σημαντικά με την εμφάνιση Στεφανιαίας Νόσου και
- το έμφραγμα και η Στεφανιαία Νόσος σχετίζονται στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.
-

## Αποτελέσματα στατιστικής επεξεργασίας σχετικά με την ισορροπία Hardy-Weinberg

Η συγκεκριμένη διεργασία γίνεται προκειμένου να ερευνησουμε αν οι δύο πληθυσμοί βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg

Οι γονότυποι των ασθενών και της ομάδας ελέγχου που βρέθηκαν με σκοπό την παρούσα εργασία παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Genotype	Patients	Controls
	n=96	n=126
GG	64	87
GC	23	35
CC	9	4





Για να γίνει η στατιστική ανάλυση εφαρμόζονται διάφοροι τύποι:

Καταρχάς, η συχνότητα κάθε γονοτύπου βρίσκεται με τον τύπο:

$$f = \frac{n}{\Sigma n}$$

όπου  $n$  είναι ο αριθμός των ατόμων που φέρουν τον αντίστοιχο γονότυπο και  $\Sigma n$  είναι ο συνολικός αριθμός των ατόμων κάθε ομάδας

Με εφαρμογή του παραπάνω τύπου δημιουργούμε τον παρακάτω πίνακα:

	<b>Patients</b>	<b>Controls</b>
<b>fGG</b>	0,66667	0,69048
<b>fGC</b>	0,23958	0,27778
<b>fCC</b>	0,09375	0,03174

Υπολογίζουμε αλληλομορφικές συχνότητες G, C με τους παρακάτω τύπους:

$$p_G = \frac{2*n_{GG} + n_{GC}}{2*N}, \quad p_C = \frac{2*n_{CC} + n_{GC}}{2*N}$$

Όπου:  $n_{GG}$  είναι ο αριθμός των ατόμων με γονότυπο GG

$n_{GC}$  είναι ο αριθμός των ατόμων με γονότυπο GC

$n_{CC}$  είναι ο αριθμός των ατόμων με γονότυπο CC

$N$  είναι ο συνολικός αριθμός των ατόμων

Τα αποτελέσματα είναι τα εξής:

	$p_G$	$q_C$
Ασθενείς	0,78646	0,21354
Controls	0.8294	0,1706

Το επόμενο βήμα είναι η εφαρμογή της μεθόδου  $\chi^2$ . Για να γίνει αυτό πρέπει να υπολογίσουμε με τους παρακάτω τύπους τις θεωρητικά αναμενόμενες τιμές ( $\Theta$ ) του αριθμού των ατόμων που φέρουν τους αντίστοιχους γονοτύπους.

$$\Theta_{GG} = p_G^2 * N$$

$$\Theta_{GC} = 2 * p_G * q_C * N$$

$$\Theta_{CC} = q_C^2 * N$$

Όπου:  $\Theta_{GG}$  είναι τα θεωρητικά αναμενόμενα άτομα με γονότυπο GG

$\Theta_{GC}$  είναι τα θεωρητικά αναμενόμενα άτομα με γονότυπο GC

$\Theta_{CC}$  είναι τα θεωρητικά αναμενόμενα άτομα με γονότυπο CC

$p_G$  είναι η συχνότητα του G αλληλουμόρφου

$q_C$  είναι η συχνότητα του C αλληλουμόρφου

N είναι ο συνολικός αριθμός των ατόμων

Έτσι, προκύπτει ο παρακάτω πίνακας:

	Ασθενείς		Controls	
	Παρατηρηθέντα άτομα	Θεωρητικά αναμενόμενα άτομα	Παρατηρηθέντα άτομα	Θεωρητικά αναμενόμενα άτομα
GG	64	59,3779	87	86,5924
GC	23	32,2446	35	35,7233
CC	9	4,3775	4	3,6844
Σύνολο	96	96	126	126

Εφαρμογή μεθόδου  $\chi^2$ :

$$\chi^2 = \sum \frac{(\Pi - \Theta)^2}{\Theta}$$

Όπου:  $\Pi$  είναι οι παρατηρούμενες τιμές

$\Theta$  είναι οι θεωρητικά αναμενόμενες τιμές

Με την εφαρμογή αυτών των τύπων βρίσκουμε ότι:

- Το  $\chi^2$  για τους ασθενείς είναι 7.891454
- Το  $\chi^2$  για τους υγιείς είναι 0.043597

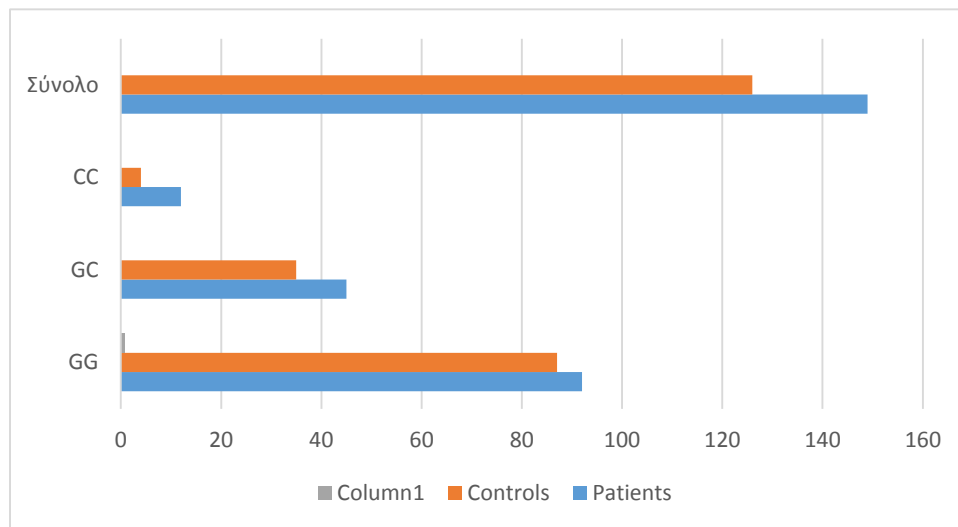
Αφού εξετάζουμε την ισορροπία Hardy-Weinberg για δύο αλληλόμορφα έχουμε ένα βαθμό ελευθερίας (B.E.=1)

Για τους ασθενείς ισχύει ότι  $\chi^2 = 7.891454 > 3,84$  και άρα  $p_{\text{value}} < 0,05$ . Άρα η απόκλιση είναι στατιστικά σημαντική και οι γονοτυπικές συχνότητες δε βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg.

Για τους υγιείς ισχύει ότι  $\chi^2 = 0.043597 < 3,84$  και άρα  $p_{\text{value}} > 0,05$ . Άρα η απόκλιση δεν είναι στατιστικά σημαντική και οι γονοτυπικές συχνότητες βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg.

Αν προσθέσουμε στους ασθενείς και άλλα 60 δείγματα που γονοτυπήθηκαν στο εργαστήριο με τον ίδιο σκοπό τότε έχουμε τα εξής αποτελέσματα:

Genotype	Patients	Controls
	n=149	n=126
GG	92	87
GC	45	35
CC	12	4



	Patients	Controls
fGG	0.6175	0.69048
fGC	0.3030	0.27778
fCC	0.0805	0.03174

	ρ <sub>G</sub>	ρ <sub>C</sub>
Ασθενείς	0,7685	0,2315
Controls	0,8294	0,1706

	Ασθενείς		Controls	
	Παρατηρηθέντα άτομα	Θεωρητικά αναμενόμενα άτομα	Παρατηρηθέντα άτομα	Θεωρητικά αναμενόμενα άτομα
GG	92	88,00	87	86,5924
GC	45	53,02	35	35,7233
CC	12	7,98	4	3,6844
Σύνολο	149	149	126	126

- Το  $\chi^2$  για τους ασθενείς είναι 3.420066
- Το  $\chi^2$  για τους υγιείς είναι 0.043597

Αφού εξετάζουμε την ισορροπία Hardy-Weinberg για δύο αλληλόμορφα έχουμε ένα βαθμό ελευθερίας (B.E.=1)

Για τους ασθενείς ισχύει ότι  $\chi^2 = 3.420066 < 3,84$  και άρα  $p_{\text{value}} > 0,05$ . Άρα η απόκλιση δεν είναι στατιστικά σημαντική και οι γονοτυπικές συχνότητες βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg.

Για τους υγιείς ισχύει ότι  $\chi^2 = 0.043597 < 3,84$  και άρα  $p_{\text{value}} > 0,05$ . Άρα η απόκλιση δεν είναι στατιστικά σημαντική και οι γονοτυπικές συχνότητες βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg

### Στατιστική επεξεργασία με σκοπό την εύρεση ή όχι συσχέτισης

Έχουμε τα αποτελέσματα που δόθηκαν παραπάνω και θέλουμε να εξετάσουμε κατά πόσο η διαφορά ανάμεσα στους υγιείς και του ασθενείς οφείλεται στην τύχη ή είναι στατιστικά σημαντική. Θεωρούμε την μηδενική υπόθεση ότι η διαφορά τους οφείλεται στην τύχη και κάνουμε  $\chi^2$  με τη βοήθεια του προγράμματος “GraphPad Prism 6” για να το εξετάσουμε.

Genotype	Patients	Controls	OR (95%C.I.)	P
	n=96	n=126		
GG	64	87		0,1404
GC	23	35		
CC	9	4		
Allele				
G	0,79	0,83	0,7577 (0,4706-1,220)	0,2723
C	0,21	0,17		

Βλέπουμε πως για τις γονοτυπικές συχνότητες ότι  $p_{\text{value}} = 0,1404 > 0,05$  και για τις αλληλομορφικές συχνότητες  $p_{\text{value}} = 0,2723 > 0,05$ . Άρα η πιθανότητα τα αποτελέσματα αυτά να οφείλονται στην τύχη είναι πολύ πάνω από 5% που είναι το όριο της στατιστικής σημαντικότητας για βιολογικές δοκιμές. Δεχόμαστε τη μηδενική υπόθεση, δηλαδή η διαφορά στις συχνότητες μεταξύ υγιών και ασθενών οφείλεται στην τύχη.

Αν προσθέσουμε και τα υπόλοιπα 53 δείγματα του εργαστηρίου:

Genotype	Patients	Controls	P
	n=149	n=126	0.1746
GG	92	87	
GC	45	35	
CC	12	4	
Allele			
G	229	209	0.0772
C	69	43	

Βλέπουμε πως για τις γονοτυπικές συχνότητες ότι  $p\text{-value} = 0.1746 > 0,05$  και για τις αλληλομορφικές συχνότητες  $p\text{-value} = 0.0772 > 0,05$ . Άρα η πιθανότητα τα αποτελέσματα αυτά να οφείλονται στην τύχη είναι πάνω από 5% που είναι το όριο της στατιστικής σημαντικότητας για βιολογικές δοκιμές. Δεχόμαστε τη μηδενική υπόθεση, δηλαδή η διαφορά στις συχνότητες μεταξύ υγιών και ασθενών οφείλεται στην τύχη.

Άρα το αποτέλεσμα της συγκεκριμένης εργασίας είναι ότι δεν υπάρχει συσχέτιση του πολυμορφισμού miR-146a rs2910164 G>C με τη Στεφανιαία Νόσο στον ελληνικό πληθυσμό.

## 5<sup>ο</sup> Κεφάλαιο Συζήτηση αποτελεσμάτων

Η Στεφανιαία Νόσος είναι μια ασθένεια που εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το κάπνισμα, η έλλειψη σωματικής άσκησης, το στρες, η παχυσαρκία, η διαίτα, μονογονιδιακές διαταραχές όπως οικογενής υπερχοληστερινεμία αλλά και άλλα πιο περίπλοκα γενετικά αίτια με αποτέλεσμα να είναι η κυριότερη αιτία θανάτου στη μέση και μεγαλύτερη ηλικία στις περισσότερες αναπτυγμένες χώρες. Έτσι, είναι λογικό η Στεφανιαία νόσος να αποτελεί αντικείμενο όλο και περισσότερων ερευνών.

Τα τελευταία χρόνια τα microRNAs έχουν αρχίσει να μελετώνται εκτεταμένα και έχει βρεθεί συσχέτιση των πολυμορφισμών τους με πληθώρα ασθενειών ανάμεσα στα οποία και η Στεφανιαία αλλά και άλλα Καρδιαγγειακά νοσήματα.

Πιο συγκεκριμένα για τον πολλά πολυμορφισμό που μελετήσαμε, στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν δύο μελέτες για τον κινέζικο πληθυσμό, μια για Ινδούς, μια για Καυκάσιους και δύο μετα-αναλύσεις που επεξεργάζονται τα δεδομένα των παραπάνω. Τα αποτελέσματα αυτά, που παρουσιάζονται στο συγκεντρωτικό πίνακα στη σελίδα (τάδε), είναι αρκετά αντιφατικά μεταξύ τους αλλά και με τα δικά μας. Όμως η έρευνα που έγινε επίσης σε καυκάσιο πληθυσμό (L. Hamann, 2014) όπως η δική μας έχει σύμφωνα αποτελέσματα με τα δικά μας.

Η συμφωνία με την έρευνα στους Καυκάσιους, αλλά διαφωνία με τις έρευνες στους διαφορετικούς πληθυσμούς μπορεί να οφείλεται και στο γεγονός ότι οι διάφορες ομάδες πληθυσμών έχουν τελείως διαφορετικές γονοτυπικές και αλληλομορφικές συχνότητες.

Είναι γνωστό ότι η χρόνια ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού και του φλεγμονώδους συστήματος συμβάλλει στην ανάπτυξη της Στεφανιαίας νόσου. Επίσης, το miR-146 είναι μεσολαβητής του ανοσοποιητικού συστήματος και ειδικότερα της έμφυτης ανοσοαπόκρισης: ο TNF-α επάγει το επίπεδο έκφρασης miR-146a σε ανθρώπινα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα, τα mRNA-στόχοι του miR-



146a, TRAF6 και IRAK1, που εμπλέκονται σηματοδότηση μέσω υποδοχέα τύπου Toll και στη σηματοδότηση μέσω κυτοκινών. Επιπρόσθετα, το miR-146a αλληλοεπιδρά με τον πυρηνικό παράγοντα (NF)-κB, ένα μεταγραφικό παράγοντα κλειδί που σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του ανοσοποιητικού. Γι αυτό δε θα ήταν παράξενο αν είχε βρεθεί συσχέτιση του πολυμορφισμού miR-146a rs2910164 G>C με τη Στεφανιαία Νόσο στην έρευνά μας.

Τέλος, τα διαφορετικά αποτελέσματα σε ομάδες ατόμων διαφορετικών εθνικοτήτων δείχνει ότι όχι μόνο ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός σχετίζεται με τη στεφανιαία νόσο, αλλά και ότι εξαρτάται και από άλλους γενετικούς παράγοντες (Yuqing He Jie Yang, 2015).

Ο πολυμορφισμός miR-146a rs2910164 G>C λοιπόν, μπορεί να θεωρηθεί παράγοντας συσχέτισης με τη Στεφανιαία Νόσο για ασιατικούς πληθυσμούς, όχι όμως καυκάσιους πληθυσμούς.

#### *Προτάσεις για μελλοντικές έρευνες*

Είδαμε ότι, παρ' όλο που δεν υπάρχει συσχέτιση του πολυμορφισμού miR-146a rs2910164 G>C με τη Στεφανιαία Νόσο στον ελληνικό πληθυσμό, αυξάνοντας το δείγμα των ασθενών από τα 96 άτομα στα 156 μειώθηκε αισθητά το  $p_{value}$  (από 0,2723 σε 0.0601) στη σύγκριση των αλληλομορφικών συχνοτήτων. Αυτό μπορεί να σημαίνει πως αν αυξάναμε κι άλλο το δείγμα μας να βρίσκαμε συσχέτιση. Οπότε στο μέλλον θα μπορούσαν να γίνουν κι άλλες έρευνες πάνω στο πεδίο αυξάνοντας το δείγμα.

Επίσης, μένει να μελετηθεί και το κατά πόσο αυτός ο πολυμορφισμός επηρεάζει την εξέλιξη της Στεφανιαίας Νόσου στους Καυκάσιους.

Τέλος μπορούν να γίνουν μελέτες άλλων πολυμορφισμών του miR146a, αφού όπως αναφέρθηκε πιο πάνω το miR-146 είναι μεσολαβητής του ανοσοποιητικού συστήματος το οποίο με τη σειρά του σχετίζεται με τη Στεφανιαία νόσο.

# Παράθεμα

## Πίνακας γονιδίων στόχων του hsa-miR-146a

ID	Target	Description	Validation methods							Sum	# of papers
			Strong evidence			Less strong evidence					
			Reporter assay	Western blot	qPCR	Microarray	NGS	psilac	Other		
MIRT000006	CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	✓	✓	✓	✓			✓	5	2
MIRT000449	TLR2	toll-like receptor 2	✓	✓	✓				✓	4	1
MIRT000638	FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	✓						✓	2	1
MIRT000711	TRAF6	TNF receptor-associated factor 6, E3 ubiquitin protein ligase	✓	✓	✓	✓			✓	5	16
MIRT000712	IRAK1	interleukin-1 receptor-associated kinase 1	✓	✓	✓	✓			✓	5	17
MIRT000945	ROCK1	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1	✓	✓					✓	3	1
MIRT001919	BRCA2	breast cancer 2, early onset	✓						✓	2	1
MIRT001920	BRCA1	breast cancer 1, early onset	✓	✓	✓	✓	✓		✓	6	3
MIRT006530	TLR4	toll-like receptor 4	✓	✓	✓	✓				4	1
MIRT003319	FAF1	Fas (TNFRSF6) associated factor 1	✓		✓				✓	3	1
MIRT004459	NFKB1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	✓	✓	✓	✓			✓	5	4
MIRT004661	CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	✓						✓	2	1
MIRT004730	EGFR	epidermal growth factor receptor	✓	✓	✓				✓	4	6
MIRT005463	CD40LG	CD40 ligand	✓	✓	✓				✓	4	1
MIRT005581	FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	✓	✓					✓	3	2
MIRT005806	ERBB4	v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian)	✓	✓		✓				3	2
MIRT006209	SMAD4	SMAD family member 4	✓	✓	✓	✓				4	5
MIRT007243	WASF2	WAS protein family, member 2	✓							1	1
MIRT021229	STAT1	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	✓	✓	✓	✓				4	3
MIRT021236	UHRF1	ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1	✓	✓		✓			✓	4	2
MIRT035533	L1CAM	L1 cell adhesion molecule	✓							1	1
MIRT052963	SMN1	survival of motor neuron 1, telomeric	✓	✓	✓					3	1
MIRT053495	CARD10	caspase recruitment domain family, member 10	✓	✓	✓					3	2
MIRT053496	COPS8	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 8 (Arabidopsis)	✓	✓	✓					3	1
MIRT054580	ELAVL1	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 1 (Hu antigen R)	✓	✓	✓					3	1
MIRT054669	NUMB	numb homolog (Drosophila)	✓	✓	✓					3	2

MIRT437352	PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	✓	✓	✓				3	1
MIRT437504	CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5	✓						1	1
MIRT437844	PTGES2	prostaglandin E synthase 2	✓						1	1
MIRT437864	ErbB4	v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian)	✓						1	1
MIRT437923	CNOT6L	CCR4-NOT transcription complex, subunit 6-like	✓						1	1
MIRT438057	SIKE1	suppressor of IKBKE 1	✓		✓	✓			3	1
MIRT438058	CXCL12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12	✓		✓	✓			3	1
MIRT438113	PRKCE	protein kinase C, epsilon	✓						1	1
MIRT438306	RAC1	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)	✓	✓	✓				3	1
MIRT438307	LAMC2	laminin, gamma 2	✓		✓				2	1
MIRT438527	COX2	cytochrome c oxidase subunit II	✓		✓				2	1
MIRT438908	RNF11	ring finger protein 11	✓						1	1
MIRT000301	KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog							✓	1 1
MIRT000303	CFH	complement factor H		✓					✓	2 3
MIRT000304	IRAK2	interleukin-1 receptor-associated kinase 2		✓	✓				✓	3 2
MIRT004017	CCNA2	cyclin A2		✓	✓	✓			✓	4 2
MIRT004018	PA2G4	proliferation-associated 2G4, 38kDa		✓	✓	✓			✓	4 2
MIRT004249	SNAP25	synaptosomal-associated protein, 25kDa							✓	1 1
MIRT004409	IL8	interleukin 8		✓		✓			✓	3 3
MIRT004731	MTA2	metastasis associated 1 family, member 2		✓	✓				✓	3 1
MIRT005705	CDKN3	cyclin-dependent kinase inhibitor 3		✓					✓	2 1
MIRT005706	KIF22	kinesin family member 22		✓					✓	2 1
MIRT021214	NFIX	nuclear factor I/X (CCAAT-binding transcription factor)							✓	1 1
MIRT021215	IRF7	interferon regulatory factor 7				✓				1 1
MIRT021216	RAD54L	RAD54-like ( <i>S. cerevisiae</i> )							✓	1 1
MIRT021217	PPP1R1C	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1C				✓				1 1
MIRT021218	TRIM14	tripartite motif containing 14							✓	1 1
MIRT021219	TMSB15A	thymosin beta 15a							✓	1 1
MIRT021220	ITGB2	integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)				✓				1 1
MIRT021221	SNTG2	syntrophin, gamma 2				✓				1 1
MIRT021222	RSAD2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2				✓				1 1
MIRT021223	TIMELESS	timeless homolog ( <i>Drosophila</i> )							✓	1 1

MIRT021224	PRR15	proline rich 15					✓	1	1
MIRT021225	PEX11G	peroxisomal biogenesis factor 11 gamma					✓	1	1
MIRT021226	PLEKHA4	pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 4					✓	1	1
MIRT021227	BGLAP	bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein		✓				1	1
MIRT021228	SYT12	synaptotagmin XII			✓			1	1
MIRT021230	LMO2	LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)					✓	1	2
MIRT021231	CD83	CD83 molecule					✓	1	1
MIRT021232	IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1			✓			1	1
MIRT021233	IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1			✓			1	1
MIRT021234	OLFML2A	olfactomedin-like 2A			✓			1	1
MIRT021235	ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier			✓			1	1
MIRT021237	IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3			✓			1	1
MIRT021238	RGS13	regulator of G-protein signaling 13			✓			1	1
MIRT021239	CCL8	chemokine (C-C motif) ligand 8					✓	1	1
MIRT021240	MTUS2	microtubule associated tumor suppressor candidate 2			✓			1	1
MIRT021241	BLMH	bleomycin hydrolase					✓	1	1
MIRT021242	MCPH1	microcephalin 1					✓	1	1
MIRT021243	NMI	N-myc (and STAT) interactor			✓			1	1
MIRT021244	HSPA1A	heat shock 70kDa protein 1A			✓			1	1
MIRT021245	TRIM22	tripartite motif containing 22			✓			1	1
MIRT021246	ITGBL1	Integrin, beta-like 1 (with EGF-like repeat domains)			✓			1	1
MIRT021247	SPATS2L	spermatogenesis associated, serine-rich 2-like			✓			1	1
MIRT021248	POLE2	polymerase (DNA directed), epsilon 2, accessory subunit					✓	1	1
MIRT021249	IFI44	interferon-induced protein 44			✓			1	1
MIRT021250	OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like			✓			1	1
MIRT021251	LTB	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)					✓	1	1
MIRT021252	PBLD	phenazine biosynthesis-like protein domain containing					✓	1	1
MIRT021253	IFI44L	interferon-induced protein 44-like			✓			1	1
MIRT021254	PDIK1L	PDLIM1 interacting kinase 1 like					✓	1	1
MIRT021255	MR1	major histocompatibility complex, class I-related					✓	1	1
MIRT021256	IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27			✓			1	1
MIRT021257	TBP	TATA box binding protein					✓	1	1
MIRT021258	ELL3	elongation factor RNA polymerase II-like 3					✓	1	1

MIRT021259	METTL7A	methyltransferase like 7A				✓	✓	2	2
MIRT021260	MCM10	minichromosome maintenance complex component 10					✓	1	1
MIRT021261	LINC00304	long intergenic non-protein coding RNA 304			✓			1	1
MIRT021262	SDCBP2	syndecan binding protein (syntenin) 2					✓	1	1
MIRT021263	STON2	stonin 2			✓			1	1
MIRT021264	BCL2A1	BCL2-related protein A1			✓			1	1
MIRT021265	COL13A1	collagen, type XIII, alpha 1					✓	1	1
MIRT021266	IRF5	interferon regulatory factor 5					✓	1	1
MIRT021267	MX2	myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)			✓			1	1
MIRT021268	VWCE	von Willebrand factor C and EGF domains					✓	1	1
MIRT021269	EPST11	epithelial stromal interaction 1 (breast)			✓			1	1
MIRT021270	OSBPL1A	oxysterol binding protein-like 1A			✓			1	1
MIRT021271	CD86	CD86 molecule					✓	1	1
MIRT021272	IFIT5	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5			✓			1	1
MIRT021273	C1orf21	chromosome 1 open reading frame 21			✓			1	1
MIRT021274	GIMAP4	GTPase, IMAP family member 4			✓			1	1
MIRT021275	CCR9	chemokine (C-C motif) receptor 9			✓			1	1
MIRT021276	SAMD9L	sterile alpha motif domain containing 9-like			✓			1	1
MIRT021277	IFIT3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3			✓			1	1
MIRT021278	CD80	CD80 molecule					✓	1	1
MIRT021279	SPP1	secreted phosphoprotein 1			✓			1	1
MIRT021280	SLPI	secretory leukocyte peptidase inhibitor	✓	✓				2	1
MIRT045694	MSC	musculin				✓		1	1
MIRT054757	ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	✓	✓				2	1
MIRT054772	SMAD2	SMAD family member 2	✓	✓				2	1
MIRT081894	KCTD15	potassium channel tetramerisation domain containing 15				✓		1	4
MIRT132292	ARL8A	ADP-ribosylation factor-like 8A				✓		1	1
MIRT166138	SQSTM1	sequestosome 1				✓		1	2
MIRT387607	PMAIP1	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1				✓		1	1
MIRT437615	S100A12	S100 calcium binding protein A12			✓	✓		2	1
MIRT437616	ZNF117	zinc finger protein 117			✓	✓		2	1
MIRT437617	MYO6	myosin VI			✓	✓		2	1
MIRT437618	CCDC6	coiled-coil domain containing 6			✓	✓		2	1
MIRT437619	IL1RAP	interleukin 1 receptor accessory protein			✓	✓		2	1

MIRT437620	IL1RL2	interleukin 1 receptor-like 2			✓	✓			2	1
MIRT437835	ROBO1	roundabout, axon guidance receptor, homolog 1 (Drosophila)			✓				1	1
MIRT438248	HOXD10	homeobox D10		✓	✓				2	1
MIRT438558	DUSP1	dual specificity phosphatase 1		✓	✓				2	1
MIRT444062	SERPINA4	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 4					✓		1	1
MIRT445436	ESD	esterase D					✓		1	1
MIRT446133	ST6GAL2	ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 2					✓		1	1
MIRT448043	SFRP1	secreted frizzled-related protein 1					✓		1	1
MIRT448164	MKRN2	makorin ring finger protein 2					✓		1	1
MIRT448603	PARD6B	par-6 partitioning defective 6 homolog beta (C. elegans)					✓		1	1
MIRT449335	ACTBL2	actin, beta-like 2					✓		1	1
MIRT450497	LIMD2	LIM domain containing 2					✓		1	1
MIRT451936	TMPRSS5	transmembrane protease, serine 5					✓		1	1
MIRT460084	HAAD	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase					✓		1	1
MIRT462098	TMEM214	transmembrane protein 214					✓		1	1
MIRT462357	BCL7B	B-cell CLL/lymphoma 7B					✓		1	1
MIRT467100	SRPRB	signal recognition particle receptor, B subunit					✓		1	3
MIRT468089	SHCBP1	SHC SH2-domain binding protein 1					✓		1	1
MIRT469229	RHOBTB3	Rho-related BTB domain containing 3					✓		1	1
MIRT469762	RAB2B	RAB2B, member RAS oncogene family					✓		1	1
MIRT470477	PPP1R11	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 11					✓		1	1
MIRT472594	NACC1	nucleus accumbens associated 1, BEN and BTB (POZ) domain containing					✓		1	1
MIRT481369	ATG9A	autophagy related 9A					✓		1	1
MIRT487523	GXYLT2	glucoside xylosyltransferase 2					✓		1	1
MIRT487736	MICAL2	microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 2					✓		1	2
MIRT488424	COPA	coatamer protein complex, subunit alpha					✓		1	1
MIRT493741	GRAP2	GRB2-related adaptor protein 2					✓		1	1
MIRT497304	CD300LB	CD300 molecule-like family member b					✓		1	1
MIRT501922	MBD4	methyl-CpG binding domain protein 4					✓		1	2
MIRT510078	PPWD1	peptidylprolyl isomerase domain and WD repeat containing 1					✓		1	3
MIRT513662	TMEM136	transmembrane protein 136					✓		1	1

MIRT532945	ZNF292	zinc finger protein 292				✓		1	1
MIRT533311	USP48	ubiquitin specific peptidase 48				✓		1	1
MIRT535152	PLEKHG5	pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 5				✓		1	1
MIRT545340	CCDC83	coiled-coil domain containing 83				✓		1	1
MIRT545675	DECR1	2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial				✓		1	1
MIRT549600	TMEM101	transmembrane protein 101				✓		1	1
MIRT549869	ZNF260	zinc finger protein 260				✓		1	1
MIRT551937	AKAP8	A kinase (PRKA) anchor protein 8				✓		1	2
MIRT553543	TMEM167A	transmembrane protein 167A				✓		1	2
MIRT554520	RUFY2	RUN and FYVE domain containing 2				✓		1	1
MIRT559117	C16orf52	chromosome 16 open reading frame 52				✓		1	1
MIRT559374	ATP13A3	ATPase type 13A3				✓		1	1
MIRT565761	SERTAD2	SERTA domain containing 2				✓		1	1
MIRT566974	LBR	lamin B receptor				✓		1	1
MIRT567599	FANCF	Fanconi anemia, complementation group F				✓		1	1
MIRT572306	LSM4	LSM4 homolog, U6 small nuclear RNA associated ( <i>S. cerevisiae</i> )				✓		1	1
MIRT572491	BTN2A2	butyrophilin, subfamily 2, member A2				✓		1	1
MIRT574444	SERBP1	SERPINE1 mRNA binding protein 1				✓		1	1
MIRT609588	GPM6B	glycoprotein M6B				✓		1	1
MIRT610781	ELP2	elongator acetyltransferase complex subunit 2				✓		1	1
MIRT616849	ZNF629	zinc finger protein 629				✓		1	1
MIRT623277	MDN1	MDN1, midasin homolog (yeast)				✓		1	1
MIRT627841	POU3F1	POU class 3 homeobox 1				✓		1	1
MIRT636161	TLL1	tollid-like 1				✓		1	1
MIRT647089	HORMAD2	HORMA domain containing 2				✓		1	1
MIRT656235	MFS6	major facilitator superfamily domain containing 6				✓		1	1
MIRT658606	ENTPD5	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5				✓		1	1
MIRT665509	UTP15	UTP15, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )				✓		1	1
MIRT668793	CYTIP	cytohesin 1 interacting protein				✓		1	2
MIRT681545	ZNF738	zinc finger protein 738				✓		1	1
MIRT686027	UMPS	uridine monophosphate synthetase				✓		1	1
MIRT690326	MRPS30	mitochondrial ribosomal protein S30				✓		1	1

MIRT693789	MRPL10	mitochondrial ribosomal protein L10				✓		1	1
MIRT694257	RG59BP	regulator of G protein signaling 9 binding protein				✓		1	1
MIRT695044	ALG10B	asparagine-linked glycosylation 10, alpha-1,2-glucosyltransferase homolog B (yeast)				✓		1	1
MIRT701168	PACS2	phosphofurin acidic cluster sorting protein 2				✓		1	1
MIRT704047	EDEM3	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 3				✓		1	1
MIRT704808	CDC73	cell division cycle 73, Paf1/RNA polymerase II complex component, homolog (S. cerevisiae)				✓		1	1
MIRT705302	AVL9	AVL9 homolog (S. cerevisiae)				✓		1	1
MIRT709788	CYBRD1	cytochrome b reductase 1				✓		1	1
MIRT717744	MYLK	myosin light chain kinase				✓		1	1
MIRT724691	DGCR6L	DiGeorge syndrome critical region gene 6-like				✓		1	1

([http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/search.php?q=search\\_exact&searchword=hsa-miR-146a-5p&sort=id&order=asc&page=1](http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/search.php?q=search_exact&searchword=hsa-miR-146a-5p&sort=id&order=asc&page=1), n.d.)



Πίνακας - Ιστορικό ασθενών

A/A	ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΒΑΡΟΣ	ΥΨΟΣ	ΔΜΣ	ΥΠΕΡΤΑΣΗ	ΣΥΣΤΟΛΙΚΗ	ΔΙΑΣΤΟΛΙΚΗ	ΚΑΠΝΙΣΜΑ	ΣΔ	ΧΟΛΗΣΤΕΡΙΝΗ	LDL	HDL	ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΑ	ΕΜΦΡΑΓΜΑ	ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ
1	CAD6	GC	A	59				+			ΠΡΩΗΝ	-	188		46	192	+	-
2	CAD12	GG	A	83				+			ΠΡΩΗΝ	+	225		28	219	-	-
3	CAD13	GC	A	69				+			-	-	173		43	86	-	+
4	CAD22	GG	A	38				+			ΠΡΩΗΝ	-	169		30	316	-	+
5	CAD25	GG	A	66				+			ΠΡΩΗΝ	+	131		32	95	+	+
6	CAD26	GG	A	57				+			ΠΡΩΗΝ	-	146		42	96	+	-
7	CAD27	GG	A	69				+			ΠΡΩΗΝ	+	211		47	109	-	-
8	CAD28	GG	A	62				+			ΠΡΩΗΝ	+	135		45	105	-	-
9	CAD29	GG	A	61				+			ΠΡΩΗΝ	-	156		43	130	-	-
10	CAD30	GC	A	84				+			ΠΡΩΗΝ	-	206		41	139	+	-
11	CAD31	GC																
12	CAD34	GG	A	63				+			-	-	124		39	119	-	-
13	CAD35	GC	A	71				+			-	-	201		47	106	-	-
14	CAD37	GG	A	49				+			ΠΡΩΗΝ	+	233		52	113	+	-
15	CAD39	GC	A	68				+			ΠΡΩΗΝ	+	157		50	149	-	+
16	CAD41	GG	Θ	78				+			-	+	145		52	175	-	+
17	CAD43	GC	A	48				+			-	+	98		44	42	-	+
18	CAD45	GG	A	72				+			ΠΡΩΗΝ	+	232		25	103	-	+
19	CAD46	GC	A	64				+			ΠΡΩΗΝ	-	145		50	89	-	+
20	CAD47	GC	Θ	57				+			-	-	206		54	97	-	+
21	CAD48	GG	A	49				+			ΠΡΩΗΝ	+	163		44	162	-	+
22	CAD50	GC	A	63				+			ΠΡΩΗΝ	-	177		58	71	-	+
23	CAD53	GC	A	62				+			+	-	212		45	169	-	+
24	CAD54	GC	Θ	64				+			-	+	206		51	155	-	-
25	CAD55	GG	A	59				-			-	-	248		47	82	+	-

Διερεύνηση πιθανής συσχέτισης του πολυμορφισμού miR-146a rs2910164 G>C με τη Στεφανιαία Νόσο στον ελληνικό πληθυσμό

A/A	ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΒΑΡΟΣ	ΥΨΟΣ	ΔΜΣ	ΥΠΕΡΤΑΣΗ	ΣΥΣΤΟΛΙΚΗ	ΔΙΑΣΤΟΛΙΚΗ	ΚΑΠΝΙΣΜΑ	ΣΔ	ΧΟΛΗΣΤΕΡΙΝΗ	LDL	HDL	ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΑ	ΕΜΦΡΑΓΜΑ	ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ
26	CAD56	GC	Θ	74				+			-	+	157		45	220	+	-
27	CAD57	GG	A	50				+			+	+	179		35	198	+	-
28	CAD58	GC	Θ	60				-			-	+	195		47	102	+	-
29	CAD65	GC	A	64				+			+	-	252		48		+	
30	CAD66	GG	A	62				+			-	+	252		44	280	+	+
31	CAD67	GG	A	67				+			+	+	158		28	107	-	-
32	CAD68	GC	A	69				+			+	-	188		32	105	-	+
33	CAD69	GG	A	85				+			-	-	155		51	99	+	-
34	CAD74	GG	A	53				+			+	-	213		36	29	+	+
35	CAD75	GC	A	85				+			-	-	232		38	150	+	-
36	CAD76	GG	A	82				+			-	-	185		59	121	-	-
37	CAD78	CC	A	66				+			+	+	164		50	75	+	+
38	CAD79	GC	A	51				-			-	-	131		33	178	-	-
39	CAD83	CC	A	58				-			+	+	249		50	75	+	+
40	CAD84	GG	A	50				+			+	-	203		66	100	+	-
41	CAD85	GC	A	52				+			-	-	234		53	117	+	-
42	CAD86	GC																
43	CAD87	GG	A	59	85	1.65	31.22	+	110 *	90 *	+	-	188		32	153		+
44	CAD88	GG	A	77	75	1.64	27.88	-	130	90	+	+	191		29	244		+
45	CAD89	GC	Θ	51	68	1.55	28.30	-	110	80	+	-	200		27	130		+
46	CAD90	GG	A	60	105	1.87	30.02	-	140	90	+	-	166		30	201		+
47	CAD91	GC	A	78	77	1.69	26.95	-	130	80	+	-	98		21	97		-
48	CAD92	GG	A	70	87	1.69	30.46	-	110	80	+	-	218		42	26		-
49	CAD94	GG	A	65	95	1.84	28.06	-	130	90	+	-	187		27	133		-
50	CAD95	CC	Θ	53	81	1.52	35.05	-	120	80	+	+	183		29	148		-
51	CAD96	GG	A	47	75	1.8	23.14	+	140	100	+	-	190		35	100		+
52	CAD97	GG	A	52	88	1.71	30.09	-	110	80	+	-	272		35	115		+
53	CAD98	GG	Θ	58	78	1.5	34.66	-	100	80	+	-	190		58	173		-
54	CAD99	CC	A	49	130	1.87	37.17	-	100	80	+	-	230		31	107		+

Διερεύνηση πιθανής συσχέτισης του πολυμορφισμού miR-146a rs2910164 G>C με τη Στεφανιαία Νόσο στον ελληνικό πληθυσμό

A/A	ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΒΑΡΟΣ	ΥΨΟΣ	ΔΜΣ	ΥΠΕΡΤΑΣΗ	ΣΥΣΤΟΛΙΚΗ	ΔΙΑΣΤΟΛΙΚΗ	ΚΑΠΝΙΣΜΑ	ΣΔ	ΧΟΛΗΣΤΕΡΙΝΗ	LDL	HDL	ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΑ	ΕΜΦΡΑΓΜΑ	ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ
55	CAD100	GG	A	76	72	1.64	26.76	-	100	80	-	-	157		53	36		-
56	CAD101	GG	A	60	93	1.76	30.02	-	120	80	ΠΡΩΗΝ	+	84		24	103		+
57	CAD102	GG	A	56	95	1.83	28.36	-	120	80	+	-	280		29	140		+
58	CAD103	GG	A	66	90	1.72	30.42	+	130 *	80 *	+	+	180		39 *	300 *		-
59	CAD104	GG	A	74	77	1.73	25.72	+	130 *	80 *	+	-	171		47 *	75 *		-
60	CAD105	GC	A	63	75	1.66	27.21	-	120	80	-	-	193		62	119		+
61	CAD106	GG	A	32	105	1.78	33.13	+	120 *	90 *	+	-	210		25	180 *		+
62	CAD107	GG	A	45	75	1.76	24.21	-	130	90	+	-	190		33	116		+
63	CAD108	GG	A	2	60	1.7	20.76	???	όχι???	όχι???	+	-	205		31	96		+
64	CAD109	GC	A	66	78	1.7	26.98	+	140 *	90 *	+	-	242		52	171		+
65	CAD110	GC	A		80													
66	CAD111	GC	A	47	74	1.7	25.60	???	όχι???	όχι???	+	-	202		39	77		-
67	CAD112	GG	A	52	90	1.79	28.08	-	120	90	+	-	228		41	87		+
68	CAD113	GG	A	56	91	1.91	24.94	-	120	80	-	-	229		49	91		-
69	CAD114	GG	A	61	90	1.67	32.27	+	130 *	90 *	+	+	116		32	94		+
70	CAD115	GC	Θ	63	56	1.55	23.30	-	110	80	+	-	220		30	173		-
71	CAD116	GC	A	68	83	1.74	27.41	+	120 *	70 *		+	185		66	67		
72	CAD117	GC	A	78	90	1.65	33.05	+	130 *	80 *	-	-	190		47	90		+
73	CAD118	GC	A	47	75	1.65	27.54	-	100	70	+	-	256		40	126		-
74	CAD119	GG	Θ	69	74	1.62	28.19	-	110	70	-	-	199		53	108		-
75	CAD121	GC	A	62	77	1.68	27.28	-	120	80	+	-	213		43	260		-
76	CAD122	GG	Θ	60	68	1.63	25.59	???	όχι???	όχι???	+	-	224		40	123		+
77	CAD124	GG	A	41	78	1.78	24.61	???	όχι???	όχι???	+	-	190		38	76		+
78	CAD125	GG	A	56	90	1.88	25.46	+	120 *	80 *	-	-	142		33	102		+
79	CAD126	GG	A	63	85	1.73	28.40	+	130 *	80 *	-	-	170		27	100		+
80	CAD127	CC	A	53	87	1.77	27.76	+	120 *	80 *	-	-	187		37	177		+
81	CAD128	GG	A	59	140	1.68	49.60	+	180	90	ΠΡΩΗΝ	-	252		58	152		+
82	CAD129	GG	Θ	57	72	1.67	25.81	+	110 *	80 *	+	+	127		39	88 *		-
83	CAD130	GG	A	53	90	1.83	26.87	+	130 *	90 *	-	+	100		24	123 *		+

Διερεύνηση πιθανής συσχέτισης του πολυμορφισμού miR-146a rs2910164 G>C με τη Στεφανιαία Νόσο στον ελληνικό πληθυσμό

A/A	ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΒΑΡΟΣ	ΥΨΟΣ	ΔΜΣ	ΥΠΕΡΤΑΣΗ	ΣΥΣΤΟΛΙΚΗ	ΔΙΑΣΤΟΛΙΚΗ	ΚΑΠΝΙΣΜΑ	ΣΔ	ΧΟΛΗΣΤΕΡΙΝΗ	LDL	HDL	ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΑ	ΕΜΦΡΑΓΜΑ	ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ
84	CAD131	GG	A	47	99	1.87	28.31	-	110	70	+	-	248			132		+
85	CAD132	GG	A	91	88	1.72	29.74	-	120	80	+	-	226			101		-
86	CAD133	CC	A	60	98	1.83	29.26	-	130	80	+	-	230			150		-
87	CAD134	GC	A	57	70	1.73	23.38	+	100 *	80 *	+	+	182			145 *		+
88	CAD135	GG	A	52	67	1.6	26.17	-	110	80	+	-	246			105		-
89	CAD136	GG																
90	CAD137	GG																
91	CAD138	GC																
92	CAD139	GG																
93	CAD140	GG																
94	CAD141	GG																
95	CAD142	GC																
96	CAD143	GC																
97	CAD144	GC																
98	CAD145	GG																
99	CAD146	GC																
100	CAD149	GG																
101	CAD150	GC																
102	CAD151	GG																
103	CAD152	CC																
104	CAD158	GC																
105	CAD159	GG																
106	CAD160	GG																
107	Σ16	GG																
108	Σ20	GG																
109	Σ22	GG																
110	Σ29	GG																
111	Σ33	GG		62							+							
112	Σ37	GG																

Διερεύνηση πιθανής συσχέτισης του πολυμορφισμού miR-146a rs2910164 G>C με τη Στεφανιαία Νόσο στον ελληνικό πληθυσμό

A/A	ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΒΑΡΟΣ	ΥΨΟΣ	ΔΜΣ	ΥΠΕΡΤΑΣΗ	ΣΥΣΤΟΛΙΚΗ	ΔΙΑΣΤΟΛΙΚΗ	ΚΑΠΝΙΣΜΑ	ΣΔ	ΧΟΛΗΣΤΕΡΙΝΗ	LDL	HDL	ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΑ	ΕΜΦΡΑΓΜΑ	ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ
113	Σ44	CC																
114	Σ52	GG	Θ	71				+				+						
115	Σ53	CC		75							+							
116	Σ55	CC		71				+				+						
117	Σ66	GG		61				+			+							
118	Σ68	GG	Θ	93				+										
119	Σ74	GG																
120	Σ87	GG																
121	Σ96	GG																
122	Σ100	GG																
123	Σ110	GG																
124	Σ152	GC	A															
125	Σ158	GG	A															
126	Σ167	GG	A															
127	Σ183	GG	A															
128	Σ186	GG	Θ															
129	Σ190	GG	A															
130	Σ192	GG	A															
131	Σ204	GG																
132	Σ206	GG																
133	Σ278	GG	Θ	92														
134	Σ310	CC																
135	MI1	CC	Θ					+	130	65	-		185	112	38	176		-
136	MI2	GC	A	50				+	120	80	-		200	156	40	119		-
137	MI3	GG	A	67				+	150	80	-		167	110	39	88		-
138	MI4	GG	A	62				+	130	80	+		130	79	31	99		-
139	MI7	GG	A	62				+	150	90	+		176	127	34	76		-
140	MI8	GG	Θ	70				+	85	65	-		160	107	36	87		+
141	MI9	GG	A	53							+		213	150	32	155		-

Διερεύνηση πιθανής συσχέτισης του πολυμορφισμού miR-146a rs2910164 G>C με τη Στεφανιαία Νόσο στον ελληνικό πληθυσμό

A/A	ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΒΑΡΟΣ	ΥΨΟΣ	ΔΜΣ	ΥΠΕΡΤΑΣΗ	ΣΥΣΤΟΛΙΚΗ	ΔΙΑΣΤΟΛΙΚΗ	ΚΑΠΝΙΣΜΑ	ΣΔ	ΧΟΛΗΣΤΕΡΙΝΗ	LDL	HDL	ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΑ	ΕΜΦΡΑΓΜΑ	ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ
142	MI10	GG	A	50							+		294	242	37	416		-
143	ΣΤΑΪΚΟ 1112	GG																
144	ΣΤΑΪΚΟ 1211	GC																
145	ΣΤΑΪΚΟ 1079	GG																
146	ΣΤΑΪΚΟ 1210	GC																
147	ΣΤΑΪΚΟ 1110	GC																
148	ΣΤΑΪΚΟ 1102	GC																
149	ΣΤΑΪΚΟ 1109	GG																
	Μέσος όρος			61,55	84,26		28,57		121,81	89,49			190,82	135,38	40,65	130,45		

## Βιβλιογραφία

- (n.d.). Ανάκτηση από <https://www.southerncross.co.nz/AboutTheGroup/HealthResources/MedicalLibrary/tabid/178/vw/1/ItemID/191/>.
- (n.d.). Ανάκτηση από <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/007115.htm>.
- Eric M. Small and Eric N. Olson. (2011). Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature*.
- van Solingen, Seghers L, Bijkerk R, Duijs JM, Roeten MK, van Oeveren-Rietdijk AM, Baelde HJ, Monge M, Vos JB, de Boer HC, Quax PH, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ. (2009). Antagomir-mediated silencing of endothelial cell specific microRNA-126 impairs ischemia-induced angiogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*.
- Ali Sheikh Sayed, Ke Xia, Umme Salma, Tianlun Yang, Jun Peng. (2014). Diagnosis, Prognosis and Therapeutic Role of Circulating miRNAs in Cardiovascular Diseases. *Heart, Lung and Circulation*.
- Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*.
- Ana Eulalio, Eric Huntzinger, Elisa Izaurralde. (2008). Getting to the Root of miRNA-Mediated Gene Silencing. *Cell*.
- Angelika Bonauer, Guillaume Carmona, Masayoshi Iwasaki, Marina Mione, Masamichi Koyanagi, Ariane Fischer, Jana Burchfield, Henrik Fox, Carmen Doebele, Kisho Ohtani, Emmanouil Chavakis, Michael Potente, Marc Tiwa, Carmen Urbich, Andreas M. Zeiher. (2009). MicroRNA-92a Controls Angiogenesis and Functional Recovery of Ischemic Tissues in Mice. *Science*.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*.
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*.
- Betts, J. G. (2014). *Anatomy & physiology*.
- Bhatia, Sujata K . (2010). Biomaterials for clinical applications. *New York: Springer*.
- Braunwald, E. (1997). *Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, Fifth Edition*.
- Bríd M. Ryan, Ana I. Robles and Curtis C. Harris. (2010). (Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nature*.
- Campbell, R. U. (2010). *ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΜΟΣ Ι*.

- Cong Yuea, M. W. (2011). Polymorphism of the pre-miR-146a is associated with risk of cervical cancer in a Chinese population. *Gynecologic Oncology*.
- Cullen, B. R. (2004). Transcription and Processing of Human microRNA Precursors. *Molecular cell*.
- Cunrong Chen, H. H. (2014). Association of microRNA Polymorphisms with the Risk of Myocardial Infarction in a Chinese Population . *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*.
- D H Krüger, T. A. (1983). Bacteriophage survival: multiple mechanisms for avoiding the deoxyribonucleic acid restriction systems of their hosts. *Microbiol Rev*.
- Davide Cacchiarelli, Ivano Legnini, Julie Martone, Valentina Cazzella, Adele D'Amico, Enrico Bertini, Irene Bozzoni. (2011). miRNAs as serum biomarkers for Duchenne muscular dystrophy. *EMBO press*.
- [en.wikipedia.org/wiki/Coronary\\_circulation](http://en.wikipedia.org/wiki/Coronary_circulation). (n.d.). Ανάκτηση από Wikipedia: [en.wikipedia.org](http://en.wikipedia.org)
- Farah Parveen and Suraksha Agrawal. (2014). Recurrent Miscarriage and Micro-RNA Among North Indian Women. *Reproductive Sciences*.
- Faxon, D. P. (2004, June 1). Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Executive Summary: Atherosclerotic Vascular Disease Conference Proceeding for Healthcare Professionals From a Special Writing Group of the American Heart Association. *Circulation*.
- Fengying Zhou, H. Z. (2012). A Functional Polymorphism in Pre-miR-146a Is Associated with Susceptibility to Gastric Cancer in a Chinese Population. *DNA AND CELL BIOLOGY*.
- Fulu Dong, Yuan Zhang<sup>1</sup>, Fei Xia, Yi Yang, Sidong Xiong, Liping Jin and Jinping Zhang. (2014). Genome-wide miRNA profiling of villus and decidua of recurrent spontaneous abortion patients. *Reproduction*.
- Global, r. a.-s.-c.-s.-2. (2015). *Lancet*.
- GUYTON, A. (1984). *ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ*. Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας.
- Hickman, R. K. (2011). *ΖΩΟΛΟΓΙΑ Ολοκληρωμένες Αρχές*. Utopia.
- Hishida, A. (2013). Combined Effect of miR-146a rs2910164 G/C Polymorphism and Toll-like Receptor 4 +3725 G/C Polymorphism on the Risk of Severe Gastric Atrophy in Japanese. *Nature*.
- Hong Guo, K. W. (2010). A functional variant in microRNA-146a is associated with risk of esophageal squamous cell carcinoma in Chinese Han. *Familial Cancer*.



Hong Zhi, L. W. (2011). Polymorphisms of miRNAs genes are associated with the risk and prognosis of coronary artery disease. *Clinical Research in Cardiology*.

[http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw/php/mirna\\_entry.php?acc=MI0000477](http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw/php/mirna_entry.php?acc=MI0000477). (n.d.).  
Ανάκτηση από  
[http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw/php/mirna\\_entry.php?acc=MI0000477](http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw/php/mirna_entry.php?acc=MI0000477)

<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/detail.php?mirtid=MIRT000006>. (n.d.).  
Ανάκτηση από  
<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/detail.php?mirtid=MIRT000006>

[http://www.genenames.org/cgi-bin/gene\\_symbol\\_report?q=data/hgnc\\_data.php&hgnc\\_id=HGNC:31533](http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?q=data/hgnc_data.php&hgnc_id=HGNC:31533).  
(n.d.). Ανάκτηση από [http://www.genenames.org/cgi-bin/gene\\_symbol\\_report?q=data/hgnc\\_data.php&hgnc\\_id=HGNC:31533](http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?q=data/hgnc_data.php&hgnc_id=HGNC:31533)

[http://www.genenames.org/cgi-bin/gene\\_symbol\\_report?q=data/hgnc\\_data.php&hgnc\\_id=HGNC:32079](http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?q=data/hgnc_data.php&hgnc_id=HGNC:32079).  
(n.d.). Ανάκτηση από [http://www.genenames.org/cgi-bin/gene\\_symbol\\_report?q=data/hgnc\\_data.php&hgnc\\_id=HGNC:32079](http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?q=data/hgnc_data.php&hgnc_id=HGNC:32079)

[http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna\\_entry.pl?acc=MI0000477](http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000477). (n.d.). Ανάκτηση  
από [http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna\\_entry.pl?acc=MI0000477](http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000477)

[http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna\\_entry.pl?acc=MI0003129](http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0003129). (n.d.). Ανάκτηση  
από [http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna\\_entry.pl?acc=MI0003129](http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0003129)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/probe/doc/TechRFLP.shtml>. (n.d.).

<http://www.nichd.nih.gov>. (2012). Ανάκτηση από  
<http://www.nichd.nih.gov/health/topics/pregnancyloss/conditioninfo/Pages/risk.aspx>:  
<http://www.nichd.nih.gov/health/topics/pregnancyloss/conditioninfo/Pages/risk.aspx>

[https://en.wikipedia.org/wiki/Gel\\_electrophoresis](https://en.wikipedia.org/wiki/Gel_electrophoresis). (n.d.).

<https://www.kapabiosystems.com/product-applications/products/pcr-2/kapa-taq-pcr-kits/>. (n.d.). Ανάκτηση από <https://www.kapabiosystems.com/product-applications/products/pcr-2/kapa-taq-pcr-kits/>

<https://www.neb.com/products/r0156-saci#tabselect0>. (n.d.).

Huang S, Z. S. (2015). Association of the genetic polymorphisms in pre-microRNAs with risk of ischemic stroke in a Chinese population. *PLoS One*.

- Jing Xu, Z. H. (2009). Functional Variant in microRNA-196a2 Contributes to the Susceptibility of Congenital Heart Disease in a Chinese Population. *Human Mutation*.
- Julia Winter, Stephanie Jung, Sarina Keller, Richard I. Gregory and Sven Diederichs. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature*.
- Ke Lv, Yingjun Guo, Yiliang Zhang, Kaiyu Wang, Yin Jia, Shuhan Sun. (2008). Allele-specific targeting of hsa-miR-657 to human IGF2R creates a potential mechanism underlying the association of ACAA-insertion/deletion polymorphism with type 2 diabetes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- L. Chen and Y.-T. Wu. (2013). Association of genetic polymorphisms in microRNAs precursor with the risk and prognosis of coronary heart disease. *Journal of Xi'an Jiaotong University*.
- L. Hamann, C. G. (2014). A micro RNA-146a polymorphism is associated with coronary restenosis. *Int J Immunogenet*.
- L. Li, X.-P. Chen & Y.-J. Li. . (2010). MicroRNA-146a and Human Disease. *Scandinavian Journal of Immunology*.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V; Feinbaum; Ambros. (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*.
- Lili Cui, Y. L. (2014). A Functional Polymorphism in the Promoter Region of MicroRNA-146a Is Associated with the Risk of Alzheimer Disease and the Rate of Cognitive Decline in Patients. *PLoS One*.
- Lina Wang, Hong Zhi, Yongjun Li, Genshan Ma, Xingzhou Ye, Xiaojin Yu, Tian Yang, Han Jin, Zuhong Lu, Pingmin Wei. (2014). Polymorphism in miRNA-1 target site and circulating miRNA-1 phenotype are associated with the decreased risk and prognosis of coronary artery disease. *Int J Clin Exp Pathol*.
- Lippincott Williams & Wilkins. (2012). *The Johns Hopkins Manual of Gynecology and Obstetrics (4 ed.)*.
- Maegdefessel, L. (2014). the emerging role of microRNAs in cardiovascular disease. *Journal of INTERNAL MEDICINE*.
- Maria I. Almeida, b, Rui M. Reis, c, George A. Calin. (2011). MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers. *MicroRNA in Environmental Mutagenesis*.
- María José Bueno, Ignacio Pérez de Castro & Marcos Malumbres. (2008). Control of cell proliferation pathways by microRNAs. *Cell Cycle*.

- Mei-Hua Bao, Y. X.-S.-Q.-Y.-M. (2015). Meta-Analysis of miR-146a Polymorphisms Association with Coronary Artery Diseases and Ischemic Stroke. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Meister, G. (2013). Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nature Reviews Genetics*.
- Natascha Bushati and Stephen M. Cohen. (2007). microRNA Functions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*
- ncbi. (n.d.). Ανάκτηση από Polymerase Chain Reaction (PCR): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>
- Pei-Shi Hunga, d. K.-W.-Y.-H.-J.-C. (2012). Association between the rs2910164 polymorphism in pre-mir-146a and oral carcinoma progression. *Oral Oncology*.
- Peter Brodersen and Olivier Voinnet. (2009). Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *NATURE REVIEWS: Molecular cell Biology*.
- Peter T. Nelson, Wang-Xia Wang and Bernard W. Rajeev. (2008). MicroRNAs (miRNAs) in Neurodegenerative Diseases. *Brain Pathology*.
- Phillips, T. (2008). Small Non-coding RNA and Gene Expression. *Nature*.
- Pray, L. A. (2008). Restriction Enzymes. *Nature Education*.
- Prithiksha Ramkaran, S. K. (2013). miR-146a Polymorphism Influences Levels of miR-146a, IRAK-1, and TRAF-6 in Young Patients with Coronary Artery Disease. *Cell Biochem Biophys*.
- Raquel T. Limaa, b, Sara Busaccac, Gabriela M. Almeidaa, Giovanni Gaudinod, Dean A. Fennelc, M. Helena Vasconcelosa. (2010). MicroRNA regulation of core apoptosis pathways in cancer. *European Journal of Cancer*.
- Roberts, R. (1976). Restriction endonucleases. *Critical Reviews in Biochemistry*.
- Ruixia Zhu, X. L. (2014). miR-146a and miR-196a2 Polymorphisms in Patients with Ischemic Stroke in the Northern Chinese Han Population. *Neurochem Res*.
- Russell. (2005). *iGenetics*.
- S. Jiménez-Morales, R. Gamboa-Becerra, V. Baca, B. E. Del Río-Navarro, D. Y. López-Ley, R. Velázquez-Cruz, Y. Saldaña-Alvarez, G. Salas-Martínez and L. Orozco. (2012). MiR-146a polymorphism is associated with asthma but not with systemic lupus erythematosus and juvenile rheumatoid arthritis in Mexican patients. *Tissue Antigens*.

- Salvatore De Rosa, Antonio Curcio, Ciro Indolfi. (2014). Emerging Role of MicroRNAs in Cardiovascular Diseases. *Circulation Journal*.
- Stephan Fichtlscherer, Salvatore De Rosa, Henrik Fox, Thomas Schwietz, Ariane Fischer, Christoph Liebetrau, Michael Weber, Christian W. Hamm, Tino Röxe, Marga Müller-Ardogan, Angelika Bonauer, Andreas M. Zeiher, Stefanie Dimmeler. (2010). Circulating MicroRNAs in Patients With Coronary Artery Disease. *American heart association*.
- T Paranjape, F J Slack, J B Weidhaas. (2009). MicroRNAs: tools for cancer diagnostics. *Gut*.
- Tabor A, Alfirevic Z . (2010). Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques. *Fetal diagnosis and therapy*.
- Thomas Spruce, Barbara Pernaute, Aida Di-Gregorio, Bradley S. Cobb, Matthias Merkenschlager, Miguel Manzanares, Tristan A. Rodriguez. (2010). An Early Developmental Role for miRNAs in the Maintenance of Extraembryonic Stem Cells in the Mouse Embryo. *Cell*.
- UNIVERSITY of MARYLAND MEDICAL CENTER. (n.d.). Ανάκτηση από UNIVERSITY of MARYLAND MEDICAL CENTER: <https://umm.edu/health/medical/reports/articles/coronary-artery-disease>
- Vander, S. L. (2011). *Φυσιολογία του ανθρώπου*. Π.Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ .
- VociP, B. C. (1995). Papillary muscle perfusion pattern. A hypothesis for ischemic papillary muscle dysfunction.
- Wong. (2014, May ). Epidemiological studies of CHD and the evolution of preventive cardiology. *Nature*.
- Xing-dong Xiong, M. C.-p.-m.-l. (2014). A common variant in pre-miR-146 is associated with coronary artery disease risk and its mature miRNA expression. *Mutation Research*.
- YEE SOO CHAE, J. G.-S. (2013). A miR-146a Polymorphism (rs2910164) Predicts Risk of and Survival from Colorectal Cancer. *Anticancer Research*.
- Yong Zhao, D. S. (2007). A developmental view of microRNA function. *Trends in biochemical Sciences*.
- Young Joo Jeon, O. J. (2012). Association of the miR-146a, miR-149, miR-196a2, and miR-499 Polymorphisms With Ischemic Stroke and Silent Brain Infarction Risk. *American Heart Association Journal*.
- Young Joo Jeona, Yi Seul Choia, HyungChul Raha, Su Yeoun Kima, Dong Hee Choic, Sun Hee Chac, Ji Eun Shinc, Sung Han Shimd, Woo Sik Leed, Nam

- Keun Kim. (2012). Association study of microRNA polymorphisms with risk of idiopathic recurrent spontaneous abortion in Korean women. *Gene*.
- Yun Liu, Y. M.-X.-M.-M. (2013). Genetic Polymorphisms in Pre-microRNAs and Risk of Ischemic Stroke in a Chinese Population. *J Mol Neurosci*.
- Yuqing He Jie Yang, D. K. (2015). Association of miR-146a rs2910164 polymorphism with cardio-cerebrovascular diseases: A systematic review and meta-analysis. *Gene*.
- Zevitz, M. E. (2014). Ventricular Fibrillation. *Medscape*.
- Zhang, C. (2008). MicroRNAs: role in cardiovascular biology and disease. *Clinical Science*.
- Zhonghan Li & Tariq M. Rana. (2014). Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *NATURE REVIEWS* .
- Zhou B, R. L. (2010). Common genetic polymorphisms in pre-microRNAs were associated with increased risk of dilated cardiomyopathy. *Clin Chim Acta*.
- ZSUZSA ORSÓS, I. S. (2013). Association of pre-miR-146a rs2910164 Polymorphism with the Risk of Head and Neck Cancer. *Anticancer Research*.
- Καναβάκης, Κ.-Τ. Κ.-Μ. (2005). *ΓΕΝΕΤΙΚΗ Συμβουλευτική-5ο μετεκπαιδευτικό σεμινάριο γενετικής*.
- Παταργιάς, Αλεπόπου. (1998). *ΓΕΝΕΤΙΚΗ Ανθρώπου*.
- Φωτούλα, Μ. (2010). Επιδημιολογικά δεδομένα των καρδιαγγειακών νοσημάτων στους ηλικιωμένους. *ΤΟ ΒΗΜΑ ΤΟΥ ΑΣΚΛΗΠΙΟΥ*.