



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

**Α΄ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΘΗΝΩΝ «ΛΑΪΚΟ»**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Διερεύνηση του ρόλου των microRNAs στη ρύθμιση γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη ανευρύσματος κοιλιακής αορτής»

**ΛΕΓΑΚΗ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ
Βιολόγος**



ΑΘΗΝΑ 2019

Αίτηση Διδακτορικής Διατριβής: 9/9/2015

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 5/11/2015

Δήλωση Θέματος Διδακτορικής Διατριβής: 13/1/2016

1^η Έκθεση Προόδου: 3/11/2016

2^η Έκθεση Προόδου: 1/11/2017

3^η Έκθεση Προόδου: 12/11/2018

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

1. Χρήστος Κλωνάρης

**Καθηγητής Αγγειοχειρουργικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου
Αθηνών (Επιβλέπων)**

2. Μαρία Γαζούλη

**Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Αθηνών**

3. Θεόδωρος Δ. Λιακάκος

**Καθηγητής- Διευθυντής Α΄ Χειρουργικής Κλινικής Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Αθηνών**

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

1. Λιακάκος Θεόδωρος-Κων/νος

2. Κυριακοπούλου Λυμπέρη Μαρία

3. Κλωνάρη Χρήστος








4. Γεωργόπουλος Σωτήριος

5. Γαζούλη Μαρία

6. Μπακογιάννης Χρήστος

7. Κώτσης Θωμάς

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

 ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ,
ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝ
ΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙ
ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ ΉΓΗΣΑΣΘ
ΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗ
Ν ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΥΤΕΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ
ΕΕΙΝ ΑΡΡΗΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ,
ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥ
ΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ
ΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝ
ΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΛΟ
ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ.
ΔΙΔΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ
ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ
ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ, ΕΙΡΪΕΙΝ.  ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ
ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ
ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥ
ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ.  ΑΓΝΩΣ Δ
Ε ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝ
ΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ.  ΟΥ ΤΕΜΕΝ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘ
ΙΛΗΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡ
ΗΪΙΟΣ ΤΗΣΔΕ.  ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ,
ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ
ΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ, Τ
ΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΔΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥ
ΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡ
ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ.  Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ,
Η ΙΔΩ, Η ΔΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΤΗΣ ΚΑΤΑ Β
ΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Δ ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ
ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟ
ΙΔΥΤΑ.  ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕ
Δ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘ
ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ Π
ΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙ
ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

Όρκος του Ιπποκράτη - Μεταφρασμένο κείμενο

«Ορκίζομαι στο θεό Απόλλωνα τον ιατρό και στο θεό Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και επικαλούμενος τη μαρτυρία όλων των θεών ότι θα εκτελέσω κατά τη δύναμη και την κρίση μου τον όρκο αυτόν και τη συμφωνία αυτή. Να θεωρώ το διδάσκαλό μου της ιατρικής τέχνης ίσο με τους γονείς μου και την κοινωνό του βίου μου. Και όταν χρειάζεται χρήματα να μοιράζομαι μαζί του τα δικά μου. Να θεωρώ την οικογένειά του αδέρφια μου και να τους διδάσκω αυτήν την τέχνη αν θέλουν να την μάθουν χωρίς δίδακτρα ή άλλη συμφωνία. Να μεταδίδω τους κανόνες ηθικής, την προφορική διδασκαλία και όλες τις ιατρικές γνώσεις στους γιους μου, στους γιους του δασκάλου μου και στους εγγεγραμμένους μαθητές που πήραν τον ιατρικό όρκο, αλλά σε κανέναν άλλο. Θα χρησιμοποιώ τη θεραπεία για να βοηθήσω τους ασθενείς κατά τη δύναμη και την κρίση μου, αλλά ποτέ για να βλάψω ή να αδικήσω. Ούτε θα δίνω θανατηφόρο φάρμακο σε κάποιον που θα μου το ζητήσει, ούτε θα του κάνω μία τέτοια υπόδειξη. Παρομοίως, δε θα εμπιστευτώ σε έγκυο μέσο που προκαλεί έκτρωση. Θα διατηρώ αγνή και άσπιλη και τη ζωή και την τέχνη μου. Δε θα χρησιμοποιώ νυστέρι ούτε σε αυτούς που πάσχουν από λιθίαση, αλλά θα παραχωρώ την εργασία αυτή στους ειδικούς της τέχνης. Σε όσα σπίτια πηγαίνω, θα μπαίνω για να βοηθήσω τους ασθενείς και θα απέχω από οποιαδήποτε εσκεμμένη βλάβη και φθορά, και ιδίως από γενετήσιες πράξεις με άνδρες και γυναίκες, ελεύθερους και δούλους. Και όσα τυχόν βλέπω ή ακούω κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή και πέρα από τις επαγγελματικές μου ασχολίες στην καθημερινή μου ζωή, αυτά που δεν πρέπει να μαθευτούν παραέξω δε θα τα κοινοποιώ, θεωρώντας τα θέματα αυτά μυστικά. Αν τηρώ τον όρκο αυτό και δεν τον παραβώ, ας χαιρώ πάντοτε υπολήψεως ανάμεσα στους ανθρώπους για τη ζωή και για την τέχνη μου. Αν όμως παραβώ και επιορκήσω, ας πάθω τα αντίθετα.»

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Διδακτορικού Διπλώματος Ειδίκευσης του Τμήματος Ιατρικής, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών στην Α΄ Χειρουργική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «ΛΑΪΚΟ» σε συνεργασία με το Εργαστήριο Βιολογίας κατά τα ακαδημαϊκά έτη 2015- 2019, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Χρήστου Κλωνάρη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Χρήστο Κλωνάρη για την ανάθεση της συγκεκριμένης εργασίας, για τον συμβουλευτικό του ρόλο αλλά και τη συμπαράσταση του. Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον κ. Θεόδωρο Δ. Λιακάκο, ο οποίος δέχτηκε να εκπονηθεί η παρούσα διατριβή στην Α΄ Χειρουργική Κλινική την οποία και διευθύνει.

Συνεχίζοντας, αισθάνομαι ότι οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κ. Μαρία Γαζούλη για τη χαρά και την τιμή να με δεχθεί και να με εμπιστευτεί ως μέλος της ερευνητικής της ομάδας. Την ευχαριστώ ειλικρινά που στάθηκε δίπλα μου σημαντική αρωγός "φωτίζοντάς" μου τον δρόμο της επιστήμης. Η παρουσία της κ. Γαζούλη στην παρούσα διατριβή αλλά και καθόλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου ήταν πολύτιμη καθώς χωρίς την καθοδήγηση της, τις υποδείξεις και την υποστήριξη της δε θα είχα λάβει τόσο σημαντικές γνώσεις και πλούσια εμπειρία.

Θα ήταν αμέλεια να μην ευχαριστήσω για την άψογη συνεργασία όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιολογίας, και ιδιαίτερω τους υποψήφιους διδάκτορες Άννα Σιόζιου, Έκτορα Κατηφελή, Νικόλαο Ανδρέου και Παναγιώτη Αντωνίου για την αμέριστη συμπαράσταση τους αλλά και για το φιλικό και συνεργατικό κλίμα που είχαμε καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Χωρίς αυτούς θα ήταν αδύνατη η διεκπεραίωση αυτής της διατριβής.

Τέλος, ένα μεγάλο και από βάθους καρδιάς ευχαριστώ στην οικογένειά μου και το σύντροφο μου, που ήταν δίπλα μου σε όλη την πορεία μου μέχρι σήμερα, προσφέροντας μου συνεχώς αγάπη και συμπαράσταση. Χωρίς αυτούς, η εκπλήρωση των σπουδών μου θα έμοιαζε ουτοπική!

Η ερευνητική εργασία υποστηρίχτηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛΙΔΕΚ) και από τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας (ΓΓΕΤ), στο πλαίσιο της Δράσης «Υποτροφίες ΕΛΙΔΕΚ Υποψηφίων Διδασκόντων» (74100/2017).



Η κάτωθι δημοσίευση αποτελεί μέρος της Διδακτορικής Διατριβής :

Legaki E, Klonaris C, Athanasiadis D, Patelis N, Sioziou A, Liakakos T, Gazouli M. DAB2IP Expression in Abdominal Aortic Aneurysm: EZH2 and mir-363-3p as Potential Mediators. *In Vivo*. 2019; 33(3):737-742. doi: 10.21873/invivo.11533.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

1. Προσωπικά Στοιχεία

Επώνυμο: Λεγάκη

Όνομα: Ευαγγελία

Ημερομηνία Γέννησης: 31 Μαρτίου 1989

Τόπος Γέννησης: Μαρούσι, Αττικής

Υπηκοότητα: Ελληνική

Οικογενειακή Κατάσταση: Άγαμη

Δ/ση Διαμονής: Καβάφη 1, τ.κ:12136, Περιστερί, Ελλάδα

Τηλ.: 2105775806, 6976056520

E-mail: lia.lgk89@gmail.com

2. Σπουδές-Σταδιοδρομία

Διδακτορικές σπουδές

11/2015-σήμερα

Διδακτορικές σπουδές στο Τμήμα Ιατρικής του Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Α' Χειρουργική Κλινική Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών με τίτλο: « Διερεύνηση του ρόλου των microRNAS στη ρύθμιση γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη ανευρύσματος κοιλιακής αορτής.

Μεταπτυχιακές σπουδές

01/2013- 06/2015

Μεταπτυχιακές σπουδές στο Μεταπτυχιακές σπουδές στο Τμήμα Ιατρικής του Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με θέμα: «Διαχείριση περιβαλλοντικών θεμάτων με επιπτώσεις στην υγεία». Βαθμός: 9,20 (Άριστα)

Τίτλος σπουδών

09/2006-12/2011

Εγγραφή-Έναρξη σπουδών στη Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών. Η νόμιμη διάρκεια του ανωτέρω κύκλου σπουδών είναι τετραετής. Απόκτηση πτυχίου με βαθμό Έξι και Τριάντα Οκτώ εκατοστά (6,38).

Εγκύκλιες σπουδές

2003-2006

12^ο Ενιαίο Λύκειο Περιστερίου. Απολυτήριο με Γενικό Βαθμό «Άριστα» Δεκαοχτώ και Εννέα Δέκατα (18,9).

3. Εργασιακή εμπειρία

- Μοριακές αναλύσεις στα πλαίσια του έργου Κ.Α 13440 με φορέα χρηματοδότησης την εταιρεία Istomedica.
- Νοέμβριος 2012-Ιούνιος 2015 : Εθελοντική εργασία ως βοηθός στις εργαστηριακές ασκήσεις Βιολογίας της Ιατρικής των πρωτοετών φοιτητών.

4. Ξένες Γλώσσες- Τεχνικές γνώσεις

- Άριστη γνώση αγγλικής γλώσσας.
- Μέτρια γνώση γαλλικής γλώσσας.
- Κάτοχος πιστοποιητικού γνώσης χειρισμού Η/Υ από το Cambridge.(Cambridge International Diploma in IT Skills) στα παρακάτω γνωστικά αντικείμενα: Χρήση Η/Υ και διαχείριση αρχείων, Επεξεργασία κειμένου (Microsoft word), Υπολογιστικά φύλλα (Microsoft excel), Υπηρεσίες διαδικτύου (MS Internet explorer, Microsoft outlook), Παρουσιάσεις (Microsoft power point) Βάσεις δεδομένων (Microsoft access)

5. Βραβεία- υποτροφίες - διακρίσεις

- 2017 Posters of Distinction for the study: "Association of mir-146 rs2910164, miR-119a rs11614913 and miR-221 rs113054794 polymorphisms with anti - TNF treatment response in a Greek population with Crohn's disease". FALK Symposium 206 - Madrid/Spain: From the New and Complex Concepts to the Real Patient: Science and Clinic in IBD
- Υποτροφία για τη διδακτορική διατριβή με τίτλο: «Διερεύνηση του ρόλου των microRNAs στη ρύθμιση γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη ανευρύσματος κοιλιακής αορτής» από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛΙΔΕΚ) και τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας **στο πλαίσιο της Δράσης «Υποτροφίες ΕΛΙΔΕΚ Υποψηφίων Διδακτόρων» (74100/2017)**.
- Υποτροφία από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών για τις μεταπτυχιακές σπουδές βάσει εξατομικευμένης αξιολόγησης.

6. Εκπαιδευτικά Σεμινάρια

- Πρακτικό-Θεωρητικό Σεμινάριο: «Μέθοδοι Μικροβιολογικού Ελέγχου Νερών», 9-11 Νοεμβρίου 2009, Συνεδριακό Κέντρο Πανεπιστημίου Πατρών, Εργαστήριο Υγιεινής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστημίου Πατρών. Διοργάνωση: 1. Εταιρεία Μελέτης Μικροβιολογικής Ποιότητας Υδάτων, 2. Εργαστήριο Υγιεινής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Πατρών, 3. Διεύθυνση Υγείας, Νομαρχιακή Αυτοδιοίκηση Αχαΐας.
- Πρακτικό-Θεωρητικό Σχολείο: COST 929 Training Course in "Food and Environmental Virology", May 10 - May 14, 2010, Conference and Cultural Centre, Environmental Microbiology Unit-Laboratory of Hygiene, University of Patras.
- Joint action 2015 CHIP ME - EUPancreas SUMMER SCHOOL: "Health, Genomics and Ethics: Current research, controversies and public policy-making", September 10 – 15, 2015, Aegina, Greece
- COST Action BM1106 GENIEUR: "Molecular Methods in IBS Research: genetics, epigenetics and microbiota research", March 11 - 13, 2016, Heidelberg, Germany.
- Cost action BM1204: WG3 Training School "Genomic Medicine - Bridging research and the clinic" May 3- May 6, 2016 Portoroz, Slovenia

- Cost action CA1703: “Antisense Drugs Training School”, January 13- January 17, 2019, Stockholm

7. Δημοσιεύσεις σε Επιστημονικά Περιοδικά

1. Argyrou A, **Legaki E**, Koutserimpas C, Gazouli M, Papaconstantinou I, Gkiokas G, Karamanolis G. Polymorphisms of the BARX1 and ADAMTS17 locus genes in individuals with gastroesophageal reflux disease. *J Neurogastroenterol Motil.* 2019
2. **Legaki E**, Klonaris C, Athanasiadis D, Patelis N, Sioziou A, Liakakos T, Gazouli M. DAB2IP Expression in Abdominal Aortic Aneurysm: EZH2 and mir-363-3p as Potential Mediators. *In Vivo.* 2019 May-Jun;33(3):737-742.
3. Zografos E, Anagnostopoulos AK, Papadopoulou A, **Legaki E**, Zagouri F, Marinos E, Tsangaris GT, Gazouli M. Serum Proteomic Signatures of Male Breast Cancer. *Cancer Genomics Proteomics.* 2019 Mar-Apr;16(2):129-137.
4. Orfanoudaki E, Gazouli M, Foteinogiannopoulou K, Theodoraki E, **Legaki E**, Romanos I, Mouzas I, Koutroubakis IE. Infliximab trough levels are decreasing over time in patients with inflammatory bowel disease on maintenance treatment with infliximab. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2019 Feb;31(2):187-191. doi: 10.1097/MEG.0000000000001332
5. Moschovis D, Vasilaki E, Tzouvala M, Karamanolis G, Katifelis H, **Legaki E**, Vezakis A, Aravantinos G, Gazouli M. Association between genetic polymorphisms in long non-coding RNAs and pancreatic cancer risk. *Cancer Biomark.* 2018 Nov 12. doi: 10.3233/CBM-181959
6. Argyrou A, **Legaki E**, Koutserimpas C, Gazouli M, Papaconstantinou I, Gkiokas G, Karamanolis G. Risk factors for gastroesophageal reflux disease and analysis of genetic contributors. *World J Clin Cases* 2018; 6(8): 176-182
7. Sioziou A, Katifelis H, **Legaki E**, Patelis N, Athanasiadis D, Liakakos Th, Klonaris C, Gazouli M. Expression of miR21, miR122, miR146a and miR196 in Symptomatic Carotid Disease. *International Cardiovascular Research Journal.* 2018 12(1):7-12
8. Papaconstantinou I, Kapizioni C, **Legaki E**, Xourgia E, Karamanolis G, Gklavas A, Gazouli M. Association of miR-146 rs2910164, miR-196a rs11614913, miR-221 rs113054794 and miR-224 rs188519172 polymorphisms with anti-TNF treatment response in a Greek population with Crohn's disease. *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* 2017 Nov 6;8(4):193-200. doi: 10.4292/wjgpt.v8.i4.193.
9. **Legaki E**, Roubelakis MG, Theodoropoulos GE, Lazaris A, Kollia A, Karamanolis G, Marinos E, Gazouli M. Therapeutic Potential of Secreted Molecules Derived from Human Amniotic Fluid Mesenchymal Stem/Stroma Cells in a Mice Model of Colitis. *Stem Cell Rev.* 2016 Oct;12(5):604-612
10. Kokkinos P, Kozyra I, Lazic S, Söderberg K, Vasickova P, Bouwknecht M, Rutjes S, Willems K, Moloney R, de Roda Husman AM, Kaupke A, **Legaki E**, D'Agostino M, Cook N, von Bonsdorff CH, Rzeżutka A, Petrovic T, Maunula L, Pavlik I, Vantarakis A . Virological Quality of Irrigation Water in Leafy Green Vegetables and Berry Fruits Production Chains. *Food Environ Virol.* 2016 Oct 5.

11. **Legaki E**, Gazouli M. Influence of environmental factors in the development of inflammatory bowel diseases. Minireview. World J Gastrointest Pharmacol Ther 2016 February 6; 7(1): 112-125
12. Maragkoudaki M, Vaiopoulou A, Theodoropoulos GE., **Legaki E**, Sechi LA., Karamanolis G, Zografos G and Gazouli M. Specific detection of OCT4 isoforms in inflammatory bowel disease. Gut Pathog. 2015 Oct 1;7:25.
13. Rapti E, Gazouli M, **Legaki E**, Karamanolis G, Thomas D, Marinos E, and Papaconstantinou I. Association of Survivin Promoter Polymorphisms with Inflammatory Bowel Disease and Response to Antitumor Necrosis Factor Therapy,. Genetic Testing and Molecular Biomarkers. June 2015, 19(6): 339-343. doi:10.1089/gtmb.2015.0036.
14. **Legaki E**, Rapti E, Gazouli M. Survivin for chemotherapy efficacy in gastric cancer”,. Translational Gastrointestinal Cancer, 2015, 4(3):188-199 doi: 10.3978/j.issn.2224-4778.2015.02.01
15. **Legaki E**, Vaiopoulou A, Gazouli M. “Genetics of Cardiomyopathies, Heart Vessels and Brain, October -December 2013, p.73-79
16. Kokkinos P, Kozyra I, Lazic S, Bouwknecht M, Moloney R, Kaupke A, **Legaki E**, D’Agostino M, Cook N, Rzezutka A, Petrovic T, Vantarakis A. Harmonised investigation of the occurrence of human enteric viruses in leafy green vegetable supply chain in three European countries, Food Environmental Virology, 2012; 4(4):179-91.
17. Ziros P, Kokkinos P, **Legaki E**, Vantarakis A. Development of an optimized method for the detection of airborne viruses with real-time PCR analysis, Virology Journal, 2011, 8(1):369

8. Δημοσιεύσεις σε Διεθνή Συνέδρια

1. E. Zografos, A. Anagnostopoulos, A. Papadopoulou, **E. Legaki**, F. Zagouri, E. Marinos, G. Tsangaris, M. Gazouli. “Identification of serum proteome signatures of male breast cancer”, ESMO Breast Cancer 2019, Berlin, 2019
2. **E. Legaki**, G. Michalopoulos, K. Makris, M. Gazouli. “Vedolizumab levels and endoscopic and clinical remission in patients with Crohn’s disease and ulcerative colitis on vedolizumab therapy.” FALK Symposium 210: Crossing New Borders in IBD: Thoughts and Demands – From Mechanisms to Treatment, Lisbon, Portugal 2018
3. E. Orfanoudaki, M. Gazouli, K. Foteinogiannopoulou, E. Theodoraki, **E. Legaki**, I. Koutroubakis. “Infliximab trough levels are decreasing overtime in patients with inflammatory bowel disease on maintenance treatment with infliximab”. 13th Congress of ECCO, Vienna 2018. ECCO 2018
4. E. Orfanoudaki, M. Gazouli, K. Foteinogiannopoulou, E. Theodoraki, **E. Legaki**, I. Koutroubakis. “Infliximab trough levels and antibodies to infliximab in association with disease activity and mucosal healing in patients with inflammatory bowel disease”. 25th UEG Week, Barcelona, Spain, October 28 - November 1, 2017
5. AO. Konstantinidis, TS. Rallis, M. Gazouli, **E. Legaki**, GD. Brellou, I. Savvas, KK. Adamama-Moraitou, D. Pardali, AE. Jergens, K. Allenspach. “Serum Circulating MicroRNAs as a Marker for Canine Lymphocytic-Plasmacytic Inflammatory Bowel Disease”. 27th ECVIM-CA Congress, St Julian’s Malta, September 14- 16, 2017

6. **E. Legaki**, M. Gazouli, M. Doulapis, D. Athanasiadis, Th. Liakakos, C. Klonaris. "The role of miRNAs on translational regulation of LRP1 and DAB2IP in Abdominal Aortic Aneurysm". 66th International Congress of the European Society for Cardiovascular and Endovascular Surgery in conjunction with LIVE2017 Leading Innovative Vascular Education. Makedonia Palace Hotel, Thessaloniki, Greece May 11 - 14, 2017
7. A. Sioziou, **E. Legaki**, E. Katifelis, M. Gazouli, D. Athanasiadis, Th. Liakakos, C. Klonaris. "The differential expression of miRNAs in carotid artery disease". 66th International Congress of the European Society for Cardiovascular and Endovascular Surgery in conjunction with LIVE2017 Leading Innovative Vascular Education. Makedonia Palace Hotel, Thessaloniki, Greece May 11 - 14, 2017
8. I. Papaconstantinou, C. Kapizioni, **E. Legaki**, E. Xourgia, G. Karamanolis, A. Papailia, C. Tzathas, M. Gazouli. "Association of mir-146 rs2910164, miR-119a rs11614913 and miR-221 rs113054794 polymorphisms with anti-TNF treatment response in a Greek population with Crohn's disease". Falk Symposium 206: From the New and Complex Concepts to the Real Patient: Science and Clinic in IBD. March 31 – April 1, Madrid, Spain, 2017
9. **E. Legaki**, M. Roubelakis, G. Theodoropoulos, A.H. Lazaris, G. Karamanolis, E. Marinos, M. Gazouli. M. Gazouli. "The potential of secreted molecules of human amniotic fluid mesenchymal stem/stroma cells in IBD therapy". Falk Symposium 205- New treatment target in Gut and Liver Diseases, Luzern, October 21- 22, 2016
10. M. Gazouli, **E. Legaki**, M. Roubelakis, A. Lazaris, G. Karamanolis, E. Marinos, G. Theodoropoulos. "Therapeutic potential of the human amniotic fluid mesenchymal stem cells/stroma cells secreted molecules in a mice model of colitis". 11th Congress of ECCO, RAI Amsterdam, March 16 – 19, 2016
11. **E. Legaki**, P. Karatzas, G.J Mantzaris, K. Papamichael, N.P Anagnou, M. Gazouli. "Association of DNA methylation profile of genes involved in inflammation and autophagy with the response of Crohn's disease patients to infliximab" Falk Symposium 192- IBD 2014: Thinking Out of the Box , Paris, May 30 - 31, 2014
12. A.Vaiopoulou, **E.Legaki**, "Thiopurine S-methyltransferase activity in pediatric inflammatory bowel disease" Falk Symposium 192- IBD 2014: Thinking Out of the Box , Paris, May 30 - 31, 2014
13. I. Papaconstantinou, **E.Legaki**, E.Rapti, M.Gazouli, G. Karamanolis. "Polymorphisms of survivin promoter and Crohn's Disease" , Falk Symposium 192- IBD 2014: Thinking Out of the Box , Paris, May 30 - 31, 2014
14. P. Kokkinos, **E. Legaki**, A. Birmpa, M. Bouwknegt, K. Willems, R. Moloney, AM. de Roda HusmanHusman, A. D'Agostino, N. Cook, A. Vantarakis, "Fit for purpose risk assessment of viral pathogens for a vegetables production enterprise in Greece", International Conference on Predictive Modelling in Food, "Predictive microbiology in food: Today's tools to meet stakeholders' expectations", Paris, September 16-20, 2013.
15. P.Ziros, P. Kokkinos, **E.Legaki**, A. Vantarakis, "An optimized method for the detection of airborne viruses with an air sampler in combination with real time PCR analysis", International Environmental Conference: "Sustainable Development in Coastal Areas", Ioannina, June 29th – July 1st, 2011.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	9
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	19
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	21
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	23
1.1 Ανατομία.....	23
1.2 Το ανεύρυσμα	25
1.2.1 Ορισμός	25
1.2.2 Ιστορική αναδρομή.....	26
1.2.3 Επιδημιολογία	27
1.2.4 Παράγοντες κινδύνου.....	29
1.2.5 Παθοφυσιολογία	31
1.2.6 Συμπτωματολογία	34
1.2.7 Διάγνωση.....	35
1.3 Αντιμετώπιση ανευρύσματος.....	37
1.3.1 Ανοικτή χειρουργική αποκατάσταση	38
1.3.2 Ενδαγγειακή αποκατάσταση- EVAR	39
1.3.3 Επιπλοκές ανοικτής χειρουργικής αποκατάστασης	40
1.3.3 Επιπλοκές EVAR	43
1.4 Γενετική	45
1.4.1 Γενετικό υπόβαθρο ΑΚΑ	45
1.4.2 Επιγενετική	50
1.4.3 Non coding RNA	53
1.4.4 miRNAs.....	54
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	63
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	65
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	83
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	93
6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	99
7. ABSTRACT.....	101
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	102

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AKA		Ανεύρυσμα Κοιλιακής Αορτής
CTA	Computerized Tomographic Angiography	Υπολογιστική Αξονική Αγγειογραφία
DAB2IP	Disabled homolog 2-interacting protein	Απενεργοποιημένο ομόλογο 2-αλληλεπιδρούσας πρωτεΐνης
ECM	Extracellular Matrix	Εξωκυττάρια Θεμέλια Ουσία
EMT	Epithelial to mesenchymal transition	Επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση
EVAR	Endovascular Aneurysm Repair	Ενδαγγειακή Αποκατάσταση Ανευρύσματος
EZH2	Enhancer of Zeste Homolog 2	Ενισχυτής του Zeste Homolog 2
LRP1	Low Density Lipoprotein Receptor 1	Υποδοχέας 1 λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας
MMP	Matrix Metalloproteinase	Μεταλλοπρωτεϊνάσες μήτρας
SMC	Smooth Muscle Cell	Λεία μυϊκά κυτταρα
TSP	Thrombospondin	Θρομβοσπονδίνη
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cell	Αγγειακά Λεία Μυϊκά Κυτταρα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ανατομία

Η αορτή είναι η μεγαλύτερη σε μήκος και διάμετρο αυλού αρτηρία του ανθρώπινου σώματος με λειτουργία τη μεταφορά του οξυγονωμένου αίματος από τους πνεύμονες στους ιστούς για την ομαλή ανάπτυξη τους. Το αγγείο άρχεται από το ανώτερο τμήμα της αριστερής κοιλίας, αμέσως μετά την αορτική βαλβίδα και διακρίνεται σε δύο μεγάλα τμήματα, τη θωρακική αορτή και την κοιλιακή αορτή.

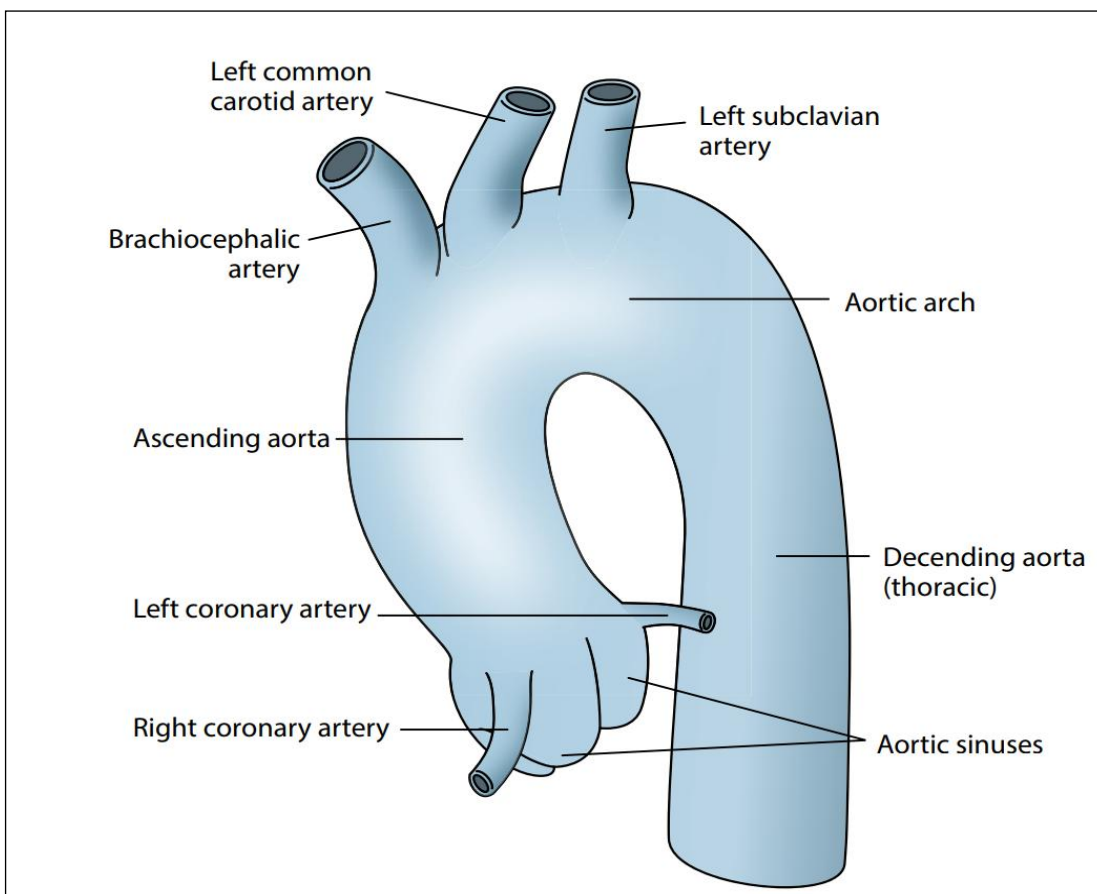
Η ανιούσα αορτή αποτελεί το πρώτο τμήμα της θωρακικής αορτής, έχει μήκος 5 εκατοστά και εκκινεί από την αορτική βαλβίδα, κατευθύνεται προς τα πάνω και δίνει δύο κλάδους, τη δεξιά και την αριστερή στεφανιαία αρτηρία. Στο τέλος της ανιούσας αορτής βρίσκεται το αορτικό τόξο, από το οποίο εκφύονται οι τρεις βασικοί κλάδοι (ανώνυμη αρτηρία, αριστερή καρωτίδα και αριστερή υποκλείδια αρτηρία) οι οποίοι ευθύνονται για την αιμάτωση του εγκεφάλου και των άνω άκρων.

Καθώς η αορτή αρχίζει την καθοδική της πορεία, στο ύψος του 4^{ου} θωρακικού σπονδύλου συναντάται η κατιούσα αορτή, η οποία έχει μήκος 20 περίπου εκατοστά και εκτείνεται μέχρι το διάφραγμα. Το τμήμα αυτό της αορτής αιματώνει κατά κύριο λόγο τη θωρακική μοίρα, διάφορους ιστούς του μεσοθωράκιου, πνευμονικούς βρόγχους και διαφραγματικές επιφάνειες.

Η κοιλιακή αορτή αποτελεί συνέχεια της θωρακικής αορτής η οποία εκκινεί από την υποδιαφραγματική περιοχή, στο κατώτερο όριο του 12^{ου} θωρακικού σπονδύλου, διέρχεται την κοιλιακή χώρα και καταλήγει στο λαγόνιο διχασμό, στο ύψος του 4^{ου} οσφυϊκού σπονδύλου όπου και διχάζεται στις δύο κοινές λαγόνιες αρτηρίες. Αποτελεί οπισθοπεριτοναϊκό όργανο σε όλο το μήκος της και στην πορεία της διαδρομής της η διάμετρος της μειώνεται σημαντικά καθώς πολλοί κλάδοι εκφύονται από αυτή. Χειρουργικά έχει καθιερωθεί ο διαχωρισμός της σε υπερνεφρικό και υπονεφρικό τμήμα, με όριο το σημείο έκφυσης των νεφρικών αρτηριών. Η μέση εγκάρσια διάμετρός της σε άρρενα ενήλικα υπερνεφρικά είναι 2.5 cm, υπονεφρικά 2 cm και πριν το διχασμό των λαγονίων αντίστοιχα στην τελική αορτή είναι 1.75 cm. Στις γυναίκες η διάμετρος είναι 2 έως 3mm μικρότερη. Η φυσιολογική διάμετρος της αορτής ποικίλλει και είναι συνάρτηση της ηλικίας, του φύλου και της επιφάνειας του σώματος.

Η κοιλιακή αορτή αποτελεί όργανο ζωτικής σημασίας για τον οργανισμό καθώς αιματώνει πολλαπλά όργανα του σώματος, όπως οι νεφροί, το ήπαρ, το πάγκρεας, τα

όργανα του γεννητικού και ουροποιητικού συστήματος καθώς και τα κάτω άκρα. Οι κλάδοι της κοιλιακής αορτής ταξινομούνται στους σπλαχνικούς οι οποίοι αποτελούνται από την κοιλιακή αρτηρία, την άνω μεσεντέρια, την κάτω μεσεντέρια, τη μέση επινεφρίδια, τη νεφρική, την έσω σπερματική και την ωθηκική αρτηρία (ανάλογα το φύλο), στη συνέχεια συναντάμε τους τοιχωματικούς κλάδους οι οποίοι συγκροτούνται από την κάτω φρενική αρτηρία, τις οσφυϊκές αρτηρίες και τη μέση ιερή αρτηρία και τους τελικούς κλάδους της κοιλιακής αορτής που αναφέρονται στις κοινές λαγόνιες αρτηρίες. [1,2]



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση της κοιλιακής αορτής. [3]

1.2 Το ανεύρυσμα

1.2.1 Ορισμός

Ανεύρυσμα καλείται η μόνιμη και εντοπισμένη διάταση μιας αρτηρίας με αύξηση της διαμέτρου της τουλάχιστον κατά 50% σε σύγκριση με τη φυσιολογική διάμετρο της αρτηρίας. Δεδομένου ότι η αορτική διάμετρος κυμαίνεται από 15 έως 24 mm, η υπονεφρική αορτή με διάμετρο μεγαλύτερη από 30mm θεωρείται ως ανευρυσματική. Αρτηριακή διάταση μικρότερη του 50% της φυσιολογικής διαμέτρου του αγγείου καλείται εκτασία, ενώ αρτηριομεγαλία χαρακτηρίζεται η διάχυτη αρτηριακή διάταση, η οποία πιθανών να συνοδεύεται από πολλαπλά εντοπισμένα αρτηριακά ανευρύσματα.

Με τον όρο «ανευρύσματα κοιλιακής αορτής» εννοούμε εκείνα που αφορούν το υπονεφρικό τμήμα της αορτής. Όταν οι εκφύσεις των νεφρικών αρτηριών περιλαμβάνονται στο ανεύρυσμα, χαρακτηρίζονται ως υπερνεφρικά. όταν το υγιές αορτικό τμήμα μεταξύ των εκφύσεων των νεφρικών αρτηριών και του ανευρύσματος («αυχέννας») έχει μήκος <0.5mm, τότε αποκαλούνται παρανεφρικά.

Ταξινόμηση

Σύμφωνα με την εξωτερική τους μορφολογία τα ανευρύσματα διακρίνονται σε

A. ατρακτοειδή

B. σακοειδή

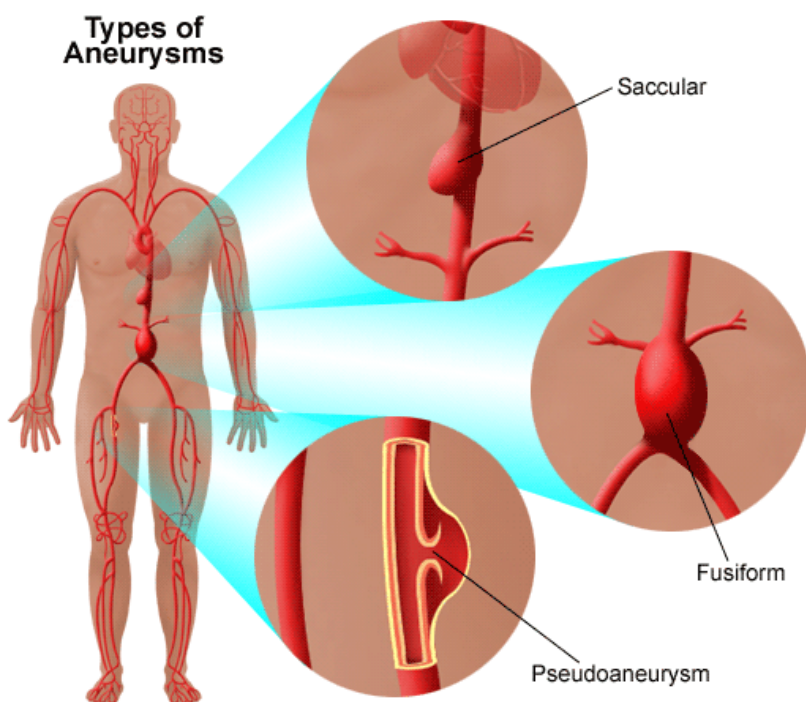
Ενώ σύμφωνα με τη δομή τους διακρίνονται σε

A. αληθή

B. ψευδή ανευρύσματα,

Στο σχηματισμό των γνήσιων ανευρυσμάτων συμμετέχουν και οι 3 αρτηριακοί χιτώνες, ενώ στα ψευδή το τοίχωμα αποτελείται από ινώδη συνδετικό ιστό, ο οποίος περιβάλλει ένα εξωαυλικό αιμάτωμα που επικοινωνεί με την αρτηρία και δημιουργείται με διαφυγή αίματος είτε μέσω ανασταμοτικού ελλείμματος είτε μετά από τραυματική ρήξη του αγγειακού τοιχώματος. Τα ανευρύσματα μπορούν να εντοπιστούν σε κάθε αρτηριακό τμήμα με μικρότερη ή μεγαλύτερη συχνότητα. Συχνότερα είναι εκείνα του υπονεφρικού τμήματος της κοιλιακής αορτής. Το 95% των ΑΚΑ εντοπίζονται κάτω από τις νεφρικές αρτηρίες, ενώ μόνο το 5% αφορά την υπόλοιπη κοιλιακή αορτή. Σε ποσοστό 50% τα ΑΚΑ συνδέονται με

ανευρύσματα των λαγονίων αρτηριών, ενώ σε ποσοστό 10% συνυπάρχουν με ανευρύσματα της θωρακικής αορτής. Επίσης τα ΑΚΑ σε ποσοστό 15% συνοδεύονται και από ανευρύσματα των περιφερικών αγγείων, συχνότερα της ιγνυακής αρτηρίας. [4]



Εικόνα 2. Τύποι ανευρύσματος: Σακοειδές, ατρακτοειδές και ψευδοανεύρυσμα. [stanfordhealthcare.org accessed May 2019]

1.2.2 Ιστορική αναδρομή

Τα ανευρύσματα ήταν γνωστά ήδη από την αρχή της ιστορικής περιόδου της ανθρωπότητας: υπάρχουν σχετικές αναφορές σε αιγυπτιακούς πάπυρους του 2500 π.Χ. Αργότερα η περιγραφή των διάφορων ανευρυσματικών τύπων και η θεραπεία μετατραυματικών, περιφερικών κυρίως, ανευρυσμάτων απασχόλησε μεγάλες μορφές των αρχαίων, βυζαντινών και μεσαιωνικών χρόνων. Η ιπποκράτειος σχολή, ο Γαληνός, ο Αντύλλος, ο Vesalius, ο John Hunter και ο sir Astley Cooper συνέβαλλαν στην εξέλιξη της ιατρικής γνώσης και τα ανευρύσματα. Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα ο Rudolf Matas, ο D'Arcy Power και ο Blackmore προσπάθησαν να βρουν διάφορους τρόπους θεραπείας των ανευρυσμάτων. Οι προσπάθειες όμως ήταν σε μεγάλο βαθμό ανεπιτυχείς. Ένα από τα πιο διάσημα θύματα της νόσου υπήρξε ο νομπελίστας διακεκριμένος φυσικός Albert Einstein. Στις 29 Μαρτίου 1951 ο Charles Dubost και οι συνεργάτες του αποκατέστησαν επιτυχώς ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής και έθεσαν τις βάσεις της σύγχρονης ανοικτής χειρουργικής θεραπείας. Έκτοτε η αποκατάσταση των ανευρυσμάτων έγινε με μια από τις πιο συχνές

και επιτυχής επεμβάσεις στην αγγειοχειρουργική. Το Σεπτέμβριο του 1990 ο αγγειοχειρουργός Juan Parodi στο Μπουένος Άιρες εφάρμοσε για πρώτη φορά την ενδαγγειακή θεραπεία σε ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής και ξεκίνησε μια νέα περίοδο, που διαπνέεται από τη σύγχρονη χειρουργική φιλοσοφία των ελάχιστα επεμβατικών τεχνικών.

1.2.3 *Επιδημιολογία*

Το ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής αποτελεί σημαντικότερη αιτία θνησιμότητας στο σύγχρονο κόσμο. Ο εκτιμώμενος επιπολασμός του ΑΚΑ προέρχεται από ιστορικές πληθυσμιακές μελέτες και ποικίλλει ευρέως. Οι διαφορές αυτές έγκειται στις διαφορές των επιμέρους μελετών ως προς τον ορισμό του ΑΚΑ και τα δημογραφικά χαρακτηριστικά όπως η ηλικία, το φύλο, το οικογενειακό ιστορικό των συμμετεχόντων στη μελέτη καθώς και η γεωγραφική περιοχή.

Μεταξύ 1951 και 1995, επιδημιολογικές μελέτες αποκάλυψαν ότι το ΑΚΑ είναι μια ασθένεια σε άνοδο, με μια σταθερή αύξηση στην εμφάνιση ανευρύσματος και τη θνησιμότητα. Σε παγκόσμια κλίμακα και κυρίως σε ανεπτυγμένες χώρες, η επίπτωση του ΑΚΑ φαίνεται να μειώθηκε τις τελευταίες δύο δεκαετίες, αλλά σε ορισμένες περιοχές, όπως η Λατινική Αμερική και οι υψηλού εισοδήματος χώρες της Ασίας ενδεχομένως αυξήθηκε. [5] Αξιοσημείωτο είναι ότι συνολικά, υπάρχει έλλειψη γνώσης σχετικά με την πραγματική επίπτωση του ΑΚΑ παγκοσμίως, καθώς οι διαθέσιμες αναφορές από μελέτες υπερηχογραφικής ανίχνευσης σε γυναίκες και άνδρες προέρχονται από περιορισμένο αριθμό χωρών.

Μια μετα-ανάλυση του 2013 έδειξε ότι περίπου το 4,8% του γενικού πληθυσμού εμφανίζει ΑΚΑ. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο συγκεντρωτικός επιπολασμός στην Αυστραλία είναι υψηλότερος από την Αμερική και την Ευρώπη. Ο συγκεντρωτικός επιπολασμός στις δυτικές χώρες είναι υψηλότερος από την Ασία. Στη λευκή φυλή το ΑΚΑ εμφανίζεται με υψηλότερη συχνότητα κατά 2 έως 3 φορές σε σχέση με τις υπόλοιπες, ενώ στους Αφροαμερικανούς και τους Ασιάτες είναι σπάνια η εμφάνιση της. Η μετα-ανάλυση αυτή έδειξε ότι ο επιπολασμός του ΑΚΑ μειώθηκε στην Ευρώπη από το 1988 έως το 2013. [6]

Το ανδρικό φύλο προσβάλλεται με μεγαλύτερη συχνότητα σε σχέση με το γυναικείο φύλο. Ο συγκεντρωτικός επιπολασμός του ΑΚΑ στους άντρες ανέρχεται στο 6,0% και είναι υψηλότερος από τα θηλυκά που εμφανίζουν 1,6% επιπολασμό. Οι υπερηχογραφικές μελέτες αναφέρουν πενταπλάσια συχνότητα εμφάνισης ΑΚΑ στους άντρες σε σύγκριση με τις γυναίκες. [7-9] Ωστόσο, το ποσοστό θνησιμότητας που σχετίζεται με ρήξη ΑΚΑ

αυξάνεται στις γυναίκες και το ποσοστό ρήξης είναι υψηλότερο στις γυναίκες από ότι στους άνδρες. [10,11] Η αντίστροφη τάση στην θνησιμότητα των γυναικών με ΑΚΑ σε σχέση με τους άντρες μπορεί να αντανakλά διαφορές στην έκθεση σε παράγοντες κινδύνου. Για παράδειγμα, οι τάσεις του καπνίσματος που αποτελεί σημαντικό κίνδυνο για την ανάπτυξη και ρήξη του ΑΚΑ δεν είναι οι ίδιες σε όλο τον κόσμο. Οι πρόσφατες δεκαετίες έχουν σημειώσει γενική πτώση στην κατανάλωση καπνού ανδρών με επιταχυνόμενη αύξηση του καπνίσματος μεταξύ των γυναικών στον αναπτυσσόμενο κόσμο. Έχει παρατηρηθεί μια έντονα γραμμική σχέση μεταξύ των χρονικών τάσεων στον επιπολασμό του καπνίσματος και της θνησιμότητας ΑΚΑ. [12]

Μια νεκροτομική μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη Σουηδία παρείχε τις πρώτες πληροφορίες για την επιδημιολογία του ΑΚΑ, με τον επιπολασμό στους άντρες ηλικίας 65 έως 74 ετών να είναι 4,7% φθάνοντας σε ένα μέγιστο ποσοστό 5,9% στους άνδρες από 80 έως 85 ετών και 1,2% στις γυναίκες ηλικίας 65 έως 74 ετών. [13] Οι πιο πρόσφατες υπερηχογραφικές μελέτες διαγιγνώσκουν το ΑΚΑ στο 1-2% όλων των ανδρών 65χρονών και στο 0,5% των γυναικών ηλικίας 70 ετών. Ωστόσο, μερικά άτομα διαγιγνώσκονται εκτός αυτών των μελετών, εγχειρίζονται πριν από την ηλικία των 65 ετών ή δεν συμμετέχουν καθόλου στις μελέτες, εμφανίζοντας ελαφρώς μειωμένο τον πραγματικό επιπολασμό στο γενικό πληθυσμό. [14] Στη Δανία, ο επιπολασμός ΑΚΑ είναι ελαφρώς υψηλότερος, στο 2,6% στους 65-χρονους άντρες και στο 0,9% σε γυναίκες 71 ετών. [15] Μια πρόσφατη πληθυσμιακή έρευνα της Σουηδίας, που συμπεριλάμβανε άντρες και γυναίκες, που υποβλήθηκαν ή όχι σε θεραπεία, έδειξε μικρή αύξηση στα άτομα με διάγνωση άθικτου ΑΚΑ με την πάροδο του χρόνου. [16] Αυτή η αύξηση πιθανόν οφείλεται στην εισαγωγή του προσυμπτωματικού ελέγχου, την ανάπτυξη διαγνωστικών εργαλείων και προγραμμάτων διαλογής αλλά και την αύξηση του μέσου όρου ζωής και όχι σε πραγματική γενική αύξηση της επίπτωσης του ΑΚΑ στον πληθυσμό. [14, 17]

Τα ΑΚΑ εμφανίζονται συχνότερα στα ηλικιωμένα άτομα, με κύριο αίτιο την αρτηριοσκλήρυνση και η συχνότητα εμφάνισης αυξάνει σημαντικά μετά την ηλικία των 50 ετών. Ο επιπολασμός στην ηλικιακή κατηγορία 65-74 χρόνια είναι ο υψηλότερος από ότι στις άλλες ηλικιακές ομάδες. Η πιθανότητα εμφάνισης ΑΚΑ στις ηλικίες 60-65 ετών είναι περίπου 13 φορές μεγαλύτερη. Μεταθανάτιες μελέτες έχουν δείξει ότι το 95% των θανάτων από ρήξη ΑΚΑ εμφανίζεται σε ηλικία 65 ετών ή άνω. Η επίπτωση ωστόσο αυξάνεται αναλογικά με την πάροδο της ηλικίας. Η πιθανότητα να υποστεί ρήξη ένα ΑΚΑ έχει υπολογισθεί σε 1 έως 21 περιστατικά ανά 100.000 άτομα ανά έτος. [18] Ένας εφάπαξ έλεγχος των ατόμων ηλικίας 60 έως 65 ετών συστήνεται για πρόγνωση καθώς έχει αποδειχθεί ότι είναι οικονομικά αποδοτικό. [19,20]

Η συχνότητα εμφάνισης ανευρυσμάτων με διαμέτρους μεταξύ 30 και 39 mm είναι υψηλότερη από τα ανευρύσματα με αορτική διάμετρο μεγαλύτερη από 40 mm. Τα συνολικά ποσοστά επικράτησης για ΑΚΑ με διάμετρο από 2,9 έως 4,9 εκατοστά κυμαίνονται από 1,3% για τους άνδρες ηλικίας 45 έως 54 ετών έως και 12,5% για τους άνδρες ηλικίας 75 έως 84 ετών. Τα συγκριτικά ποσοστά επιπολασμού για τις γυναίκες είναι 0% και 5,2% για τις αντίστοιχες ηλικιακές ομάδες. [21] Ο ρυθμός ανάπτυξης των κοιλιακών ανευρυσμάτων είναι σχετικά απρόβλεπτη με μεγάλη διατομική μεταβλητότητα, αλλά φαίνεται να αυξάνεται σε μεγαλύτερα ανευρύσματα. Ο μέσος ρυθμός αύξησης ΑΚΑ με διαμέτρους κάτω από 4 cm και χαμηλό κίνδυνο ρήξης. εκτιμάται ότι κυμαίνεται μεταξύ 0,28 και 0,38 cm/έτος. [22,23]

1.2.4 Παράγοντες κινδύνου

Η αιτιολογία του ΑΚΑ είναι άγνωστη. Ωστόσο, πολλοί παράγοντες κινδύνου σχετίζονται με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης. Στην πορεία των δεκαετιών πολλαπλά δημογραφικά χαρακτηριστικά καθώς και ιατρικές παράμετροι έχουν αναγνωρισθεί ως παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη ΑΚΑ.

Ηλικία και φύλο

Οι μελέτες πληθυσμού έδειξαν ότι ο επιπολασμός του ΑΚΑ είναι αμελητέος για άτομα κάτω των 60 ετών. Δύο ξεχωριστές μελέτες από τις ερευνητικές ομάδες του Singh και του Powell διαπίστωσαν την παρουσία ΑΚΑ μεγαλύτερα από 4 cm διάμετρο σε περίπου 1% των ανδρών, ηλικίας μεταξύ 55 και 64 ετών, με αξιοσημείωτη αύξηση του επιπολασμού κατά 2-4 % ανά δεκαετία στη συνέχεια. [7, 24]

Όσον αφορά το φύλο, ο επιπολασμός του ΑΚΑ σε άνδρες έχει αποδειχθεί ότι είναι τέσσερις έως έξι φορές υψηλότερος από εκείνον των γυναικών. Επίσης η ανάπτυξη των ΑΚΑ έχει παρατηρηθεί ότι συμβαίνει μέχρι και μια δεκαετία αργότερα σε θηλυκά άτομα συγκριτικά με τα αρσενικά. Υπάρχουν ενδείξεις που υποδηλώνουν πως ο επιπολασμός της νόσου στις γυναίκες έχει υποεκτιμηθεί λόγω του ορισμού της διαμέτρου του ΑΚΑ μεγαλύτερης ή ίσης των 3 εκατοστών. [25,26] Για παράδειγμα, ο Wanhainen και οι συνάδελφοί του εκτίμησαν τον επιπολασμό του ΑΚΑ για άτομα 65-75 ετών στο 16,9% για τους άνδρες σε σύγκριση με 3,5% στις γυναίκες χρησιμοποιώντας τον ορισμό της τυπικής διαμέτρου (κοιλιακή αορτή ≥ 3 cm). Η διαφορά αυτή μειώθηκε στο 12,9% για τον αντρικό

πληθυσμό και στο 9,8% για τον γυναικείο όταν χρησιμοποίησαν για τον ορισμό του ΑΚΑ την αύξηση κατά 1,5 φορές της διαμέτρου της υπονεφρικής αορτικής διαμέτρου. [27]

Κάπνισμα

Η χρήση του καπνού αποτελεί τον πρώτο τροποποιήσιμο παράγοντα κινδύνου που ταυτοποιήθηκε και συνδέθηκε τόσο με την ανάπτυξη όσο και με τη ρήξη του ΑΚΑ. Περίπου 18% με 25% των ατόμων με ΑΚΑ που ανιχνεύονται κατά τη συνηθισμένη εξέταση αποτελούν ενεργούς καπνιστές. Οι καπνιστές είναι κατά επτά φορές πιο ευάλωτοι στο να αναπτύξουν ΑΚΑ σε σύγκριση με μη καπνιστές.[10, 26, 28-31] Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η συνολική διάρκεια του καπνίσματος είναι ο πρωταρχικός παράγοντας και σχετίζεται άμεσα με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΑΚΑ και μάλιστα έχει αποδειχθεί η σημαντικότερη παράμετρος κινδύνου σε σχέση με τον συνολικό αριθμό των τσιγάρων που καπνίστηκαν. Αντίθετα, η δράση και η χρονική διάρκεια της διακοπής του καπνίσματος έχει αποδειχθεί έπειτα από μελέτες προσυμπτωματικού ελέγχου πως μειώνουν την επίπτωση του ΑΚΑ. [29-30]

Φυλή

Τα ΑΚΑ εμφανίζονται συχνότερα στη Καυκάσια φυλή από οποιαδήποτε άλλη φυλή. [26, 32] Μια πληθυσμιακή μελέτη που διεξήχθη από τον Kent και τους συνεργάτες του το 2010 λαμβάνοντας υπόψη δεδομένα για πάνω από 3 εκατομμύρια άτομα έδειξε μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης ΑΚΑ στους Ισπανόφωνους, στους Αφροαμερικανούς και τους Ασιάτες. [30]

Οικογενειακό ιστορικό

Ένα θετικό οικογενειακό ιστορικό αποτελεί ένα δυνητικό παράγοντα που αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο για την εμφάνιση ΑΚΑ, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για συγγενείς πρώτου βαθμού. Ένα οικογενειακό ιστορικό χειρουργικής επέμβασης για ΑΚΑ σε έναν πρώτου βαθμού συγγενή μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο έως και τέσσερις φορές. [33]

Πολλές μελέτες έχουν υποδείξει την ύπαρξη γενετικής προδιάθεσης για την ανάπτυξη ΑΚΑ, συμπεριλαμβανομένων δύο μελετών με περιπτώσεις ελέγχου οι οποίες υποδεικνύουν την παρουσία και το ρόλο του οικογενειακού ιστορικού και συσχετίζουν αυτό με αύξηση του κινδύνου μια έως πέντε φορές για εκδήλωση ΑΚΑ. [34, 35] Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα από μία εκτενή μελέτη από το Σουηδικό μητρώο διδύμων, το οποίο περιείχε στοιχεία για τα δίδυμα στη Σουηδία από το 1886, έδειξαν ότι τα μονοζυγωτικά δίδυμα είχαν πιθανότητα 24% να αναπτύξουν ΑΚΑ εάν είχε εμφανίσει το άλλο δίδυμο. [36]

Έχουν προταθεί διάφορα πρότυπα κληρονομικότητας για την ανάπτυξη ΑΚΑ. Αν και υπάρχουν ορισμένες γενετικές διαταραχές που σχετίζονται με τον σχηματισμό ανευρύσματος όπως το σύνδρομο Marfan (ελάττωμα στο γονίδιο της fibrillin-1), το σύνδρομο Ehlers–Danlos (μη φυσιολογικός τύπος III του προκολλαγόνου), και το σύνδρομο Loeys–Dietz (μεταλλαξη στον αυξητικό παράγοντα TGF) τα οποία έχουν ταυτοποιηθεί εξ ολοκλήρου συνήθως σχετίζονται με ανευρύσματα στην ανιούσα και θωρακική αορτή. Μέχρι σήμερα, δεν έχει ταυτοποιηθεί συγκεκριμένο γονίδιο ή πολυμορφισμός που σχετίζεται με τον σχηματισμό ΑΚΑ. [37-39]

Υπαρξη άλλων ανευρυσμάτων

Άτομα με ανεύρυσμα άλλων μεγάλων αγγείων, όπως στα άκρα και στις καρωτιδικές αρτηρίες, έχουν αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση ΑΚΑ. Οι ασθενείς με ανευρύσματα στη μηριαία ή ιγνυακή περιοχή έχει καταγραφεί πως φέρουν ταυτόχρονα ΑΚΑ σε ποσοστά 85% και 60% των περιπτώσεων, αντιστοίχως. [40, 41]

Συνοδά νοσήματα

Πολλοί παράγοντες κινδύνου έχουν επίσης συσχετιστεί με την ανάπτυξη ΑΚΑ, συμπεριλαμβανομένων της στεφανιαίας νόσου [42], της εγκεφαλοαγγειακής νόσου [43], της υπέρτασης [41, 44] και της υπερχοληστερολαιμίας. [26] Τα ΑΚΑ είναι πιο συχνά σε ασθενείς με αθηροσκλήρωση, με επιπολασμό περίπου 5% σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο και περίπου 10% σε ασθενείς με αρτηριοσκλήρυνση. [45, 46] Πολλές μελέτες υποστηρίζουν πως η υψηλή αρτηριακή πίεση και η χρόνια υπέρταση (συστολική > 160 mm Hg και διαστολική > 95 mm Hg) αποτελούν παράγοντες κινδύνου. Ωστόσο, υπάρχουν αντικρουόμενες ενδείξεις σχετικά με το εάν ο κίνδυνος για ΑΚΑ από την υπέρταση είναι ειδικός ως προς το φύλο καθώς η μελέτη των Forsdahl και τους συνεργάτες του έδειξε ότι ο κίνδυνος υπάρχει μόνο τον γυναικείο πληθυσμό. [47] Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως τα ΑΚΑ έχουν βρεθεί ότι είναι λιγότερο συχνά σε ασθενείς με διαβήτη. Φαίνεται πως ο σακχαρώδης διαβήτης κατέχει προστατευτικό ρόλο έναντι του ΑΚΑ. [30, 44, 48]

1.2.5 Παθοφυσιολογία

Το ανεύρυσμα ως κλινική οντότητα συνιστά μια δυναμική εξελισσόμενη παθολογία η οποία χαρακτηρίζεται από τρεις κύριες διαδικασίες: την φλεγμονή, την πρωτεόλυση και την απόπτωση των λείων μυϊκών κυττάρων. [49] Αν και οι προδιαθεσικοί παράγοντες δεν

είναι πλήρως κατανοητοί φαίνεται πως αυτοί μπορεί να εμφανιστούν ακόμα και κατά την εμβρυογένεση. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η ελασίνη, η οποία έχει καίριο ρόλο στη διάταση των τοιχωμάτων του αγγείου ως απάντηση στην αύξηση της ενδαγγειακής πίεσης, σχηματίζεται σχεδόν αποκλειστικά σε αυτή την περίοδο και σχεδόν σταματά κατά τη γέννηση. Επομένως παράγοντες που δρουν κατά την εμβρυϊκή περίοδο όπως η δυσλειτουργία του πλακούντα ή τυχόν μικροθρεπτικές ανωμαλίες δύνανται να επηρεάσουν δυσμενώς, δομές (όπως τα αγγεία) που περιέχουν σημαντικά επίπεδα αυτής της πρωτεΐνης. [50]

Όσον αφορά το σχηματισμό ενός ΑΚΑ, η αρχική θεωρία της εστιακής αθηροσκλήρωσης, με βάση την οποία ένα σημείο της αορτής εμφανίζει προχωρημένη αθηρωματική νόσο έχει αρχίσει να εγκαταλείπεται. Πλέον είναι γνωστό ότι η ανευρυσματική νόσος δεν πλήττει μόνο ένα σημείο ενός αγγείου ή ένα αγγείο μεμονωμένα, αλλά αφορά ολόκληρο το αγγειακό δίκτυο του οργανισμού. [51] Η άποψη ότι η αθηροσκλήρωση οδηγεί στο ΑΚΑ έχει επίσης κλωνιστεί και φαίνεται ότι η αθηροσκλήρωση στο ΑΚΑ είναι απόρροια της μεταβαλλόμενης αιματικής ροής στον αυλό. [52] Επιπλέον η συννοσηρότητα αορτικής αθηροσκλήρωσης και ΑΚΑ δεν απαντάται σε όλους τους ασθενείς. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η αθηροσκλήρωση δεν είναι το κυρίαρχο χαρακτηριστικό στην ανάπτυξη ΑΚΑ υποδεικνύοντας την ύπαρξη διαφορετικών παθογενετικών που συμμετέχουν στην εκδήλωση ΑΚΑ και αθηρωμάτωσης. [53]

Σε ιστολογικό επίπεδο, η φλεγμονή συνιστά κύριο μηχανισμό στη δημιουργία του ΑΚΑ η οποία οδηγεί σε αποδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας του προσβεβληθέντος αγγείου ενώ δραστικές ρίζες οξυγόνου και αζώτου προκαλούν προοδευτική βλάβη των κυττάρων αποδίδοντας τυπική ιστολογική εικόνα οξειδωτικού στρες. [54] Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες επιβεβαιώθηκε όταν μέσω της αναστολής του απετραπίνης ο σχηματισμός ΑΚΑ σε ζωικό μοντέλο. [55] Παραδόξως, η χρήση αντιοξειδωτικών σκευασμάτων δεν έχει αποδειχθεί χρήσιμη στην καταστολή σχηματισμού ΑΚΑ στον άνθρωπο. [44] Έρευνες της προηγούμενης δεκαετίας δείχνουν ότι η φλεγμονή παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της πλειοψηφίας των ΑΚΑ, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που δεν είναι διαγνωσμένα ως φλεγμονώδη ΑΚΑ. Σε σύγκριση με την αθηροσκλήρωση, η φλεγμονώδης απόκριση στα ΑΚΑ είναι συνήθως διατοχωματική και τα φλεγμονώδη κύτταρα έχουν διηθήσει κυρίως στον έξω και μέσο χιτώνα. [56] Χρόνια αορτική φλεγμονή πιστεύεται ότι οδηγεί στην καταστροφή των αορτικών μέσων και στην απόπτωση και δυσλειτουργία των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων ως αποτέλεσμα της απελευθέρωσης μιας σειράς πρωτεολυτικών ενζύμων, όπως μεταλλοπρωτεϊνάσες μήτρας και πρωτεάσες κυστεΐνης, ελεύθερες ρίζες που

προέρχονται από την οξειδωση, κυτοκίνες και συναφή προϊόντα. [57] Η έκφραση κυτταροκινών που προάγουν την Th2-ανοσοαπόκριση, όπως οι IL-4, IL-5, και IL-10, είναι σημαντικά αυξημένη στις ανευρυσματικές αρτηρίες σε σύγκριση με τις φυσιολογικές και τις αθηρωματικές αρτηρίες. Η έκφραση των κυτοκινών που προάγουν την Th1-απόκριση όπως οι IL-2 και IL-15 δεν ανιχνεύονται στις ανευρυσματικές αρτηρίες και η έκφραση INF- α , IL-12 και IL-18 είναι σημαντικά χαμηλότερη σε σύγκριση με τις αθηρωματικές. [58] Τα φυσικά κύτταρα φονείς που έχουν ένα προφίλ κυτταροκίνης Th0 και μπορούν να παράγουν Th2, καθώς και Th1 κυτοκίνες, εμφανίζονται στις ανευρυσματικές αρτηρίες και μπορεί να παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη του ΑΚΑ. [59] Η πλειοψηφία των φλεγμονωδών κυττάρων που ανακτώνται από τους ΑΚΑ ιστούς είναι τα CD4+ λεμφοκύτταρα ή Τ κύτταρα, ακολουθούμενα από Β λεμφοκύτταρα. Αρκετές μελέτες έχουν προτείνει ότι στα ΑΚΑ επικρατεί μια Th2 ανοσοαπόκριση.[60]

Το ανεύρυσμα περιλαμβάνει όλους τους υποτύπους αγγειακών κυττάρων ενώ παρατηρείται χρόνια φλεγμονώδης διήθηση του έξω και έσω χιτώνα και εκφυλισμός της ελαστίνης. Το υπονεφρικό τμήμα της κοιλιακής αρτηρίας είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στην ανάπτυξη ΑΚΑ. Αυτό μπορεί να οφείλεται εν μέρει στη διαφορετική εμβρυϊκή προέλευση των SMC της κοιλιακής αρτηρίας από την ανιούσα αρτηρία. Άλλοι παράγοντες σχετίζονται με τη διακύμανση του περιεχόμενου της ελαστίνης και του κολλαγόνου σε διάφορα μέρη της αρτηρίας και οι μοναδικές αιμοδυναμικές δυνάμεις που επηρεάζουν ιδιαίτερα της υπονεφριδιακής περιοχής. [61] Η εκτεταμένη δομική αναδιαμόρφωση η οποία χαρακτηρίζεται από τον εκφυλισμό της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, την καταστροφή των ελαστικών ινών και τη μείωση των VSMC οδηγεί τελικά στην προοδευτική εξασθένηση του αορτικού τοιχώματος. Ταυτόχρονα παρατηρείται αύξηση του κολλαγόνου και μείωση της ελαστίνης, γεγονότα που οδηγούν στην μείωση της ελαστικότητας του αγγείου. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας φαίνεται πως έχουν εξίσου σημαντικό ρόλο καθώς εμπλέκονται άμεσα σε αυτή την αναδιαμόρφωση. Η μέχρι στιγμής έρευνα έχει δείξει αυξημένα επίπεδα των MMP-1, MMP-2, MMP-3 και MMP-9. Οι MMP-2 και MMP-9 μπορούν να αποδομήσουν τόσο το κολλαγόνο όσο και την ελαστίνη. [62-65]

Παράλληλα, η ενασβεστίωση (κατακρήμνιση του ιονισμένου ασβεστίου σε μαλακό ιστό) αποτελεί πρώιμο συμβάν στην εξέλιξη της αθηρωμάτωσης και του ΑΚΑ. Πρόκειται για μια διαδικασία εξαρτώμενη από τα ανόργανα φωσφορικά άλατα πηγές των οποίων αποτελούν ο μεταβολισμός των κυττάρων μέσω της ανακύκλωσης του ATP, οι εξωκυττάριας λιποπρωτεΐνες, τα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης, το ελεύθερο εξωκυττάριας DNA καθώς και προϊόντα της αλκαλικής φωσφατάσης. [66, 67]

Μικροσκοπικά, το ΑΚΑ εμφανίζει διαστολή όλων των στρωμάτων του αρτηριακού τοιχώματος ως αποτέλεσμα της απώλειας ελαστίνης, της απόπτωσης των λείων μυϊκών κυττάρων και την εναπόθεση κολλαγόνου ενώ ενδιαφέρον είναι το εύρημα ότι η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ECM) εμφανίζει μεταβολές ακόμα σε τμήματα της αορτής που δε συμμετέχουν στο ανεύρυσμα όπως επίσης και στην κάτω μεσεντέρια φλέβα. [68, 69] Η τελευταία εμφανίζει μεταβολή σε δύο σημαντικές μηχανικές ιδιότητες για τα αγγεία, τον εφελκυσμό ο οποίος εμφανίζεται μειωμένος και το μέτρο ελαστικότητας το οποίο εμφανίζεται αυξημένο και μάλιστα σε τιμές αντίστοιχες με εκείνες του αρτηριακού ανευρυσματικού τοιχώματος. [70]

Οι εξω-αορτικές μεταβολές εμφανίζονται και στις καρωτίδες με παρατηρήσεις σε ασθενείς με ΑΚΑ να δείχνουν την ήπια διαστολή αλλά και τη μειωμένη ευαισθησία των καρωτίδων σε σύγκριση με ασθενείς ελεύθερων νόσου. [51, 71] Τα παραπάνω ευρήματα καθιστούν σαφές ότι το ανεύρυσμα δεν είναι μια τοπική νόσος αλλά αντίθετα καταδεικνύουν την συστημική του φύση.

Στην παθοφυσιολογία του ΑΚΑ φαίνεται πως εμπλέκονται και αυτοάνοσοι μηχανισμοί. Οι Hirose και Tilson κατάφεραν να ταυτοποιήσουν από ανθρώπινο ΑΚΑ μια αυτοάνοση πρωτεΐνη βάρους 40kDa η οποία αντιδρά με την ανοσοσφαιρίνη G. [72, 73] Μια άλλη μελέτη δείχνει ότι στον ιαπωνικό πληθυσμό οι HLA A-2 και HLA B-61 αποτελούν σημαντικούς γενετικούς παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη της νόσου ενώ έχει προταθεί ότι το ΑΚΑ αποτελεί μια ειδική κατηγορία νόσου η οποία έχει χαρακτηριστεί ως T-αντιγονο-εξαρτώμενη. [74]

1.2.6 Συμπτωματολογία

Τα ΑΚΑ μπορούν να μην ανιχνεύονται για χρόνια καθώς είναι κατά κύριο λόγο ασυμπτωματικά μέχρι τη στιγμή που θα επεκταθούν αρκετά με αποτέλεσμα να πιέσουν τοπικά όργανα ή να ραγίσουν. Τα ποσοστά των ΑΚΑ που είναι ασυμπτωματικά αγγίζουν το 75% και τα ΑΚΑ που διαγιγνώσκονται, στην πλειοψηφία τους, αποτελούν τυχαίο εύρημα που προκύπτει από διάφορες μελέτες απεικόνισης που πραγματοποιούνται για άλλους λόγους. Ομοίως, είναι δύσκολο να προβλεφθεί ο ρυθμός επέκτασης ενός ΑΚΑ. Η πιο συνηθισμένη εκδήλωση ενός μη ραγέντος ΑΚΑ είναι ο ασαφής, αλλά επίμονος και βαθύς, οπισθοκοιλιακός πόνος που μπορεί να επεκταθεί στα πλευρά και στη βουβωνική χώρα. Ένας παλλόμενος πόνος μπορεί να γίνει αντιληπτός γύρω από τον ομφαλό. Ωστόσο, αυτός ο πόνος συχνά παρατηρείται μόνο μετά από κλινική εξέταση.

Τα συμπτώματα που έπονται μιας ρήξης ΑΚΑ είναι πιο σημαντικά, αλλά ακόμη παραμένουν ασαφή. Συνήθως αναφέρεται πόνος στην κοιλιά ή στην πλάτη, αλλά συχνά συγχέονται με την νεφρολιθίαση, την παρουσία κήλης ή την εκκολπωματίτιδα. Αυτός ο έντονος πόνος μπορεί να εμφανιστεί ξαφνικά, να είναι σταθερός ή να εξαπλωθεί στη βουβωνική χώρα, τους γλουτούς, τα πόδια ή το όσχεο. Η εκδήλωση τέτοιας έντασης πόνου μπορεί να υποδεικνύει συμπίεση ή διάβρωση του ανευρύσματος σε περιβάλλουσες δομές (π.χ., σπονδυλική στήλη), φλεγμονή ή λοίμωξη του αορτικού τοιχώματος, ή ακόμη και ρήξη. Ταχυκαρδία και ζάλη σε όρθια στάση είναι επίσης συνηθισμένες εκδηλώσεις. Άλλα συμπτώματα που παρατηρούνται είναι η συγκοπή, απώλεια συνείδησης, εφίδρωση, ναυτία και έμετος.

Η ταχεία ανευρυσματική επέκταση μπορεί να προκαλέσει πιο ασαφή ή μη ειδικά κοιλιακά συμπτώματα. Η ρήξη ενός ΑΚΑ συνοδεύεται από τρία καλά χαρακτηρισμένα κλινικά σημεία τα οποία περιλαμβάνουν κοιλιακό ή οσφυϊκό πόνο, υπόταση και σφύζουσα κοιλιακή μάζα. Ανάλογα με το σημείο της αορτής που προκλήθηκε η ρήξη και τον αντίστοιχο ρυθμό αιμορραγίας, η οξύτητα και η σοβαρότητα των συμπτωμάτων μπορεί να διαφέρουν. [75]

Λανθασμένη διάγνωση της ρήξης ΑΚΑ μπορεί να συμβεί σε ποσοστό έως 60% των περιπτώσεων, καθώς τα συμπτώματα συχνά αποδίδονται σε άλλες αιτίες που δεν σχετίζονται με την αορτή, όπως η γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση, κολικός ουρητήρα, έμφραγμα του μυοκαρδίου ή διάφορες μυοσκελετικές ανωμαλίες. [76] Λιγότερο συχνά, το ΑΚΑ μπορεί να παρουσιάσει οίδημα κάτω άκρων, καρδιακή ανεπάρκεια ή αιμορραγία του ανώτερου γαστρεντερικού. Επιπροσθέτως, οι ασθενείς μπορεί να παρουσιάζουν ισχαιμία κάτω άκρου ως αποτέλεσμα θρομβοεμβολισμού ή αθηροεμβολισμού από το περίβλημα του ανευρύσματος ή λόγω οξείας θρομβώσεως της αορτής.

Η εσωτερική αιμορραγία από τη ρήξη ΑΚΑ μπορεί να οδηγήσει σε καταπληξία με συμπτώματα όπως υπόταση, κυάνωση, κηλίδες του δέρματος και μεταβολή της νοητικής κατάστασης. Αυτά τα συμπτώματα είναι ιδιαίτερος σοβαρά δεδομένου ότι σχεδόν το 65% των ασθενών πεθαίνουν από αιφνίδια καρδιαγγειακή κατάρρευση έπειτα από ρήξη ΑΚΑ. [77]

1.2.7 Διάγνωση

Σπουδαίο ρόλο στη διάγνωση, την παρακολούθηση, τη θεραπεία και το follow up των ασθενών με ΑΚΑ διαδραματίζει η ιατρική απεικόνιση. Λαμβάνοντας υπόψη πως η

πλειοψηφία των ΑΚΑ είναι ασυμπτωματικά γίνεται προφανής η σημασία της αρχικής τους διάγνωσης. Επιπλέον δεδομένου των ποικίλων ευρημάτων της φυσικής εξέτασης σε ασθενείς με συμπτωματικά και ασυμπτωματικά ΑΚΑ, όπως αναφέρθηκαν και νωρίτερα η ακτινολογική απεικόνιση παραμένει η κύρια μέθοδος διάγνωσης της αορτικής νόσου.

Κοιλιακή υπερηχογραφία με (Color duplex ultrasonography) συνιστάται ως αρχική διαγνωστική μελέτη σε ασυμπτωματικούς ασθενείς που υποπτεύονται ότι έχουν ΑΚΑ είτε με βάση κάποιους παράγοντες κινδύνου, είτε με την εύρεση σφύζουσας κοιλιακής μάζας έπειτα από κλινική εξέταση είτε με υπόνοια για την παρουσία αορτικού ανευρύσματος που προέκυψε από προηγούμενες μη ειδικές μελέτες αγγειακής απεικόνισης. Ένα υπερηχογράφημα ρουτίνας για την αξιολόγηση της αορτής περιλαμβάνει μετρήσεις της κοιλιακής αορτής και των λαγόνιων αρτηριών σε πολλαπλά σημεία (π.χ., υπερνεφρικό και υπονεφρικό) σε προσθοπίσθιο, διαμήκη και εγκάρσιο άξονα. Εκτός από το γεγονός ότι είναι μη επεμβατική και χαμηλού κόστους μεθοδολογία, ο υπερηχογράφος αποτελεί την μελέτη εκλογής καθώς διαθέτει ευαισθησία 95-100% και εξειδίκευση σχεδόν 100%. Σημαντικό πλεονέκτημα που ευθύνεται για την ευρεία αποδοχή από τους ασθενείς είναι ο σύντομος χρόνος εξέτασης και η αποφυγή έκθεσης σε ακτινοβολία [25, 26]

Η εγκάρσια απεικόνιση έπειτα από υπολογισμένη τομογραφική αγγειογραφία (CTA), παρέχει πιο κατανοητή απεικόνιση και δείχνει περισσότερες ανατομικές λεπτομέρειες του τμήματος της αορτής, συμπεριλαμβανομένου του φορτίου του θρόμβου, της ασβεστοποίησης και της μορφολογίας του ανευρύσματος. Η CTA μπορεί επίσης να παρέχει κατάλληλη αξιολόγηση του αορτικού τοιχώματος και να βοηθήσει στον προσδιορισμό του τύπου του ΑΚΑ, εάν δηλαδή πρόκειται για μυκοτικό ή φλεγμονώδες. Η απεικόνιση με CTA παρουσιάζει και ορισμένα μειονεκτήματα και αυτά περιλαμβάνουν το αυξημένο κόστος του σε σύγκριση με το υπερηχογράφημα της κοιλίας, την απαίτηση για ενδοφλέβια χορήγηση σκιαγραφικής ουσίας για βέλτιστη αξιολόγηση αγγειακών δομών και την έκθεση στην ακτινοβολία.

Η αγγειογραφία μαγνητικού συντονισμού μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη λήψη μιας λεπτομερούς απεικόνισης της αορτής. Ωστόσο, αυτός ο τρόπος απεικόνισης είναι πιο ακριβός, σπανιότερα διαθέσιμος και είναι πολύ περισσότερο χρονοβόρος σε σχέση με το υπερηχογράφημα ή το CTA, κάτι που είναι ιδιαίτερα σημαντικό κατά την αξιολόγηση ατόμων με υποψία ρήξης ΑΚΑ.

Το 2007 το Κονγκρέσο ψήφισε το νόμο Screening Abdominal Aortic Aneurysms Efficiently (SAAAVE), ο οποίος βασίστηκε στη σύσταση Β για την ανίχνευση των ΑΚΑ που είχε εκδώσει το 2005 η U.S. Preventive Services Task Force. Η σύσταση Β αφορούσε κυρίως άνδρες ηλικίας 65 έως 75 ετών που είχαν καπνίσει 100 ή περισσότερα τσιγάρα.

[33] Ο νόμος SAAAVE προβλέπει τον κοιλιακό υπερηχογραφικό έλεγχο σε άνδρες ηλικίας 65 ετών που καπνίζουν τουλάχιστον 100 τσιγάρα και σε γυναίκες που έχουν οικογενειακό ιστορικό της νόσου ΑΚΑ ως μέρος του πακέτου Καλωσορίσματος στο Medicare. Στη συνέχεια, η Αγγειοχειρουργική Εταιρεία (Society for Vascular Surgery, SVS) θέσπισε το 2009 ορισμένες κατευθυντήριες γραμμές οι οποίες συμπεριλαμβάνουν έναν εφάπαξ έλεγχο υπερήχου για όλους τους άνδρες ηλικίας 65 ετών και άνω, ανεξάρτητα από το ιστορικό καπνίσματος, καθώς και για όλους τους άνδρες ηλικίας 55 ετών και άνω με οικογενειακό ιστορικό ΑΚΑ. Επιπλέον, η SVS συνιστά έναν εφάπαξ διαγνωστικό έλεγχο για όλες τις γυναίκες 65 ετών ή και άνω των 65 που έχουν επίσης οικογενειακό ιστορικό ΑΚΑ ή έχουν υπάρξει καπνίστριες. [78]

Εάν προσδιοριστεί η ύπαρξη ΑΚΑ έπειτα από μία απεικονιστική εξέταση, το χρονικό διάστημα για την επακόλουθη απεικόνιση επανελέγχου εξαρτάται από το μέγεθος του ανευρύσματος. Ειδικές συστάσεις της SVS σχετικά με τα χρονικά διαστήματα παρακολούθησης απεικονίζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Οδηγίες για τα χρονικά διαστήματα επανελέγχου ασθενών με ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής [78]

Διάμετρος ΑΚΑ (cm)	Διάστημα παρακολούθησης
< 2.6	Δε συνιστάται επανέλεγχος
2.6–2.9	Κάθε 5 έτη
3.0–3.4	Κάθε 3 έτη
3.5–4.4	Κάθε 12 μήνες
4.5–5.4	Κάθε 6 μήνες

1.3 Αντιμετώπιση ανευρύσματος

Ανευρύσματα τα οποία είναι συμπτωματικά πρέπει να χειρουργούνται σε σύντομο χρονικό διάστημα (τα ραγέντα ανευρύσματα αντιμετωπίζονται επείγοντως). Η ένδειξη της χειρουργικής αντιμετώπισης των ασυμπτωματικών ανευρυσμάτων προκύπτει σαν συνιστώσα τριών παραμέτρων: του κίνδυνου ρήξης, του περιεγχειρητικού κινδύνου και του προσδόκιμου επιβίωσης του ασθενούς. Ο κίνδυνος ρήξης καθορίζεται από το μέγεθος του ανευρύσματος με διάμετρο <5.5 εκ. και κατ' άλλους <5 εκ. Τα μικρότερα ανευρύσματα

μεγέθους μεταξύ 4 και 5 εκ. αποτελούν θέμα συζήτησης, αν και οι 2 μεγάλες πολυκεντρικές τυχαιοποιημένες μελέτες έδειξαν ότι η συχνή παρακολούθηση αυτών των ανευρυσμάτων (ανά 3 ή 6 μήνες) έχει παρόμοια αποτελέσματα με την πρώιμη επέμβαση. Η γρήγορη αύξηση της διαμέτρου των μικρών ανευρυσμάτων (πάνω από 0.5mm/εξάμηνο) και η εμφάνιση συμπτωματολογίας οξείας διάτασης είναι κριτήρια που δικαιολογούν τη χειρουργική τους αποκατάσταση. [8, 79-81]

Ο περιεγχειρητικός κίνδυνος προσδιορίζεται από πλήθος παραγόντων που δεν εξαρτάται τόσο από την ηλικία του ασθενούς όσο από τη γενική του κατάσταση. Η βιολογική κατάσταση του ασθενούς αποτελεί σημαντικό παράγοντα κατά τη χειρουργική αντιμετώπιση του ανευρύσματος. Η περιεγχειρητική και μετεγχειρητική θνητότητα εξαρτάται από την παρουσία καρδιακής νόσου (πρόσφατα εμφράγματα μυοκαρδίου, καρδιακή ανεπάρκεια), από την ύπαρξη αθηροσκληρωτικής νόσου (διαλείπουσα χωλότητα, στένωση καρωτίδων με συμπτωματολογία εγκεφαλικής ισχαιμίας), υπέρτασης, νεφρικής ανεπάρκειας, χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας, εμφυσήματος και παχυσαρκίας.

Σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση χειρουργικών επιπλοκών παίζει προηγούμενη παθολογία της κοιλιακής κοιλότητας, όπως προηγούμενες χειρουργικές επεμβάσεις, φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, εντερικά συρίγγια, εντεροστομία ή ουρητηροστομία, οπισθοπεριτοναϊκή ίνωση. Υπάρχουν δύο επιλογές αποκατάστασης ΑΚΑ: η παραδοσιακή ανοικτή χειρουργική αποκατάσταση και η ενδοαγγειακή αποκατάσταση αορτικού ανευρύσματος (EVAR) με τοποθέτηση ενδοαυλικού συνθετικού μοσχεύματος. Και οι δύο επιλογές μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο στην περίπτωση που το ΑΚΑ έχει πάθει ρήξη όσο και στην εκλεκτική αντιμετώπιση, αν και η μέχρι σήμερα εμπειρία σε ενδοαγγειακή αποκατάσταση του ανευρύσματος (EVAR) στην περίπτωση της ρήξης είναι περιορισμένη. [4]

1.3.1 Ανοικτή χειρουργική αποκατάσταση

Για περισσότερο από μισό αιώνα, η ανοιχτή χειρουργική αποκατάσταση θεωρήθηκε ως το χρυσό πρότυπο για την αντιμετώπιση των ΑΚΑ με υψηλό βαθμό επιτυχίας και εξακολουθεί να εκτελείται ευρέως σε πολλά κλινικά κέντρα. Ο βασικός στόχος της χειρουργικής αποκατάστασης είναι ο αποκλεισμός του ανευρύσματος της αορτής από τη συστηματική κυκλοφορία με διατήρηση της ροής αίματος μέσω του εμφυτευμένου νέου

αγγειακού αγωγού από συνθετικό μόσχευμα. Αυτό συνήθως επιτυγχάνεται με τομή του σάκου ανευρύσματος, αφαίρεση του τοιχωματικού θρόμβου, σύνδεση των αγγειακών διακλαδώσεων (όπως η μεσεντερική ή νεφρική αρτηρία) που προέρχονται από το σάκο ανευρύσματος, επιλογή μοσχεύματος κατάλληλου μεγέθους και σχήματος, συγκόλληση της αναστόμωσης του μοσχεύματος στην αρτηρία στα εγγύς και απομακρυσμένα τμήματα του ανευρύσματος και τελικά, κλείσιμο του αποσυμπιεσμένου σάκου ανευρύσματος με το συνθετικό μόσχευμα. [82, 83]

Η χειρουργική αποκατάσταση του ανευρύσματος αορτής είναι περίπλοκη, εξατομικευμένη και αρκετά υψηλού κινδύνου. Η χειρουργική προσέγγιση εξαρτάται από την εγγύς (και σε μικρότερο βαθμό την περιφερική) έκταση του ανευρύσματος. Για ανευρύσματα που περιορίζονται στην κοιλιά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν τρεις προσεγγίσεις: οπισθοπεριτοναϊκή, διακοιλιακή και ευρεία εγκάρσια. Η οπισθοπεριτοναϊκή προσέγγιση επιτρέπει εξαιρετική πρόσβαση στην αριστοειδή αορτή, αποφεύγοντας παράλληλα την περιτοναϊκή κοιλότητα. Θα πρέπει να εξεταστεί κατά πόσο ο ασθενής έχει ανευρυσματική ασθένεια που εκτείνεται σε σπλαχνικά ή παρανεφρικά τμήματα της αορτής ή παρουσία φλεγμονώδους ανευρύσματος, ή πετάλου νεφρού ή εχθρικής κοιλίας. Η οπισθοπεριτοναϊκή προσέγγιση έχει επίσης συσχετιστεί με λιγότερες μετεγχειρητικές επιπλοκές στο αναπνευστικό σύστημα, μικρότερη ενδοεγχειρητική υποθερμία, μικρότερο μεταλειτουργικό πόνο και μικρότερη περίοδο μετεγχειρητικού ειλεού. Περιορισμοί αυτής της προσέγγισης περιλαμβάνουν περιορισμένη πρόσβαση στη δεξιά λαγώνια αρτηρία καθώς και την περιτοναϊκή κοιλότητα. Η οπισθοπεριτοναϊκή προσέγγιση θα πρέπει να αποφεύγεται όταν συνυπάρχουν παθήσεις της κοιλίας, αριστερή κάτω κοίλη φλέβα και σε μεγάλα ανευρύσματα ύπαρξη και των δυο λαγόνιων αρτηριών. Η δια-κοιλιακή προσέγγιση επιτρέπει ευρεία πρόσβαση στις περιτοναϊκές και οπισθοπεριτοναϊκές κοιλότητες, καθώς και στη αμφίπλευρες λαγόνες αρτηρίες. Αυτή η προσέγγιση προτιμάται για τη διαχείριση ενός ραγέντος ΑΚΑ ή ύποπτου εντερικού συριγγίου αορτής. [84]

1.3.2 Ενδαγγειακή αποκατάσταση- EVAR

Σε μια προσπάθεια να μειωθεί ο χειρουργικός κίνδυνος σε ασθενείς έχουν αναπτυχθεί λιγότερο επεμβατικές τεχνικές για την αποκατάσταση του ΑΚΑ. Περίπου πριν από δύο δεκαετίες, οι ελάχιστα επεμβατικές τεχνικές περιορίζονταν μόνο στην επιδιόρθωση του υπονεφρικού ανευρύσματος αλλά οι πιο σύγχρονες τεχνικές εξελίξεις επέτρεψαν την αποκατάσταση και υπερνεφρικού ανευρύσματος. Αντί της αντικατάστασης του

μοσχεύματος με την εκτεταμένη διαδικασία μέσω της τομής της κοιλίας ή των πλευρών υπό γενική αναισθησία, ένα προσθετικό λεπτοτοιχωματικό διχαλωτό μόσχευμα συμπιέζεται σε έναν καθετήρα, εισάγεται στη μηριαία ή λαγόνια αρτηρία μέσω περιορισμένης τομής στη βουβωνική χώρα υπό τοπική αναισθησία. [85 -87] Το μόσχευμα είναι αγκυροβολημένο με στεντ στη φυσιολογική, μη ανευρυσματική αορτή στο επίπεδο των νεφρικών και λαγόνιων αρτηριακών τοιχωμάτων και ο ανευρυσματικός σάκος παραμένει in situ. Η EVAR στοχεύει να αποκλείσει το ΑΚΑ από τη συστηματική κυκλοφορία αντί για αντικατάσταση της αορτής που έχει υποστεί βλάβη. Πρέπει να εξετάζονται διάφοροι παράγοντες για να αξιολογηθεί αν είναι εφικτή η χρήση EVAR. Τα προσβάσιμα αγγεία πρέπει να είναι επαρκούς ποιότητας ώστε να καθίσταται δυνατή η εισαγωγή του μοσχεύματος στεντ. Επιπλέον, για να επιτευχθεί πλήρης έμφραξη, απαιτούνται υγιής (μη ανευρυσματικές) εγγύς και περιφερικές ζώνες για την αγκυροβόληση του μοσχεύματος στεντ. Σε περιπτώσεις ανεπαρκών εγγύς ζωνών αγκυροβόλησης κάτω από τις νεφρικές αρτηρίες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί το υπερνεφρικό τμήμα της αορτής για την έμφραξη χρησιμοποιώντας προηγμένες τεχνικές EVAR, όπως τεχνητά μοσχεύματα (μόσχευματα στεντ με οπές εξαέρωσης για να φιλοξενήσουν τις νεφρικές αρτηρίες και την ανώτερη μεσεντερική αρτηρία και τον κορμός της κοιλίας, αν χρειαστεί) ή την τεχνική chimney. [88] Η μορφολογία της αορτής επηρεάζει τα αποτελέσματα της EVAR. Η πραγματοποίηση EVAR σε ασθενείς που πληρούν τα απαραίτητα χαρακτηριστικά για τη διαδικασία αυτή παρουσιάζουν μακροπρόθεσμα αποτελέσματα. [89, 90]

1.3.3 Επιπλοκές ανοικτής χειρουργικής αποκατάστασης

➤ Θνησιμότητα

Ο κίνδυνος θανάτου είναι περίπου 4% σε ασθενείς με απλή επιδιόρθωση αορτικού ανευρύσματος. Η πιο κοινή αιτιολογία θανάτου είναι το έμφραγμα του μυοκαρδίου και εμφανίζεται σε ποσοστό 2-8%. Η εμφάνιση του εμφράγματος του μυοκαρδίου συμβαίνει κυρίως τις 2 πρώτες μετεγχειρητικές ημέρες. Για τους ασθενείς που παρουσιάζουν ρήξη ανευρύσματος αορτής, η θνησιμότητα μπορεί να φτάνει τα επίπεδα του 80%. Επίσης κατά την αντιμετώπιση του ανευρύσματος είναι δυνατόν να τραυματιστούν φλεβικά στελέχη με αποτέλεσμα να προκαλείται σοβαρή αιμορραγία.

➤ Μετεγχειρητική κήλη

Η κνησμώδης κήλη είναι μια συχνά υποτιμημένη επιπλοκή μετά την ανοικτή αποκατάσταση του κοιλιακού αορτικού ανευρύσματος. Η οπισθοπεριτοναϊκή τομή σχετίζεται με εξασθενημένο πλευρικό μυϊκό τοίχωμα της κοιλιακής χώρας που έχει ως αποτέλεσμα τη διόγκωση έως και 15% των ασθενών. Η διαπεριτοναϊκή τομή σχετίζεται με 12% έως 20% κίνδυνο σχηματισμού κήλης [78, 91]. Η αιτία της υψηλής συχνότητας κνησμού μετά τη χειρουργική επέμβαση ανευρύσματος πιστεύεται ότι είναι συνέπεια μιας διαταραχής του συνδετικού ιστού. Οι εγκάρσιες τομές έχουν δείξει μικρότερο ποσοστό εμφάνισης κήλης, επιτυγχάνοντας καλή έκθεση της αορτής. [92]

➤ Ψευδοανεύρυσμα- Παρά-αναστομωτικό ανεύρυσμα

Η δημιουργία ψευδοανευρύσματος είναι αποτέλεσμα διάσπασης της αναστόμωσης. Ο κίνδυνος σχηματισμού παρααναστοματικού ανευρύσματος είναι περίπου 0,8% στα 5 έτη, 6,2% στα 10 έτη και προσεγγίζει το 20% έως 40% στα 15 έτη μετά την ανοικτή αποκατάσταση. Τα ψευδοανεύρυσμα της αορτής πρέπει να αντιμετωπίζονται χειρουργικά λόγω της μεγάλης θνητότητας κατά τη ρήξη τους. [78, 91]

➤ Νεφρική δυσλειτουργία / αποτυχία

Οι νεφρικές επιπλοκές είναι πλέον σπάνιες. Ο κίνδυνος μετεγχειρητικής νεφρικής ανεπάρκειας επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Αυτοί περιλαμβάνουν μεγάλο χρόνο νεφρικής ισχαιμίας, παρατεταμένη νεφρική υπόταση, παρατεταμένος υπερνεφρικός αποκλεισμός, διεγχειρητικός εμβολισμός από αθήρωμα ή θρόμβο καθώς και προϋπάρχουσα νεφρική δυσλειτουργία. [93]

➤ Ισχαιμία του παχέος εντέρου

Η ισχαιμία του παχέος εντέρου μπορεί να ποικίλει σε σοβαρότητα. Μπορεί να είναι απομονωμένη στον βλεννογόνο του παχέος εντέρου ή μπορεί να είναι διαφραγματική. Η εντερική ισχαιμία μετά από επέμβαση αορτικού ανευρύσματος είναι σπάνια λόγω της πλούσιας παράπλευρης αιματικής άρδευσης του εντέρου μέσω της άνω και κάτω μεσεντέριας αρτηρίας και των έσω λαγόνιων. Η συχνότητα εμφάνισης της ισχαιμίας του παχέος εντέρου είναι 1% έως 3% μετά την εκλεκτική αποκατάσταση και φτάνει έως και 10% μετά την επείγουσα επιδιόρθωση του ραγέντος ΑΚΑ. Σε κέντρα όπου υπήρχε η ρουτίνα μετεγχειρητικής κολονοσκόπησης η επίπτωση ήταν ακόμη υψηλότερη: από 5% έως 9% μετά από επιλεκτική αποκατάσταση και 15% έως 60% μετά τη ρήξη. Η ισχαιμία του παχέος εντέρου μπορεί να περιλαμβάνει μη αποφρακτική ισχαιμία λόγω σοκ ή αγγειοσπαστικών φαρμάκων, ΙΜΑ και / ή απόφραξη των έσω λαγόνιων αρτηριών, και / ή αθηρώ-εμβολισμό. Μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη Γαλλία, έδειξε ότι η επίπτωση

της ισχαιμίας του παχέος εντέρου ήταν 4% μετά την ανοικτή αορτική αποκατάσταση και 1,4% μετά από EVAR. Παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την ανάπτυξη ισχαιμίας του παχέος εντέρου είναι ο τύπος αποκατάστασης, η ρήξη, η διάρκεια της επέμβασης, η ύπαρξη νεφρικής νόσου, πνευμονική δυσλειτουργία, απώλεια αίματος, αναστόμωση στο μηριαίο σημείο και υπογαστρική αρτηριακή απώλεια. [94]

➤ Σεξουαλική δυσλειτουργία

Η σεξουαλική δυσλειτουργία είναι συχνή σε ασθενείς με περιφερική αρτηριακή νόσο. Από τη δοκιμή DREAM, η αυτοαναφερόμενη προεγχειρητική σεξουαλική δυσλειτουργία ήταν περίπου 66% στην ανοικτή αποκατάσταση και 74% στους ασθενείς με EVAR. Μετεγχειρητικά, τα ποσοστά της προαναφερθείσας σεξουαλικής δυσλειτουργίας παρουσιάζονταν αυξημένα και στους 2 τύπους αποκατάστασης, με το μεγαλύτερο βαθμό δυσλειτουργίας να παρουσιάζεται με την ανοικτή αποκατάσταση. Η σεξουαλική ανικανότητα ή παλίνδρομη εκσπερμάτιση οφείλονται σε βλάβη των αυτόνομων νευρών κατά την αποκατάσταση του ανευρυσματικού σάκου. Η προσεκτική παρασκευή του νευρικού πλέγματος, κυριών των νεύρων που κατέρχονται αριστερά της κοιλιακής αορτής και έμπροσθεν του κεντρικού τμήματος της αριστερής κοινής λαγόνιου αρτηρίας. [95]

➤ Λοίμωξη μοσχεύματος

Η λοίμωξη του μοσχεύματος είναι σπάνια και περιπλέκει περίπου το 0,3% όλων των αορτικών επεμβάσεων. Ο κίνδυνος λοίμωξης είναι παρόμοιος στην ενδοαγγειακή και την ανοικτή αποκατάσταση των αορτικών ανευρυσμάτων. Μελέτες έχουν δείξει ότι το *Staphylococcal spp* είναι υπεύθυνο για την πλειονότητα των μολύνσεων. Εντούτοις, Gram-αρνητικά βακτήρια έχουν επίσης βρεθεί ότι είναι συχνά αιτιολογικοί παράγοντες. Η μόλυνση τείνει να εμφανίζεται, κατά μέσο όρο, 3 έτη μετά τη χειρουργική επέμβαση. Η θεραπεία για λοίμωξη του μοσχεύματος περιλαμβάνει την εκτομή του μολυσμένου μοσχεύματος και τη δημιουργία εξωανατομικής παράκαμψης. [78 ,96]

➤ Αορτοεντερικά συρίγγια

Τα δευτερογενή αορτοεντερικά συρίγγια περιπλέκουν το 0,3% -2,5% όλων των ανοικτών αορτικών χειρουργικών διαδικασιών. Συμπτώματα που μπορούν να εμφανιστούν είναι η ανώμαλη γαστρεντερική αιμορραγία, αιμορραγική καταπληξία και πυρετός. Η διάγνωση επιβεβαιώνεται με γαστρο-δωδεκα-σκοπήση και CT αγγειογραφία. Το δευτερογενές αορτοεντερικό συρίγγιο παραμένει μια πολύ θανατηφόρος κατάσταση με ποσοστά θνησιμότητας έως και 50%. Η σύγκριση της ανοικτής αποκατάστασης έναντι της ενδοαγγειακής θεραπείας ως προς τα αορτοεντερικά συρίγγια έδειξε βραχυπρόθεσμο

όφελος επιβίωσης μετά από το EVAR (0% θνησιμότητα) έναντι της ανοικτής αποκατάστασης (35% θνησιμότητα). [97]

1.3.3 Επιπλοκές EVAR

➤ Ενδοδιαφυγή

Οι ενδοδιαφυγές είναι η πιο συχνά εμφανιζόμενη επιπλοκή μετά από την EVAR και αφορούν την επίμονη ροή αίματος που διαπερνά τον υπολειπόμενο σάκο ανευρύσματος υποδεικνύοντας έτσι την αποτυχία να αποκλειστεί εντελώς το ανεύρυσμα από την κυκλοφορία. [98-100] Υπάρχουν πέντε τύποι ενδοδιαφυγής που έχουν περιγραφεί εκτενώς. Ο τύπος I εμφανίζονται εξαιτίας μιας ανικανότητας σφράγισης στην εγγύς (τύπου IA) ή απομακρυσμένη (σύνδεση τύπου IB) θέση πρόσδεσης του μοσχεύματος. Ο τύπος II χαρακτηρίζεται από παλίνδρομη ροή μέσα και έξω από τον υπολειμματικό σάκο ανευρύσματος μέσω της κάτω μεσεντερικής αρτηρίας, των οσφυϊκών αρτηριών, των βοηθητικών νεφρικών αρτηριών ή της αριστερή υποκλείδιας αρτηρίας. Ο τύπος III προκαλείται από δομική αστοχία της ίδιας της ενδοπρόσθεσης είτε λόγω αποσύνδεσης των σκελών της ή σχίσιμο της. Ο τύπος IV προκαλείται από τη διαφυγή αίματος από το πορώδες του μοσχεύματος. Ο τύπος V γνωστός και ως ενδοοστάση χαρακτηρίζονται από συνεχιζόμενη άσκηση πίεσης στον ανευρυσμαρτικό σάκο παρά την έλλειψη ανιχνευόμενης ενδοδιαφυγής. Οι συχνότερες ενδοδιαφυγές είναι οι τύπου I και II και εμφανίζονται στο 15-30% των ασθενών τις πρώτες 30 ημέρες μετά τη διαδικασία. Όταν υπάρχει, οι ενδοεγκεφαλογραφήσεις αυξάνουν τον κίνδυνο για συνεχή επέκταση του ανευρύσματος και ενδεχόμενη ρήξη. [21, 101]

➤ Μετατόπιση μοσχεύματος

Η μετατόπιση του μοσχεύματος είναι μια συνηθισμένη επιπλοκή που απαιτεί δευτερογενή παρέμβαση μετά από την EVAR. Ορίζεται ως μετατόπιση της ενδοπρόσθεσης κατά περισσότερο από 5-10 mm από την αρχική της θέση. Συχνά οφείλεται σε προοδευτική διάταση του ανευρυσματικού λαιμού, αλλά μπορεί επίσης να σχετίζεται με αορτική στρέβλωση, εκφυλισμό του αορτικού τοιχώματος μετά την τοποθέτηση της ενδοπρόσθεσης. Η μετατόπιση του μοσχεύματος σχετίζεται με ενδοδιαφυγή, με επέκταση του ανευρύσματος και με πιθανή ρήξη. Η μετατόπιση έχει αναφερθεί ότι συμβαίνει στο 1-10% των περιστατικών ενδοαγγειακής αποκατάστασης της κοιλιακής αορτής, 1 χρόνο μετά την επέμβαση. [102, 103]

➤ Μόλυνση μοσχεύματος

Η μόλυνση του μοσχεύματος έχει αναφερθεί ότι συμβαίνει στο 0,4-3,0% των περιπτώσεων μετά από EVAR της κοιλιακής αορτής. Συνδέεται με υψηλούς ρυθμούς θνησιμότητας που κυμαίνονται από 25% έως 50% που συνήθως ακολουθεί το σηπτικό σοκ. Σπάνια, η λοίμωξη με ενδομήτριο μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό αορτικοεστιακού συριγγίου. Οι ασθενείς εμφανίζουν συνήθως πυρετό, λευκοκυττάρωση και πόνο στην πλάτη. [104- 107]

➤ Συστροφή / απόφραξη

Η συστροφή και/ή απόφραξη των άκρων της ενδοπρόσθεσης έχουν αναφερθεί στο 2-4% των ασθενών μετά από EVAR της κοιλιακής αορτής. Αιτίες για αυτή την επιπλοκή αποτελούν η προοδευτική μείωση του μεγέθους του υπολειπόμενου ανευρυσματικού σάκου με την πάροδο του χρόνου, υπερβολική στρέβλωση του αορτικού λαιμού και η στενή διάμετρος στον απομακρυσμένο αορτικό λαιμό. Η στρέβλωση του άκρου μπορεί να οδηγήσει σε ενδοδιαφυγές τύπου I και/ή τύπου III καθώς επίσης και σε μετατόπιση του μοσχεύματος. Μπορεί επίσης να οδηγήσει σε θρόμβωση των σκελών του μοσχεύματος και απόφραξη που μπορεί να προκαλέσει οξεία ισχαιμία κάτω άκρου. [108- 110]

➤ Θραύση ενδοπρόθεσης

Η θραύση της συσκευής θεωρείται ότι σχετίζεται με μια μικρή εγγύς καμπυλότητα της αορτής ή μπορεί να συσχετιστεί με την υπερμετρωπία του ενδοθηλίου σε σχέση με τη φυσική αορτή. Η θραύση της ενδοπρόθεσης συνήθως εμφανίζεται τις πρώτες 30 ημέρες μετά την αποκατάσταση, με μέσο χρόνο τις 15 ημέρες. Για την διάγνωση της κατάρρευσης των ενδοθηκών στις πρώτες 30 ημέρες μετά τη διαδικασία απαιτείται υψηλό επίπεδο υποψίας. Οι ασθενείς παρουσιάζουν συνήθως συμπτώματα οξείας απόφραξης της αορτής. [111, 112]

➤ Ισχαιμικές επιπλοκές

Οι ισχαιμικές επιπλοκές μετά από EVAR έχουν αναφερθεί σε περίπου 9% των περιπτώσεων, ποσοστό υψηλότερο από αυτό που παρατηρείται μετά από ανοικτή χειρουργική επέμβαση. Η ισχαιμία μπορεί να προκληθεί από αρτηριακή θρόμβωση, εμβολή, αρτηριακή ανατομή ή απόφραξη που συμβαίνει ως αποτέλεσμα της κακής θέσης του μοσχεύματος. Τα όργανα και οι αγγειακές περιοχές που μπορεί να επηρεαστούν από την ισχαιμία μετά από EVAR της κοιλιακής αορτής περιλαμβάνουν τα νεφρά, το έντερο, τα πυελικά όργανα / μυς και τα κάτω άκρα. Η ισχαιμία των κάτω άκρων είναι μία από τις πιο συνηθισμένες μορφές ισχαιμίας που παρατηρούνται μετά από EVAR της κοιλιακής αορτής, με την πλειονότητα να εμφανίζεται ως αποτέλεσμα της απόφραξης των σκελών

του μοσχεύματος. [113] Η μετεγχειρητική νεφρική ισχαιμία μπορεί να οφείλεται σε εμβολή ή διατομή αρτηριακής θρόμβωσης, μπορεί να οφείλεται σε ακούσια κάλυψη της προέλευσης των νεφρικών αρτηριών από το μόσχευμα ή μπορεί να προκύψει από τη μετατόπιση του μοσχεύματος. Η εντερική ισχαιμία μπορεί να εμφανιστεί μετά από EVAR και, όταν υπάρχει, συνηθέστερα περιλαμβάνει το κόλον, όπου αναφέρεται ότι εμφανίζεται σε 1-3% των ασθενών. [94, 114] Η ισχαιμία πυέλου έχει επίσης αναφερθεί μετά από EVAR της κοιλιακής αορτής στη ρύθμιση του εσωτερικού εμβολισμού των λαγόνιων αρτηριών. Η ισχαιμία του νωτιαίου μυελού συμβαίνει πολύ σπάνια σε συνδυασμό με την EVAR της κοιλιακής αορτής, με περίπου 14 αναφερόμενα περιστατικά μέχρι σήμερα. [115, 116]

➤ **Σύνδρομο μετα-εμφύτευσης**

Το σύνδρομο της μετα-εμφύτευσης μπορεί να εμφανιστεί μετά από EVAR και η επίπτωση κυμαίνεται μεταξύ 13-60%. Θεωρείται ότι αντιπροσωπεύει μια φλεγμονώδη ανοσομεσολαβούμενη απόκριση, με την απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτοκινών που εμφανίζεται ως αποτέλεσμα της ενδοθηλιακής ενεργοποίησης λόγω αντίδρασης στο υλικό του μοσχεύματος. [117, 118]

1. 4 Γενετική

1.4.1 Γενετικό υπόβαθρο ΑΚΑ

Τα στοιχεία από την πληθυσμιακή επιδημιολογία υποδηλώνουν ότι υπάρχει ισχυρό γενετικό υπόβαθρο στον κίνδυνο για ΑΚΑ, με μελέτες διδύμων να υποδεικνύουν ότι η κληρονομικότητα μπορεί να φτάνει ακόμα και το 70-80% ενώ η μη επιμερισμένη περιβαλλοντική επίπτωση (όπως κάπνισμα, λοιμώξεις ή επαγγελματική έκθεση) συμβάλλουν στο υπόλοιπο 20-30%. [36] Σε δημογραφικές μελέτες, περίπου το 20% των ασθενών με ΑΚΑ αναφέρουν έναν σχετικό πρώτο βαθμό συγγένειας, το οποίο είναι ουσιαστικά υψηλότερο από το 2%- 10% που τυπικά αναφέρεται από ανεπηρέαστους μάρτυρες. [38, 119 – 122] Αντίστοιχα, ένα θετικό οικογενειακό ιστορικό σχετίζεται κατά προσέγγιση με διπλασιασμό του κινδύνου που έχει ένα άτομο να αναπτύξει ΑΚΑ [35] καθώς επίσης έχει κλινικές συνέπειες, με τα περιστατικά αυτά να παρουσιάζουν αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης [123] ή μεγαλύτερο κίνδυνο ρήξης [124] από τα σποραδικά περιστατικά και ενδεχομένως χειρότερα αποτελέσματα μετά την ενδοαγγειακή αποκατάσταση. [125,

126] Στη συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών με ΑΚΑ, το πρότυπο της κληρονομικότητας φαίνεται να είναι αυτοσωμική, και υπάρχουν στοιχεία τόσο για υπολειπόμενα όσο και για κυρίαρχα μοντέλα. [127] Οικογενειακές μελέτες σύνδεσης μπορεί να εντοπίσουν μια διαφορετική γενετική οντότητα από αυτή που εντοπίζουν οι GWAS, οι οποίες επικεντρώνονται σε μεμονωμένους ασθενείς ΑΚΑ, η πλειοψηφία των οποίων δεν θα έχει οικογενειακό ιστορικό.

Η πιο εκτεταμένη οικογενειακή μελέτη σύνδεσης για ΑΚΑ διεξήχθη από τους Shibamura et al [128] οποία εξέτασε 119 οικογένειες. Δύο γενετικοί τόποι, οι 4q31 και 19q13, σχετίστηκαν με το ΑΚΑ αλλά μόνο όταν το φύλο και ο αριθμός των προσβεβλημένων ατόμων σε μια οικογενειακή ομάδα υπολογίζονταν ως συμμεταβλητές. Τα χρωμοσώματα 19 και 4 χαρακτηρίζονται ως τόποι AAA1 και AAA2 στην Online Μεντελική Κληρονομικότητα στη βάση δεδομένων Map. Το μεγάλο μέγεθος των περιοχών που εμπλέκονται σε αυτή την ανάλυση καθιστά πολύ δύσκολο τον εντοπισμό των αιτιολογικών γονιδίων ωστόσο βοηθούν στον εντοπισμό γονιδίων δυνητικού ενδιαφέροντος. Αυτές περιλαμβάνουν τον υποδοχέα ενδοθηλίνης τύπου A εντός του 4q31 και αρκετά γονίδια της καλλικρεΐνης εντός του 19q13.

Οι περισσότεροι ασθενείς που αναπτύσσουν ΑΚΑ δεν γνωρίζουν το οικογενειακό ιστορικό της πάθησης. Οι περισσότερες μελέτες που εξετάζουν τα γενετικά μοτίβα κινδύνου για την ανάπτυξη ΑΚΑ, ασχολούνται με μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs) σε υποψήφια γονίδια, σε περιστατικά και μάρτυρες χωρίς οικογενειακό ιστορικό. Αυτές οι μελέτες αναφέρουν ένα τεράστιο αριθμό γενετικών παραλλαγών που σχετίζονται με το ΑΚΑ. Οι πιο συχνά σχετιζόμενες περιοχές είναι εκείνες που σχετίζονται με την ECM, το ανοσοποιητικό σύστημα, καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου και μονοπάτια φλεγμονώδους ή πρωτεολυτικής σηματοδότησης. Πολλές από αυτές τις μελέτες, ωστόσο έχουν αντιφατικά αποτελέσματα τα οποία δεν μπορούν να αναπαραχθούν σε διαφορετικά σύνολα δειγμάτων. [129] Οι περιοχές του τοιχώματος ΑΚΑ με υψηλό κίνδυνο ρήξης έδειξαν αυξημένη έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στην αποδόμηση των συστατικών της ECM, ενώ μειωμένη έκφραση παρουσίαζαν τα γονίδια σηματοδότησης των χημειοκινών σε σύγκριση με τις περιοχές χαμηλού κινδύνου. [130]

Διάφορες μετα-αναλύσεις προτείνουν πολυμορφισμούς στα γονίδια ACE, MTHFR, AGTR1, IL10, MMP3 και TGF-β ότι σχετίζονται με ΑΚΑ. [131, 132] Μία μελέτη έχει συνδέσει ένα SNP στο γονίδιο της απολιποπρωτεΐνης (α) (LPA) και την ανάπτυξη ΑΚΑ, ωστόσο αυτή η συσχέτιση ήταν ταυτόχρονη με την ύπαρξη στεφανιαίας νόσου. [133] SNPs του υποδοχέα ενδοθηλίνης τύπου A (EDNRA) συνδέονται άρρηκτα με την καρωτιδική νόσο, [134] ενώ γονίδια όπως η καλλικρεΐνη 1 (KLK1) έχουν αποδειχθεί ότι

έχουν τροποποιημένη έκφραση στους ιστούς ΑΚΑ. [135] Φαίνεται πιθανό ότι ένας μεγάλος αριθμός αλληλομόρφων κινδύνου συνεισφέρει στη γενετική προδιάθεση για το ΑΚΑ. [136]

Μια microarray ανάλυση, προσδιόρισε συνολικά 388 διαφορετικά εκφραζόμενα γονίδια στα δείγματα ΑΚΑ, τα περισσότερα από τα οποία σχετίζονταν κυρίως με την εξέλιξη των άκρων, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης των εμβρυϊκών άκρων και των αποφύσεων. Τα NCOR1, η ιστόνη H4, E2F4 και HNF4A ήταν οι τέσσερις μεταγραφικοί παράγοντες που σχετίστηκαν με το ΑΚΑ αναφέροντας ότι ο HNF4A μπορεί να ασκήσει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη ΑΚΑ μέσω των αλληλεπιδράσεών του με τους άλλους τρεις μεταγραφικούς παράγοντες και ο αποτελώντας έτσι κατάλληλο στόχο για την ανάπτυξη θεραπευτικής στρατηγικής. [137]

Τα περισσότερα αποδεκτά γενετικά σύνδρομα αορτικού ανευρύσματος προκαλούνται από γονιδιακές βλάβες στο μονοπάτι του TGF-β, και σχετίζονται με σπάνια γενετικά σύνδρομα όπως Ehlers-Danlos σύνδρομο τύπου IV (επίσης γνωστό ως αγγειακού τύπου), σύνδρομο Marfan, σύνδρομο Loeys-Dietz και ινομυωματική δυσπλασία. Αυτά επηρεάζουν κυρίως την θωρακική αορτή, αλλά μπορούν επίσης να επηρεάσουν την κοιλιακή αορτή. [138] Ένα άλλο σημαντικό γενετικό εύρημα για το ΑΚΑ είναι ότι το μακρύτερο συνολικά μήκος των τελομερών σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης ΑΚΑ. [139] Πολλά μοντέλα ποντικών που προσομοιάζουν το σχηματισμό ΑΚΑ έχουν αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας γενετικά μέσα (αυθόρμητες ή μηχανικές μεταλλάξεις του γονιδιώματος του ζώου). Οι περισσότεροι μηχανισμοί, π.χ. ανεπάρκεια στα γονίδια Lox, LRP1, ApoE, MMP-3 και TIMP-1, αφορούν κυρίως φλεγμονώδη και δομικά μόρια, ενισχύοντας περαιτέρω τη σημασία αυτών των μηχανισμών στην ανάπτυξη ΑΚΑ. [140, 141]

Εξαιτίας της καθυστέρησης στην εμφάνιση του ΑΚΑ αλλά και τη δυσκολία συλλογής μεγάλου αριθμού προσβεβλημένων οικογενειών, οι έρευνες για το γενετικό υπόβαθρο έχουν μετατοπιστεί προς τις GWAS μελέτες. Η μεγαλύτερη γενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια μιας πολυεθνικής κοινοπραξίας που εξέτασε περισσότερα από 10.000 ΑΚΑ περιστατικά. Η μελέτη περιελάμβανε μια μετα-ανάλυση 6 GWAS από 5 χώρες (Ηνωμένες Πολιτείες, Ηνωμένο Βασίλειο, Ολλανδία, Ισλανδία και Νέα Ζηλανδία), στην οποία δεν υπήρξε διαφοροποίηση μεταξύ σποραδικών και οικογενειακών περιπτώσεων. [142] Η μελέτη αυτή υπέδειξε 10 γενετικούς τόπους που συσχετίζονται με το ΑΚΑ: 12q13 (LRP1), [143] 9p21 (CDKN2BAS1 / ANRIL), [144] 9q33 (DAB2IP), [145] 1q21.3 (IL6R), [146] 1p13.3 (PSRC1 / CELSR2 / SORT1), [147] και 19p13.2 (LDLR) [148] που ακολουθείται από τους 4 μεταγενέστερα εντοπισθέντες τόπους από τη μετα ανάλυση

των GWAS, 1q32.3 (SMYD2), 13q12.11 (LINC00540), 20q13.12 (PCIF1/MMP9/ZNF335) και 21q22.2 (ERG). [142]

Το AKA μοιράζεται πολλούς παράγοντες κινδύνου με τις αποφρακτικές μορφές αρτηριοσκλήρυνσης αλλά φαίνεται επίσης να είναι μια ξεχωριστή παθολογική οντότητα. Οι 4 από αυτές τις θέσεις 9p21 (CDKN2BAS1 / ANRIL), 1q21.3 (IL6R), 1p13.3 (PSRC1 / CELSR2 / SORT1), 19p13.2 (LDLR), και 20q13.12 (PLTP/ PCIF1/ MMP9/ ZNF335) φαίνεται να έχουν την ισχυρότερη επικάλυψη με αποφρακτικές αθηροσκληρωτικές ασθένειες. Τα AKA φαίνεται να διαφέρουν γενετικά από τα θωρακικά ανευρύσματα αορτής και αυτές οι 2 παθήσεις δεν συνυπάρχουν συνήθως στην ίδια οικογένεια. [149] Η επικάλυψη μεταξύ των γενετικών τόπων των δυο ανευρυσματικών νόσων είναι περιορισμένη υποδηλώνοντας ότι η παθοβιολογία τους είναι διακριτή. Για παράδειγμα, κανένας από τους 10 γενετικούς τόπους του AKA δεν έχουν συσχετιστεί με το θωρακικό αορτικό ανεύρυσμα ωστόσο ο ένας πολυμορφισμός από τα (rs10757274) του CDKN2BAS1 / ANRIL έχει συσχετιστεί με ενδοκρανιακό ανεύρυσμα. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την εμβρυολογική προέλευση των VSMC, τα οποία στην κοιλιακή αορτή προέρχονται από το σπλαχνικό μεσόδερμα, ενώ στη θωρακική προέρχονται από τη νευρική ακρολοφία. [150- 152]

1.4.1a LRP1

Η LRP1 είναι μέλος της οικογένειας των υποδοχέων της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας και εμπλέκεται σε πολλαπλές διεργασίες όπως η μετανάστευση και ο πολλαπλασιασμός των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων, η διατήρηση των μεταλλοπρωτεϊνικών μήτρας, των συμπλεγμάτων αναστολέων πρωτεάσης και των συστατικών εξωκυτταρικής μήτρας. Πρόκειται για ένα γονίδιο που είναι γνωστό ότι παρουσιάζει υψηλότερη έκφραση στα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα, τα μακροφάγα και τους ινοβλάστες. [153 – 156] LRP1 κατεσταλμένα – επιλεκτικά για τα λεία μυϊκά κύτταρα-ποντίκια παρουσιάζουν τροποποιημένη λειτουργία των λείων μυϊκών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της ενισχυμένης μετανάστευσης, της ανώμαλης ενεργοποίησης του TGF-β, και της σηματοδότησης PDGF. [157] Έτσι αυτή η πρωτεΐνη μπορεί να επηρεάσει την ακεραιότητα του αρτηριακού τοιχώματος και να οδηγήσει σε σχηματισμό ανευρύσματος. Έχει αναφερθεί ότι η έκφραση της LRP1 είναι μειωμένη στους ανθρώπινους AKA ιστούς. Ένας SNP, ο rs1466535, που βρίσκεται εντός του ιντρονίου 2 του γονιδίου που κωδικοποιεί την LRP1, στο χρωμόσωμα 12q13.3 συσχετίστηκε με AKA

σε μια μελέτη με 2871 AKA περιστατικά και 32.678 μάρτυρες. Αυτό το συμπέρασμα επιβεβαιώθηκε και σε μια άλλη μελέτη 1491 περιστατικών και 11060 μαρτύρων. [143, 158] Ο πολυμορφισμός αυτός που συνδέεται με το AKA έχει επίπτωση στην έκφραση του LRP1, πιθανώς μέσω τροποποιημένης ρύθμισης του LRP1 μετάγραφου. Το αλληλόμορφο κινδύνου του rs1466535 έχει συσχετιστεί με την υψηλότερη έκφραση του LRP1. Ο κίνδυνος AKA που σχετίζεται με την υψηλότερη ή χαμηλότερη έκφραση του LRP1 παραμένει προς αποσαφήνιση. Αν και μερικοί SNPs του LRP1 συνδέονται με τα επίπεδα των κυκλοφορούντων λιπιδίων, τα δεδομένα δείχνουν ότι οι σχετικοί με το AKA πολυμορφισμοί του LRP1 επηρεάζουν την αορτική, αλλά όχι την ηπατική, γονιδιακή έκφραση. Οι πολυμορφισμοί του LRP1, rs1385526 και rs1466535, φαίνεται να είναι ανεξάρτητοι από τη δυσλιπιδαιμία, το σακχαρώδη διαβήτη, την αρτηριακή πίεση ή το ιστορικό καρδιαγγειακής νόσου. [142, 143]

1.4.1.b MMPs

Περαιτέρω, προτείνεται ότι η LRP1 ρυθμίζει την αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας μέσω των μεταλλοπρωτεϊνών μήτρας (MMP). Η δέσμευση των MMPs με την LRP1 έχει αποδειχθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό ανευρύσματος. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες μήτρας (MMP) είναι πεπτιδάσες, οι οποίες συμμετέχουν στην αποδόμηση πρωτεϊνών ECM και έχουν καίρια σημασία στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη μετανάστευση και την απόπτωση. [159] Οι MMPs δεν ευθύνονται μόνο για την υποβάθμιση της δομικής ακεραιότητας της αορτής αλλά είναι επίσης σημαντικές για τη ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης και την απελευθέρωση κρυπτικών επιτόπων και αυξητικών παραγόντων. [160] Η μείωση της LRP1 μπορεί να ρυθμίσει τη δραστηριότητα των MMPs μέσω δύο μονοπατιών: άμεσης και έμμεσης. Η έμμεση οδός έχει το αποτέλεσμα η LRP1 να αποδομεί τις MMPs και να μειώνει τα επίπεδα τους, κυρίως των MMP2 και 9, μέσω της δέσμευσης επί των θρομβοσπονδινών (TSPs). Αναλυτικότερα, τα TSPS 1 και 2 αποκλείουν τις MMP 2 και MMP 9 παρεμποδίζοντας τη μετατροπή του αδρανούς μορφής προδρόμου μορίου τους σε ενεργό. Για παράδειγμα, αν τα επίπεδα της LRP1 μειωθούν, τότε τα επίπεδα του TSP2 θα αυξηθούν, οδηγώντας έτσι σε μείωση της δραστηριότητας των MMP2 και MMP 9. [153] Το LRP1 φαίνεται να είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής της έκφρασης MMP9 σε απόκριση της σύνδεσης tPA με το LRP1 υποδοχέα, καθώς επίσης να έχει άμεση επίδραση στην κυτταρική επεξεργασία των MMP9. [161]

1.4.1.c DAB2IP

Ο Gretarsdottir και οι συνεργάτες του πραγματοποιώντας μια GWAS το 2010 σε 1,292 ασθενείς με ΑΚΑ και 30,503 μάρτυρες από την Ισλανδία και την Ολλανδία, αναγνώρισαν τη συσχέτιση ενός SNP του rs7025486, που βρίσκεται εντός του ιντρονίου 1 του γονιδίου DAB2IP με το ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής. Ο πολυμορφισμός αυτός έχει συνδεθεί επίσης με τη στεφανιαία νόσο, την περιφερική αρτηριακή νόσο, τη φλεβική θρομβοεμβολή και την πνευμονική εμβολή. [145] Το DAB2IP είναι ένα μέλος της οικογένειας RAS-GTPase πρωτεϊνών ενεργοποίησης που βρίσκεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 9q33.1-q33.3. Το DAB2IP εμπλέκεται σε διάφορες βιολογικές διεργασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, η επιθηλιακή - μεσεγχυματική μετάβαση (EMT), καρκινικά βλαστοκύτταρα και η αυτοφαγία. [162]

Ο ρόλος του DAB2IP έχει περιγραφεί εκτενώς σε διάφορους καρκίνους, ωστόσο ο ακριβής ρόλος του στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής εξακολουθεί να παραμένει άγνωστο. Η συμμετοχή του DAB2IP στην προαγωγή της απόπτωσης και την καταστολή της επιβίωσης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων μέσω των μονοπατιών PI3-Akt και ASK1-JNK-MAPK το καθιστούν πιθανό υποψήφιο γονίδιο για την παθοβιολογία του ΑΚΑ. [136, 163] Το DAB2IP έχει επίσης αναφερθεί ως ένας ενδογενής αναστολέας της VEGFR2-μεσολαβούμενης σηματοδότησης, ένα σημαντικό ρυθμιστή της αγγειογένεσης. [164]

Η έκφραση του DAB2IP, η οποία είναι σημαντικά μειωμένη στους περισσότερους τύπους καρκίνου, καταστέλλεται επιγενετικά από το EZH2, μια μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης που αποτελεί τμήμα του polycomb συμπλέγματος καταστολής. Μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ του EZH2 και της έκφρασης του γονιδίου hDAB2IP έχει αναφερθεί σε κύτταρα μυελλοβλαστώματος και καρκίνου του προστάτη. Το EZH2 φαίνεται να είναι μεταγραφικός καταστολέας που εμπλέκεται με το σύστημα κυτταρικής μνήμης, την απενεργοποίηση του X-χρωμοσώματος, την ανάπτυξη της βλαστικής σειράς, την πολυδυναμικότητα των βλαστικών κυττάρων και τη μετάσταση του καρκίνου. [165, 166]

1.4.2 Επιγενετική

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο τρόπος αλληλεπίδρασης γονιδίου-περιβάλλοντος μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων. Η επιγενετική αναφέρεται σε κληρονομικές και αποκτηθείσες τροποποιήσεις στο γονιδίωμα που μεταβάλλουν τη

γονιδιακή έκφραση χωρίς να αλλάζουν την αλληλουχία DNA. Σε μερικές περιπτώσεις, οι επιγενετικές τροποποιήσεις είναι σταθερές και μεταβιβάζονται στις επόμενες γενιές, αλλά πολλές τροποποιήσεις είναι σχετικά δυναμικές και προέρχονται από περιβαλλοντικές αιτίες. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις περιλαμβάνουν μεθυλίωση του DNA, τροποποιήσεις ιστονών και μη- κωδικά RNA.

Έχει καταγραφεί μεθυλίωση του DNA που συνδέεται με το ΑΚΑ [167] και καθολικές διαφορές στα επίπεδα μεθυλίωσης DNA έχουν αναφερθεί τόσο για την παρουσία όσο και τη σοβαρότητα της ανευρυσματικής νόσου. [168] Επιπλέον, μια στοχευμένη ανάλυση των τύπων γενετικού κινδύνου ΑΚΑ έδειξε ότι ο τύπος SMYD2 είναι επίσης διαφορετικά μεθυλιωμένος. Οι μεθυλοτρανσφεράσες είναι ένζυμα που μεθυλιώνουν το DNA και τα στοιχεία στήριξης συμπεριλαμβανομένων των ιστονών και με αυτό τον τρόπο μεταβάλλουν τη γονιδιακή δραστηριότητα και τη δομή της χρωματίνης. Η μεθυλίωση του DNA εμφανίζεται φυσικά, ως αποτέλεσμα της γήρανσης και της κυτταρικής διαφοροποίησης αλλά αναγνωρίζεται επίσης ως σημαντικός παράγοντας κινδύνου για ανάπτυξη νόσων.

Παρομοίως, η μετα-μεταφραστική τροποποίηση ιστόνης με την προσθήκη ή απομάκρυνση ομάδων μεθυλίου ή ακετυλίου, φωσφορυλίωση, ουμπικουιλίωση και σουμοϋλιλίωση καταλήγουν σε καταστολή ή ενεργοποίηση της γονιδιακής μεταγραφής με μεταβολή της δομής της χρωματίνης ή με πρόσληψη πρόσθετων τροποποιητών ιστόνης. Τροποποιήσεις που αυξάνουν τη συμπύκνωση της χρωματίνης περιορίζουν την πρόσβαση των μεταγραφικών παραγόντων στο γονίδιο- στόχο, ενώ οι τροποποιήσεις που μειώνουν τη συμπύκνωση χρωματίνης οδηγούν σε αύξηση της έκφρασης γονιδίων. Τροποποιητικά ένζυμα ιστονών, όπως δεακετυλάσες (HDACs), μεθυλοτρανσφεράσες (HMT) και οι ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών (HAT), φαίνεται να εμπλέκονται σε καρδιαγγειακές παθήσεις, τον καρκίνο και τη νόσο του Alzheimer.

Οι επιγενετικές επιδράσεις στη συχνότητα, τη σοβαρότητα, και την εξέλιξη του θωρακικού και κοιλιακού ανευρύσματος δεν είναι καλά μελετημένες με τα περισσότερα δεδομένα κυρίως για το ΑΚΑ να προέρχονται από μελέτες του της αθηροσκλήρωσης και άλλων φλεγμονωδών καταστάσεων. [159]

Το κάπνισμα είναι ένα ισχυρός παράγοντας κινδύνου για το ΑΚΑ, ωστόσο, οι βασικοί μηχανισμοί για αυτή την συσχέτιση δεν είναι καλά κατανοητοί. Έκθεση σε παρατεταμένο κάπνισμα μεταβάλλει το επιγονιδίωμα, ιδιαίτερα σε κυτταρικές σειρές με έντονο πολλαπλασιαστικό δυναμικό, όπως τα λευκοκύτταρα από μυελό των οστών. Η τρέχουσα κατάσταση καπνίσματος και η προγεννητική έκθεση στον καπνό τσιγάρων επηρεάζουν έντονα την υπογραφή μεθυλίωσης του DNA. [169-172]

Μια μετα-ανάλυση που συμμετείχαν 15.907 άτομα για τον προσδιορισμό του αποτυπώματος μεθυλίωσης καπνιστών- μη καπνιστών, έδειξε ότι το 1/3 (> 7.000) των επί του παρόντος αναγνωρισμένων ανθρώπινων γονιδίων έχουν πρότυπα μεθυλίωσης που σχετίζονται με το κάπνισμα. Οι CpGs νησίδες (θέσεις μεθυλίωσης πλούσιες σε κυτοσίνη) που έχουν αιτιολογική σχέση με τις καρδιαγγειακές παθήσεις έδειξαν την ισχυρότερη συσχέτιση τόσο για τους νυν όσο και για τους πρώην καπνιστές σε σύγκριση με τα άτομα που δεν κάπνισαν ποτέ.[173] Οι πρώην καπνιστές φαίνεται να έχουν υπογραφή μεθυλίωσης που μοιάζει περισσότερο στους μη-καπνιστες, ωστόσο η διακοπή του καπνίσματος δε φαίνεται να αντιστρέφει πλήρως τις αλλαγές. [174-175]

Η εξέταση συγκεκριμένων γονιδιακών υποκινητών σε καπνιστές έχει δείξει παρόμοιες τροποποιήσεις στη μεθυλίωση του DNA σε γονίδια που σχετίζονται με το σχηματισμό ΑΚΑ όπως το F2RL3 και το ALOX15. Το ALOX15 έχει εμπλακεί στην παθογένεση του ΑΚΑ και φαρμακολογική ή γενετική αναστολή του αποτρέπει αποτελεσματικά την ανάπτυξη ΑΚΑ σε ζωικά μοντέλα. Ωστόσο, χρειάζονται περισσότερες μελέτες για το μηχανισμό που το κάπνισμα σχετίζεται με το σχηματισμό ΑΚΑ. [176-177]

Επιγενετική τροποποίηση στη γήρανση.

Η μεγάλη ηλικία συνδέεται με υψηλότερο κίνδυνο για ΑΚΑ και οι επιγενετικές αλλαγές σχετικές με τη γήρανση έχουν προταθεί ως ενδεχόμενος μηχανισμός που αυξάνει τον κίνδυνο. Αφού καθιερωθούν τα πρότυπα μεθυλίωσης κατά τη διάρκεια της ανθρώπινης ανάπτυξης, παρατηρείται μια συνολική, προοδευτική, χρονικά εξαρτώμενη, υπομεθυλίωση. [178-180]

Οι περισσότερες παρατηρήσεις έχουν γίνει σε πρωτογενείς κυτταρικές σειρές ή ζωικά μοντέλα καρκίνου και άλλων ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία, ενώ υπάρχει μικρός αριθμός παρατηρήσεων σε ηλικιωμένους με ΑΚΑ. Μελέτες του αθηρώματος σε ανθρώπους και ποντίκια παρουσιάζουν μια καθολική απώλεια της 5-μεθυλο-κυτοσίνης, μια κοινή απώλεια σε νεοπλασματικά κύτταρα. [181-183] Η 5-μεθυλο-κυτοσίνη παράγεται με μεταφορά μίας ομάδας μεθυλίου από την S-αδενοσυλμεθειονίνη, μια διαδικασία που αναστέλλεται από τη μειωμένη δραστηριότητα MTHFR και τα αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης συνδέονται που συνδέονται με τη γήρανση. [184–186] Ο Horvarth σε άρθρο του το 2013 προτείνει ότι η μεθυλίωση του DNA μετρά το σωρευτικό αποτέλεσμα του επιγενετικού συστήματος και μπορεί να προβλέψει πολλές ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία. [187] Αυτές οι παρατηρήσεις είναι πιθανόν σχετικές με τη γήρανση και αυξάνουν τον κίνδυνο για σχηματισμό ΑΚΑ.

Επιγενετική τροποποίηση στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις.

Η χρόνια φλεγμονή χαρακτηρίζει το ΑΚΑ, όπου φλεγμονώδη λευκοκύτταρα και κυτοκίνες καθώς και είδη δραστικού οξυγόνου βρίσκονται στο αγγειακό τοίχωμα τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζωικά μοντέλα ΑΚΑ. Η φλεγμονή επηρεάζει επίσης το επιγονιδίωμα των κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων και των κυττάρων των αγγειακών τοιχωμάτων. Οι Ryer et al. εξέτασαν τα προφίλ μεθυλίωσης του DNA σε όλο το γονιδίωμα των μονοπύρηνων κυττάρων που απομονώθηκαν από 20 ανθρώπους με ΑΚΑ και 21 μάρτυρες. Τέσσερα γονίδια με διαφορεική CpG μεθυλίωση ταυτοποιήθηκαν: KLHL35, CNN2, SERPINB9 και το ADCY10P1. [188] Για τρία από αυτά τα γονίδια (CNN2, SERPINB9, και ADCY10P1), η μεθυλίωση συσχετίζεται περισσότερο με την παρουσία του ΑΚΑ από ότι με την ηλικία ή το κάπνισμα και υποδεικνύει ότι η κατάσταση μεθυλίωσης αυτών των γονιδίων μπορεί να αντιπροσωπεύει έναν ανεξάρτητο και πρόσθετο παράγοντα κινδύνου για το ΑΚΑ. Μεταβολές στη μεθυλίωση του DNA εντός του υποκινητή των ανοσορυθμιστικών κυτοκινών μπορεί επίσης να επηρεάσει τον κίνδυνο για ΑΚΑ. Θεραπεία των καλλιεργημένων ανθρώπινων λεμφοκυττάρων με ιντερλευκίνη-6 αυξάνει την ολική μεθυλίωση σε αυτά τα κύτταρα.[189] Η μεθυλίωση του υποκινητή ρυθμίζει την έκφραση και τη δραστηριότητα άλλων φλεγμονωδών κυτοκινών που εμπλέκονται στον σχηματισμό ΑΚΑ συμπεριλαμβανομένων των TNF- α , IL-1 β και CCL2. [190-194] Ομοίως, οι δραστικές μορφές οξυγόνου(ROS) μπορεί να αυξήσει την ακετυλίωση ιστονών μέσω τροποποίησης της δραστηριότητας HAT για την προαγωγή της φλεγμονής. [195-197] Το υπεροξειδίο του υδρογόνου προκαλεί ακετυλίωση γονιδίων αυξάνοντας τη δραστηριότητα της HAT και καταστέλλοντας τη δραστηριότητα της HDAC. [198] Έτσι, η μείωση του οξειδωτικού στρες μπορεί να αποτελέσει στρατηγική για την καταστολή φλεγμονωδών συνθηκών όπως το ΑΚΑ.

1.4.3 Non coding RNA

Οι πιο καλά μελετημένες αλληλουχίες στο ανθρώπινο γονιδίωμα είναι εκείνες των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Ωστόσο, τα κωδικά εξόνια των γονιδίων αντιπροσωπεύουν μόνο το 1,5% του γονιδιώματος, ποσοστό που αυξάνεται στο 2% εάν ληφθούν υπόψη και οι αμετάφραστες περιοχές (UTRs). Τα τελευταία χρόνια, έχει καταστεί όλο και πιο προφανές ότι το «μη-πρωτεϊνο-κωδικό» τμήμα του γονιδιώματος είναι κρίσιμης λειτουργίας και σημασίας. Ο όρος μη κωδικό RNA (ncRNA) χρησιμοποιείται συνήθως για

αυτό το RNA που δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνη, χωρίς να σημαίνει ότι τέτοια RNA δεν περιέχουν πληροφορίες και λειτουργία. Αν και γενικά πιστεύεται ότι οι περισσότερες γενετικές πληροφορίες μεταφέρονται από πρωτεΐνες, πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι η πλειοψηφία των γονιδιωμάτων των θηλαστικών και άλλων πολύπλοκων οργανισμών μεταγράφεται στην πραγματικότητα σε ncRNAs, πολλά από τα οποία μετατρέπονται σε μικρότερα προϊόντα με επεξεργασία ή εναλλακτικό μάτισμα. Αυτά τα ncRNAs περιλαμβάνουν τα: miRNAs, snoRNAs, piRNAs, lincRNAs και τα T-UCRs και, συνολικά, την ετερογενή ομάδα των lincRNAs. [199] Αυτά τα RNAs φαίνεται να ελέγχουν διάφορες διαδικασίες όπως τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης στη φυσιολογία και την ανάπτυξη, συμπεριλαμβανομένης της χρωματινικής αρχιτεκτονικής / επιγενετικής μνήμης, τη μεταγραφή, το μάτισμα, την επεξεργασία, τη μετάφραση και την ωρίμανση του RNA. Αυτά τα RNA ρυθμιστικά δίκτυα ίσως καθορίζουν τα περισσότερα από τα περίπλοκα χαρακτηριστικά μας και μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στις ασθένειες. [200]

1.4.4 miRNAs

Το πρώτο miRNA ανακαλύφθηκε πριν από περίπου 30 χρόνια στο νηματοειδές *Caenorhabditis elegans* με την ταυτοποίηση του αναπτυξιακού ρυθμιστή *lin-4*. [201] Αρχικά πιστευόταν ότι είναι ένα συνηθισμένο γονίδιο που κωδικοποιεί πρωτεΐνη, αλλά τα εργαστήρια των Ruvkun και Ambros έκαναν την εκπληκτική ανακάλυψη ότι το *lin-4* δεν κωδικοποιούσε πρωτεΐνη αλλά αντίθετα κωδικοποιεί ένα ρυθμιστικό RNA 22 νουκλεοτιδίων. Έδειξαν ότι το RNA *lin-4* θα μπορούσε να δημιουργήσει ζεύγος με το mRNA ενός άλλου γονιδίου στο αναπτυξιακό δίκτυο του *C. elegans*, το *lin-14*, και να ελέγξει την παραγωγή της πρωτεΐνης LIN-14. [202, 203] Αυτή η ανακάλυψη θα είχε περιορισμένη σημασία εκτός της ερευνητικής κοινότητας του *C. elegans* αν δεν είχε ανακαλυφθεί και ένα δεύτερο miRNA, το *let-7*. [204] Το πιο σημαντικό είναι ότι το *let-7* διατηρείται σε πολλούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτή η κατηγορία μικρών ρυθμιστικών RNAs έχει γενικότερο ρόλο στη βιολογία. [205] Η άλλη εκπληκτική εξέλιξη, που εμφανίστηκε την ίδια χρονική περίοδο, ήταν η ανακάλυψη της οδού RNAi, συγκεκριμένα, τα RNA των περίπου 21 νουκλεοτιδίων που ενεργοποιούν μηχανισμούς σίγασης. [206-209] Στη συνέχεια, πολλά χιλιάδες miRNAs έχουν ανακαλυφθεί σε πολλούς οργανισμούς και σήμερα υπάρχουν πάνω από 2500 miRNAs στο ανθρώπινο γονιδίωμα. [210] Δεδομένου ότι κάθε miRNA προβλέπεται να

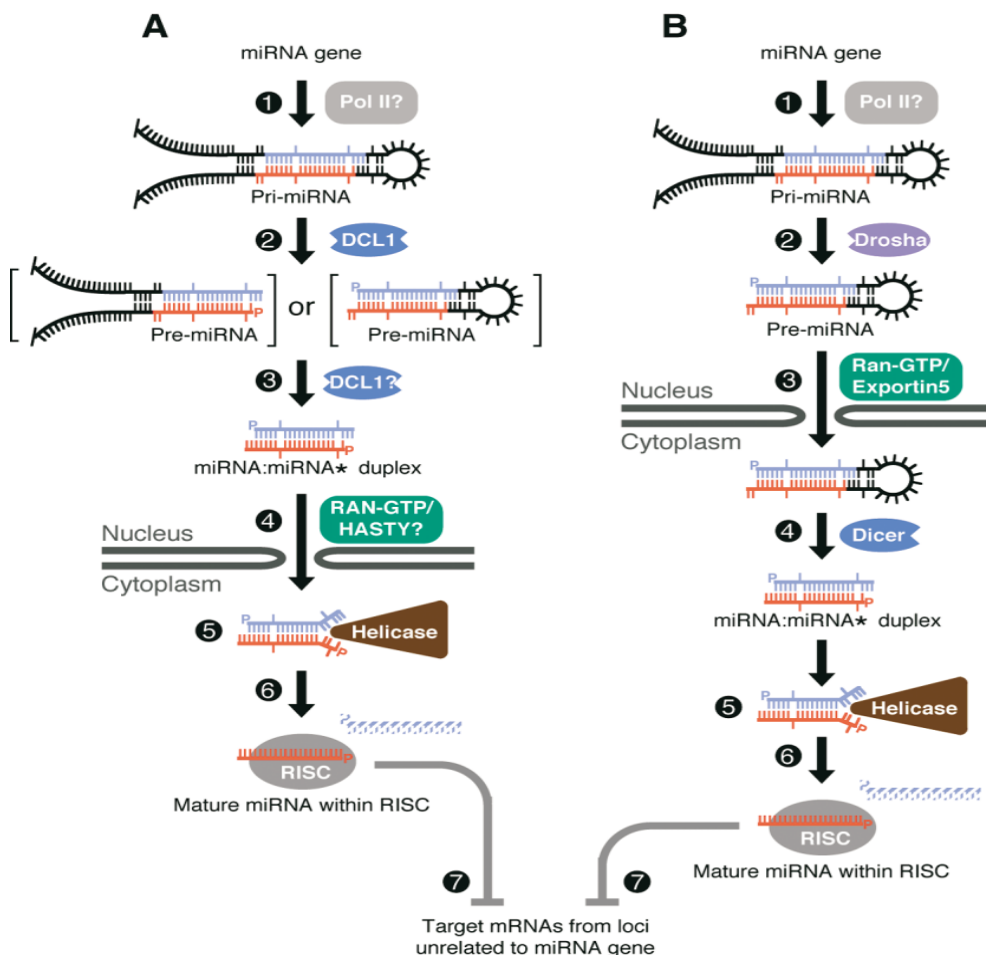
ρυθμίζει την έκφραση εκατοντάδων γονιδίων στόχων, η οδός miRNA ως σύνολο είναι ένας κρίσιμος μηχανισμός για τον έλεγχο γονιδιακής έκφρασης. [211]

Όλες οι οικογένειες miRNA υποβάλλονται σε μία σειρά σταδίων βιογένεσεως που μετατρέπουν το πρωτεύον μετάγραφο του miRNA στο δραστικό, ώριμο miRNA περίπου 22 νουκλεοτιδίων. Το ώριμο miRNA φορτώνεται σε σύμπλοκο όπου το κατευθύνει στα στοχευόμενα mRNAs, οδηγώντας σε καταστολή της μετάφρασης και αποικοδόμηση του mRNA στόχου. [212] Τα miRNA γονίδια βρίσκονται σε όλο το γονιδίωμα. [213] Πολλά γονίδια miRNA είναι μη κωδικοποιητικά γονίδια των οποίων το μοναδικό μεταγραφικό προϊόν είναι το miRNA. Σε άλλες περιπτώσεις το miRNA βρίσκεται εντός ενός εσωνίου ή μιας αμετάφραστης περιοχής (UTR) ενός γονιδίου που κωδικοποιεί πρωτεΐνη. Το καθοριστικό χαρακτηριστικό όλων των γονιδίων miRNA είναι η δομή φουρκέτας (stem-loop structure) του πρόδρομου RNA. [214-216] Τα miRNAs γενικά δεν βρίσκονται μέσα στα εξώνια κωδικοποίησης, καθώς η αποκοπή του miRNA θα οδηγούσε σε απώλεια του μετάγραφου που κωδικοποιεί πρωτεΐνη. Η μεταγραφή του γονιδίου miRNA πραγματοποιείται από την RNA πολυμεράση II οδηγώντας στο πρωτογενές μετάγραφο του miRNA, το pri-miRNA. [217, 218] Το pri-miRNA συρρικνώνεται τυπικά, καλύπτεται και πολυαδενυλιώνεται με παρόμοιο τρόπο με τα mRNA που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη. [219] Το pri-miRNA απαιτεί δύο στάδια επεξεργασίας από ενδονουκλεάση πριν γίνει ώριμο, ενεργό miRNA. [220] Το πρώτο στάδιο επεξεργασίας λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια ή μετά τη μεταγραφή του pri-miRNA από το ένζυμο Drosha. [221, 222] Η πρωτεΐνη δέσμευσης RNA DGCR8 συνδέεται με το Drosha για τη διάσπαση του pri-miRNA. [223-225] Από τη διάσπαση απελευθερώνονται τα πρόδρομα pre-miRNA με τη δομή φουρκέτας και μεταφέρονται εκτός πυρήνα με τρόπο εξαρτώμενο από μια Ran-GTPase, την Exportin5. [226-228] Στο κυτταρόπλασμα λαμβάνει χώρα το δεύτερο στάδιο επεξεργασίας. Η ενδονουκλεάση Dicer διασπά την περιοχή βρόχου του pre-miRNA απελευθερώνοντας το ώριμο πλέον miRNA. [229-231] Παρόμοια με την Drosha, η Dicer συνδέεται επίσης με μια πρωτεΐνη δέσμευσης RNA, την TRBP. Το προϊόν της αντίδρασης είναι ένα δίκλωνο μόριο RNA μήκους περίπου 22 νουκλεοτιδίων. [232-233]

Η τελική μοίρα του miRNA είναι να ενσωματωθεί στο RISC (ή miRISC). Η ακριβής σύνθεση αυτού του πρωτεϊνικού συμπλόκου δεν είναι ξεκάθαρη αλλά περιέχει την βασική πρωτεΐνη Argonaute, από την οποία τα τέσσερα μέλη της οικογένειας έχουν ταυτοποιηθεί στους ανθρώπους (Ago1-4). [234] Σύμφωνα με το τρέχον μοντέλο, το δίκλωνο miRNA ενσωματώνεται σε ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών της οικογένειας Ago. Ο ένας κλώνος του miRNA συνήθως αποδομείται ενώ ο άλλος κλώνος (κλώνος οδηγός-guide strand) παραμένει δεσμευμένος στην Ago ως ώριμο miRNA. Πρόσφατα στοιχεία έδειξαν ότι η

θερμοδυναμική σταθερότητα των δύο άκρων του δίκλωνου μορίου καθορίζει ποια έλικα θα επιλεγεί. [235] Εάν το δίκλωνο miRNA έχει συμπληρωματικότητα στην κεντρική περιοχή, ο αστεροειδής κλώνος μπορεί να κοπεί με Ago2 και να αποικοδομηθεί περαιτέρω από το σύμπλοκο νουκλεάσης C3PO. [236, 237] Ωστόσο, τα περισσότερα miRNA στερούνται κεντρικής συμπληρωματικότητας και συνεπώς δεν μπορούν να συμμετάσχουν στην διάσπαση των αστεροειδών κλώνων. Αυτά τα δίκλινα miRNA βασίζονται στο ξετύλιγμα των κλώνων και έχουν περιγραφεί αρκετές ελικάσες που συμμετέχουν σε αυτή τη δραστηριότητα. [238,239] Η Dicer και πρωτεΐνες της Ago οικογένειας, συμβάλλουν στη φόρτωση του ώριμου miRNA στο σύμπλοκο επαγόμενης από το RNA αποσιώπησης RISC. [240, 241] Μετά τη φόρτωση, το RISC καθοδηγεί το miRNA στο mRNA στόχο του, το οποίο αποσιωπείται μέσω αποδόμησης ή καταστολή της μετάφρασης. [220]

Για να εξασφαλιστεί η σωστή έκφραση του miRNA, η διαδικασία βιογένεσης του miRNA ρυθμίζεται στη μεταγραφικό, DROSHA, DICER και RISC επίπεδο. Τα περισσότερα γονίδια miRNA μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II και επομένως ρυθμίζονται σε αυτό το επίπεδο με τον ίδιο τρόπο όπως τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, δηλ. η μεταγραφή τους ελέγχεται από τους παράγοντες μεταγραφής που σχετίζονται με την RNA Pol II και επιγενετικούς ρυθμιστές. [217, 219]



Εικόνα 3. (Α) Η βιογένεση ενός φυτικού miRNA (βήματα 1-6) και η ετερο-σίγαση τόπων που δεν σχετίζονται με εκείνο τον τόπο από τον οποίο προέρχεται (βήμα 7). Τα ενδιάμεσα pre-miRNA τα οποία θεωρούνται πολύ βραχύβια, δεν έχουν απομονωθεί σε φυτά. Το miRNA (κόκκινο) είναι ενσωματωμένο στο RISC (βήμα 6), ενώ το miRNA* (μπλε) αποδομείται. Ένα μονοφωσφορικό (P) σηματοδοτεί το άκρο 5' από κάθε θραύσμα. (Β) Η βιογένεση ενός miRNA μεταζώου.[242]

Λειτουργία miRNA

Η πιο γνωστή λειτουργία των miRNAs είναι η καταστολή της γονιδιακής έκφρασης με έναν από τους δύο μετα-μεταγραφικούς μηχανισμούς: 1. μεταφραστική καταστολή και 2. διάσπαση mRNA. [243, 244] Η αλληλουχία του miRNA παρέχει εξεικίδευση στην αναγνώριση συγκεκριμένων mRNAs. Οι περισσότερες θέσεις δέσμευσης του miRNA σε ζωικά mRNA βρίσκονται στην 3' UTR περιοχή σαν πολλαπλά αντίγραφα. Τα miRNA των ζώων δημιουργούν ζεύγη βάσεων με αναντιστοιχίες και εξογκώματα σύμφωνα με τη συμπληρωματικότητα των Watson-Crick. [245] Αντίθετα, στα φυτά οι θέσεις δέσμευσης των miRNA στα mRNA βρίσκονται στο κέντρο των συμπληρωματικών περιοχών, και τα περισσότερα εμφανίζουν υψηλό βαθμό συμπληρωματικότητας με την αλληλουχία του mRNA στόχου. [246-248] Ο βαθμός συμπληρωματικότητας του miRNA-mRNA είναι καθοριστικός παράγοντας της διαδικασίας του ρυθμιστικού μηχανισμού. Ο υψηλός βαθμός συμπληρωματικότητας επιτρέπει την Ago-καταλυόμενη αποδόμηση του mRNA στόχου

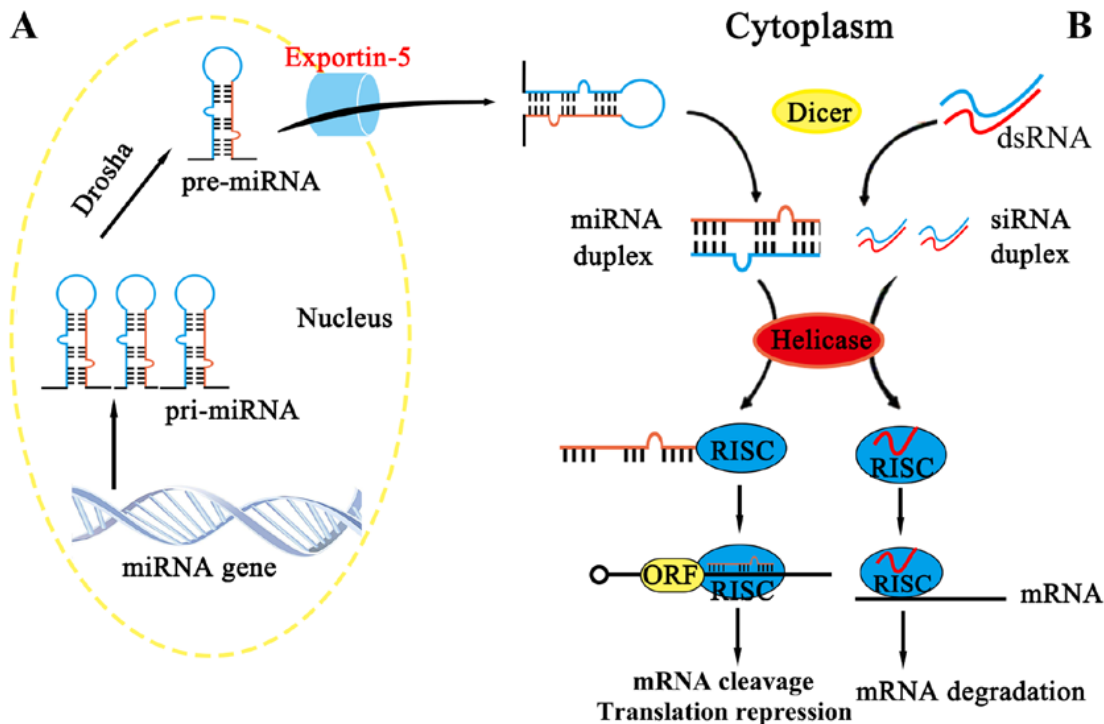
μέσω του μηχανισμού διάσπασης mRNA. Αντίθετα, στον άλλο μηχανισμό, μια κεντρική αναντιστοιχία παραλείπει την αποδόμηση και διευκολύνει το μεταφραστική καταστολή. Αποδόμηση του mRNA συμβαίνει όταν υπάρχει τέλεια συμπληρωματικότητα αλληλεπίδρασης μεταξύ mRNA και miRNA. Στα θηλαστικά η πλειοψηφία των στόχων εμφανίζουν μερική μόνο συμπληρωματικότητα όπως προαναφέρθηκε και για αυτό ο κύριος τρόπος αποσιώπησης του γονιδίου είναι η καταστολή της μετάφρασης του mRNA.

Τα miRNAs είναι ενεργά μονόκλωνα μόρια και δρουν σε μορφή συμπλέγματος με το σύμπλοκο RISC. [249] Στο 5' άκρο φέρουν μία περιοχή μήκους 2 έως 8 νουκλεοτιδίων, με την οποία αναγνωρίζουν, βάσει της Watson-Crick σύζευξης βάσεων, το mRNA-στόχο τους και η περιοχή αυτή ονομάζεται "seed site". Στις περισσότερες περιπτώσεις, η 3'UTR περιοχή των mRNA στόχων δεσμεύεται από το miRNA μέσω ατελούς συμπληρωματικότητας βάσεων. Επιπλέον, μερικώς συμπληρωματικές θέσεις στο 3' άκρο θα μπορούσαν επίσης να συμβάλλουν στη δέσμευση και να σταθεροποιήσουν την αλληλεπίδραση του miRNA-mRNA. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η πρόσδεση ορισμένες φορές συμβαίνει και στην 5' αμετάφραστη περιοχή αλλά και ενδιάμεσα αυτών, στην κωδική αλληλουχία. [250-254]

Η αποσιώπηση των γονιδίων μπορεί να συμβεί μέσω διαφόρων μηχανισμών αποδόμησης του mRNA όπως η AGO καταλυόμενη αντίδραση, η απο-αδενυλίωση από το 3' άκρο και/ή η απόσπαση του 5' άκρου. Τα μεταφραστικά ανενεργά mRNAs συσσωρεύονται σε διακριτές κυτταροπλασματικές εστίες, που ονομάζονται σώματα P, και λειτουργούν ως χώροι αποθήκευσης και αποικοδόμησης mRNA. [243, 255]

Ωστόσο, υπάρχουν αναφορές ότι τα miRNA δεν αποτελούν μόνο αρνητικούς ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης αλλά μπορούν και να την αυξήσουν. Αυτή η διαδικασία είναι σπάνια και πολύ επιλεκτική, και συμβαίνει ως απόκριση σε συγκεκριμένες κυτταρικές συνθήκες όπως η φάση G0. [256] Εκτός από τις καλά μελετημένες κυτταροπλασματικές λειτουργίες, πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι τα miRNAs μπορεί να παίζουν και πυρηνικό ρόλο. Τόσο τα miRNAs όσο και οι πρωτεϊνικοί τους συν-παράγοντες όπως οι AGOs και DICER έχουν ανιχνευθεί σε πυρήνες κυττάρων θηλαστικών. [257] Πιστεύεται ότι ρυθμίζουν άμεσα τη γονιδιακή έκφραση στοχεύοντας τους υποκινητές των διαφόρων γονιδίων. Αυτή η ρύθμιση μπορεί να είναι θετική, δηλ. ενεργοποίηση RNA (RNAa), ή αρνητική, ανάλογα με το miRNA και τον τύπο κυττάρων. Για παράδειγμα, το miR-373 ενεργοποιεί τους υποκινητές των E-cadherin και Csdc2 [258], ενώ τα miR-744, miR-1186 και miR-466d-3p επάγουν την έκφραση της κυκλίνης B1 σε κυτταρικές σειρές ποντικού μέσω της σύνδεσης του συμπλόκου RNA- AGO με τον υποκινητή Ccnb1. [259] Στις περισσότερες περιπτώσεις, ωστόσο, δεν είναι σαφές εάν τα

miRNAs δεσμεύονται απευθείας στο DNA υποκινητή ή εάν αλληλεπιδρούν έμμεσα μέσω RNA μεταγράφων που παράγονται εντός υποκινητών και ενισχυτών. [260, 261]



Εικόνα 4. Ο μηχανισμός του miRNA και του siRNA. (A) το miRNA παράγεται από ενδογενή γονίδια που περιέχουν δομές φουρκέτας 65-70 νουκλεοτιδίων pre-miRNA. Η δομή φουρκέτας υποβάλλεται σε επεξεργασία από το σύμπλοκο Drosha-DGCR8 σε pro-miRNA στον πυρήνα, μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα μέσω της Exportin-5, κατόπιν επεξεργάζεται σε miRNA από την Dicer και φορτώνεται σε πρωτεΐνη Argonaute (AGO2). (B) το siRNA που προέρχεται από το μακρύ δίκλωνο μόριο RNA που κόβεται σε θραύσμα 21-25 νουκλεοτιδίων από το ένζυμο Dicer και στη συνέχεια φορτώνεται σε πρωτεΐνη Argonaute (AGO2). [262]

Τα miRNAs εκτιμάται ότι ρυθμίζουν τη μετάφραση περισσότερων από 60% γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Συμμετέχουν στη ρύθμιση πολλών διαδικασιών, συμπεριλαμβανομένου του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης, της απόπτωσης και της ανάπτυξης. Έχει υπολογισθεί πως σε κάθε μονόκλωνο miRNA αντιστοιχούν περισσότερα από 1,000 γονίδια στόχοι και ταυτόχρονα κάθε γονίδιο που κωδικοποιείται σε πρωτεΐνη μπορεί να ρυθμίζεται από πολλαπλά μόρια miRNA. [263] Αυτό συμβαίνει λόγω της μερικής συμπληρωματικότητας που απαιτείται προκειμένου να επιτευχθεί η αλληλεπίδραση miRNA-mRNA. [264] Συνεπώς, διαφορετικά γονίδια μπορούν να περιέχουν μοτίβα πρόσδεσης ίδιων miRNAs και ένα συγκεκριμένο γονίδιο μπορεί να έχει πολλαπλά μοτίβα πρόσδεσης για διαφορετικά μόρια miRNAs. Ενώ μερικά miRNAs ρυθμίζουν συγκεκριμένα μεμονωμένους στόχους, άλλα μπορούν να λειτουργήσουν ως κύριοι ρυθμιστές μιας διαδικασίας, κι έτσι τα βασικά miRNAs ρυθμίζουν τα επίπεδα έκφρασης εκατοντάδων γονιδίων ταυτόχρονα, και πολλά είδη miRNA ρυθμίζουν τους στόχους τους σε συνεργασία. Για αυτό το λόγο τα miRNAs μπορούν να θεωρηθούν ως

ρυθμιστές μιας κυτταρικής λειτουργίας ή ενός κυτταρικού προγράμματος και όχι μόνο ενός συγκεκριμένου γονιδίου. [265,266] Διάφορες μελέτες έκφρασης γονιδίων έδειξαν μεταβολές στην έκφραση miRNA σε ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων ασθενειών. Σε πολλές περιπτώσεις, λειτουργικές μελέτες έχουν συνδέσει τη δυσλειτουργία των miRNA ως αιτιολογικό παράγοντα της προόδου της νόσου.

Λειτουργικές μελέτες έχουν υποστηρίξει το ρόλο κάποιων miRNAs για την προώθηση ή την πρόληψη της ανάπτυξης και της εξέλιξης του καρκίνου. Μεταβολές στην έκφραση miRNA έχουν αποκαλυφθεί σε πολλούς τύπους καρκίνου καθώς φαίνεται να εμπλέκονται σε κυτταρικές διαδικασίες που διαταράσσονται στον καρκίνο, όπως η κυτταρική αύξηση, η κυτταρική διαίρεση και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός. [267] Μελέτες μεγάλης κλίμακας για την ανάλυση προφίλ έχουν αποκαλύψει υπογραφές miRNA για τύπους και υποτύπους καρκίνου οι οποίες εμφανίζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον για την κλινική διάγνωση. [268] Τα miRNAs μπορούν να ενεργοποιήσουν την διακοπή του κυτταρικού κύκλου και τη γήρανση του κυττάρου σε περίπτωση βλάβης του DNA, διεγείροντας άμεσα και έμμεσα το γονίδιο του καταστολέα όγκου p53. Τα εν λόγω μόρια μπορούν να λειτουργήσουν είτε ως ογκογονίδια είτε ως γονίδια καταστολής όγκων μέσω της ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και/ ή της απόπτωσης. Έχουν λοιπόν ταυτοποιηθεί αρκετά ογκογόνα miRNAs (oncomiRs) που σχετίζονται με τον καρκίνο και τα οποία θα μπορούσαν στο μέλλον να αποτελέσουν χρήσιμα εργαλεία στη διάγνωση, τη πρόγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου. [269] Ωστόσο αξίζει να σημειωθεί πως υπάρχουν miRNAs τα οποία έχει φανεί πως δρουν ογκοκατασταλτικά, και η καταστολή των συγκεκριμένων miRNAs οδηγεί σε αυξημένο πολλαπλασιασμό, ικανότητα μετάστασης ή/ και αγγειογένεσης, περιορισμό της απόπτωσης, αποδιαφοροποίηση, γεγονότα που οδηγούν σε σχηματισμό όγκου. [270, 271]

Τα miRNAs έχουν συνδεθεί με αρκετές μεταβολικές νόσους καθώς εμπλέκονται σε ποικίλες μεταβολικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένου του μεταβολισμού και της μεταφοράς της χοληστερόλης και των λιπαρών οξέων, της λειτουργίας των παγκρεατικών νησιδίων και του μεταβολισμού της γλυκόζης. [272] Επίσης έχουν συνδεθεί με πλήθος άλλων παθολογικών καταστάσεων όπως η καρδιακή ανεπάρκεια, διάφορες νευροαναπτυξιακές διαταραχές όπως η σχιζοφρένεια, αυτοάνοσα νοσήματα, νοσήματα του ήπατος, νοσήματα των σκελετικών μυών και νοσήματα του δέρματος. [273]

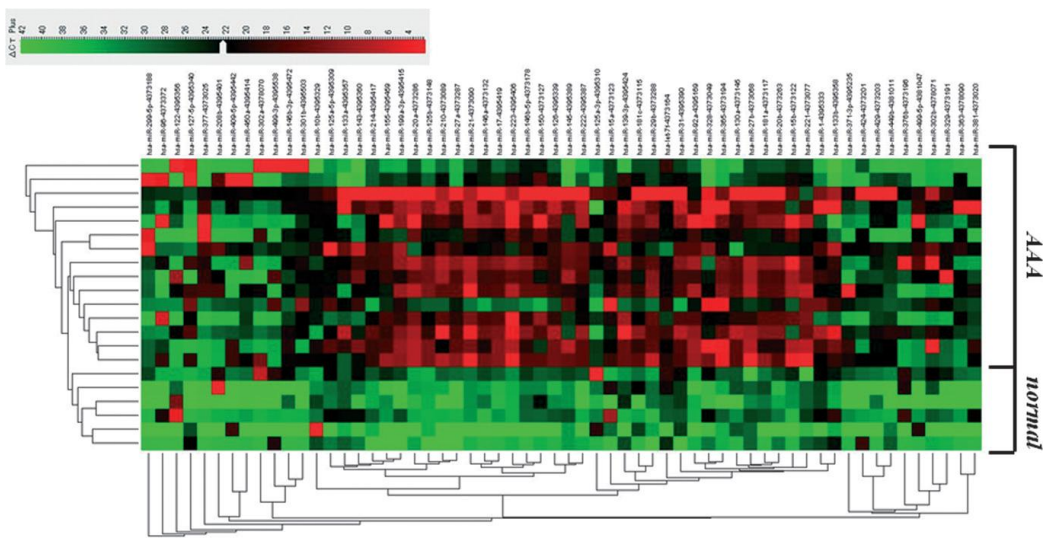
1.4.4.a miRNAs σε καρδιαγγειακές διαταραχές.

Αρκετά στοιχεία υποδεικνύουν ότι τα miRNAs παίζουν σημαντικό ρόλο στις διαταραχές του καρδιαγγειακού συστήματος. Ιστο-ειδική εξάλειψη της Dicer σε ποντικούς προκαλεί θανατηφόρους φαινότυπους στις μυοκαρδιακές και αγγειακές καταβολές. [274,275] Το πιο άφθονο miRNA στα καρδιακά μυοκύτταρα είναι το miR-1, το οποίο εμπλέκεται στην ανάπτυξη της καρδιάς. [276] Αυτό το miRNA έχει συνδεθεί με την εμφάνιση αρρυθμιών καθώς είναι αρνητικός ρυθμιστής της έκφραση των γονιδίων του διαύλου ιόντων. [277] Επιπλέον, ο ιστός του μυοκαρδίου σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια παρουσιάζει ένα ξεχωριστό προφίλ έκφρασης miRNAs σε σύγκριση με υγιείς. [278] Τα miRNAs παίζουν επίσης ρόλο στην αγγειακή νόσο, καθώς ο σχηματισμός της αθηρωματικής πλάκας και ο φυσιολογικός φαινότυπος των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων εξαρτάται από τη σωστή έκφραση αρκετών miRNAs, όπως τα miR-10a, miR-145, miR-143 και miR-126. [279-281] Όπως και με την καρδιακή ανεπάρκεια, μια διαφορετική υπογραφή miRNA διακρίνει την αγγειακή βλάβη από τον υγιή ιστό. [282] Τέλος, SNPs που επηρεάζουν τις θέσεις δέσμευσης miRNA, έχουν συσχετιστεί με απεριορίστη μυϊκή αύξηση και υπέρταση, που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου. [283, 284]

1.4.4.b miRNAs και ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής

Τα miRNAs φαίνεται να εμπλέκονται στις μοριακές διαδικασίες που συμμετέχουν στην ανάπτυξη του ανευρύσματος. [285] Ποικίλα miRNAs όπως τα miR-24 miR-126 miR-155 διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη της αγγειακής φλεγμονής. [286-288] Η οικογένεια miR-29 και miR15 αναφέρεται όλο και περισσότερο να σχετίζεται με τη σηματοδότηση του TGF-β μονοπατιού και την αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας ύλης. [289,290] Η απορρύθμιση της αλλαγής φαινοτύπου και της απόπτωσης των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων VSMC συμβάλλουν στην ανάπτυξη και την εξέλιξη των αγγειακών παθολογιών όπως τα αορτικά ανευρύσματα. Τα miRNAs, συμπεριλαμβανομένων των miR-21, miR-26a, miR-126, miR-143/145 και miR-663 αποτελούν κρίσιμους διαμορφωτές της λειτουργίας των VSMC, όπως η κυτταρική διαφοροποίηση, η μετανάστευση, ο πολλαπλασιασμός, η ασβεστοποίηση και η απόπτωση. [280, 291- 294] Ποικίλες microarray αναλύσεις, οι οποίες ωστόσο περιλαμβάνουν μικρό αριθμό δειγμάτων, αποκάλυψαν δεκάδες miRNA με διαφορετική έκφραση σε ανευρυσματικούς ιστούς σε σύγκριση με υγιείς. Το προφίλ έκφρασης των miRNA σε ανθρώπινους ανευρυσματικούς ιστούς ήταν αρκετά διαφορετικό από αυτό στους φυσιολογικούς αορτικούς ιστούς με τα

περισσότερα από αυτά να παρουσιάζονται υπερεκφρασμένα (miR-545-3p, -181α,- 126, - 29b, - 133α, -30γ, -204) και να περιλαμβάνουν miRNAs που επηρεάζουν το ενδοθήλιο (let-7f και miR-20a, -21, -27, -92α, -126, -221 και -222), τη φλεγμονώδη απόκριση (miR-124a, -146a, -155, -223) και την ίνωση (miR-29b). Η έκφραση των περισσότερων miRNAs ήταν σημαντικά αυξημένη σε ιστούς ΑΚΑ αλλά αντίθετα στο πλάσμα των ασθενών ΑΚΑ τα ίδια miRNA δεν παρουσίασαν το ίδιο πρότυπο έκφρασης. [295,296] Οι Stather et al χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα miRWalk προέβλεψαν επίσης πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφορετικά εκφρασμένων miRNAs let-7e, miR-15a, miR-196b και miR-411 και γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη ΑΚΑ (MMP-2, MMP-9, TIMP-1, IL-6, TNF-α, DAB2IP, LRP1, sortilin 1, LDLR και sortilin1). [297]



Εικόνα 5. Θερμικός χάρτης των διαφορετικά εκφρασμένων miRNAs σε 13 αρτηκούς ιστούς από ασθενείς με ΑΚΑ και 7 φυσιολογικούς αρτηκούς ιστούς. [296]

2. ΣΚΟΠΟΣ

Απώτερος σκοπός της μελέτης είναι η διασαφήνιση των μοριακών μονοπατιών που διέπουν την ανάπτυξη ανευρύσματος κοιλιακής αορτής. Πιο συγκεκριμένα, στόχος είναι η διερεύνηση του μηχανισμού ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη ανευρύσματος κοιλιακής αορτής όπως το DAB2IP και το LRP1. Για να επιτευχθεί αυτό έχουν επιλεγεί να μελετηθούν τα miR-335-5p και miR-545-3p που σύμφωνα με τις βάσεις δεδομένων στοχεύουν το γονίδιο LRP1. Έτσι θα φανεί αν αποτελούν μεσολαβητές της έκφρασης του LRP1 και στη συνέχεια θα ερευνησουμε την επίδραση της έκφρασης LRP1 σε άλλα βασικά μόρια της παθογένειας του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής, όπως τα MMP2, MMP9 και TSP2. Ακολούθως θα μελετηθούν τα επίπεδα διαφορικής έκφρασης του DAB2IP σε ιστούς ΑΚΑ σε σύγκριση με τους μη ανευρυσματικούς ιστούς και θα διερευνηθούν εάν το miR-363-3p (το οποίο στοχεύει το γονίδιο DAB2IP σύμφωνα με τις βάσεις δεδομένων) και το EZH2 (το οποίο από τη βιβλιογραφία φαίνεται να αλληλεπιδρά με το DAB2IP) μπορούν να θεωρηθούν ως δυνητικοί μεσολαβητές της έκφρασής του στο ΑΚΑ.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Συμμετέχοντες και συλλογή δειγμάτων

Κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων ετών, συλλέχθηκαν 31 δείγματα πλήρους πάχους αορτικού ιστού από το πρόσθιο τμήμα του σημείου μέγιστης διαμέτρου της ενδοθηλιακής αορτής ασθενών (n= 31) που υποβλήθηκαν σε ανοικτή αποκατάσταση ΑΚΑ. Οι συμμετέχοντες (29 άνδρες, 2 γυναίκες) χειρουργήθηκαν στην Α' Χειρουργική κλινική του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Αθηνών και η μέση ηλικία τους ήταν $71,8 \pm 8,23$ έτη. Συλλέχθηκαν επίσης δείγματα μη ανευρυσματικού ιστού από το λαιμό του ανευρύσματος για χρήση ως μάρτυρες (n= 15), όταν ήταν εφικτό από τεχνικής άποψης και χωρίς να διακυβεύεται η τεχνική επιτυχία της διαδικασίας και τα αναμενόμενα αποτελέσματα των ασθενών.

Τα δείγματα ιστών μεταφέρθηκαν και αποθηκεύθηκαν στους -80° C στο εργαστήριο βιολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών έως ότου να γίνουν οι αναλύσεις. Η συγκεκριμένη μελέτη διεξήχθη σύμφωνα με τα πρότυπα που θέτει η πιο πρόσφατη ενημέρωση της Διακήρυξης του Ελσίνκι. Όλοι οι συμμετέχοντες αφού αρχικά ενημερώθηκαν για τη χρήση των δειγμάτων τους στην παρούσα μελέτη, μας παρείχαν γραπτή ενημερωμένη συναίνεση. Στη συνέχεια, όλοι οι συμμετέχοντες ασθενείς κλήθηκαν να συμπληρώσουν ερωτηματολόγιο το οποίο περιείχε πληροφορίες σχετικές με ανθρωπομετρικά στοιχεία, ατομικό και οικογενειακό ιστορικό. Το ατομικό ιστορικό περιείχε πληροφορίες για τον τρόπο ζωής, το ιστορικό υγείας, δημογραφικά στοιχεία καθώς και πληροφορίες για το κοινωνικό και οικογενειακό περιβάλλον. Το ερωτηματολόγιο του οικογενειακού ιστορικού περιλάμβανε χρόνιες παθήσεις συγγενών πρώτου βαθμού, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, καρδιακές προσβολές, εγκεφαλικά επεισόδια, στηθάγχη, καρκίνος κ.τ.λ. Στην πορεία έγινε λήψη αίματος από τους ασθενείς και πραγματοποιήθηκαν αιματολογικές και βιοχημικές εξετάσεις.

Αναζήτηση των προς μελέτη miRNAs

Πραγματοποιήσαμε βιοπληροφορική ανάλυση χρησιμοποιώντας τις βάσεις δεδομένων για miRNAs: miRTarBase, mirdb.org, TargetScanHuman 7.3. Σε αυτές τις βάσεις δεδομένων αναφέρονται τα miRNAs και όλοι οι γνωστοί πιθανοί στόχοι τους βάσει *in silico* αναλύσεων. Η αναζήτηση μας περιορίστηκε στα miRNAs που στοχεύουν τα σχετιζόμενα με το ΑΚΑ γονίδια, LRP1 και DAB2IP, τα οποία και θα μελετηθούν στην εργασία μας. Τα miRNAs που επιλέχθηκαν για το LRP1 είναι τα miR-545-3p και miR-335-5p ενώ το miR-363-

3p για το DAB2IP. Στον παρακάτω πίνακα (Πιν.2) φαίνεται η περιοχή πρόσδεσης του κάθε miRNA στην 3' UTR περιοχή των γονιδίων. Επίσης παρουσιάζεται η προβλεπόμενη αντιστοίχιση της περιοχής στόχου με την ακολουθία του miRNA βάσει συμπληρωματικότητας.

Πίνακας 2. Θέση πρόσδεσης των προς μελέτη miRNAs στην 3' UTR περιοχή του γονιδίου-στόχου. Η προβλεπόμενη αλληλουχία αντιστοίχισης της περιοχής στόχου και της miRNA σύμφωνα με τη συμπληρωματικότητα των βάσεων.

Περιοχή πρόσδεσης στην 3' UTR	Προβλεπόμενη αντιστοίχιση της περιοχής στόχου (επάνω) και του miRNA (κάτω)
LRP1 : Θέση 416 – 422 Mir-545-3p	5' ...GGGAAGGGAGAGUUCUUUGCUGC.. 3' CGUGUGUUUUUUAACAACGACU
LRP1 : Θέση 476 – 486 Mir-335-5p	5' ...GUGUUUUAGUUCUUGGGGAGG... 3' UGUAAAAAGCAAUAACGAGAACU
DAB2IP: Θέση 1927-1935 Mir-363-3p	5' ...ACUCUGUGGGCUUGGCAAUUUCU.. 3' AUGUCUACCUAUGGCACGUUA

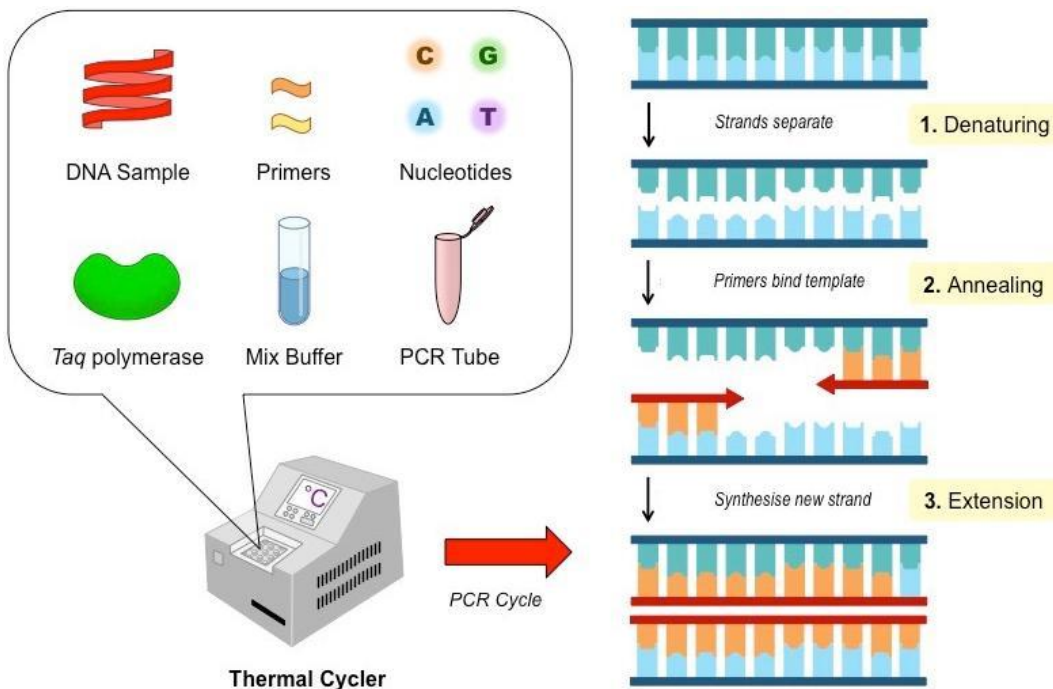
Απομόνωση DNA και γονοτύπηση

Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του γενωμικού DNA από τους ιστούς έγινε με χρήση του προτυποποιημένου συστήματος Genomic DNA from tissue (Nucleospin® Tissue) της εταιρείας MACHEREY-NAGEL. Με τη μέθοδο Nucleospin® Tissue μπορεί να απομονωθεί γενωμικό DNA από ιστούς, κύτταρα (π.χ. βακτήρια) και πολλές άλλες πηγές. Η λύση των κυττάρων επιτυγχάνεται μετά από την επώαση του δείγματος με διάλυμα πρωτεΐνάσης K/SDS. Η απομόνωση του DNA στηρίζεται στην πρόσδεση (προσρόφηση) των νουκλεϊκών οξέων σε στήλες από διοξείδιο του πυριτίου NucleoSpin® Tissue Columns , σε περιβάλλον υψηλής ιοντικής ισχύος και χαμηλού pH που δημιουργείται από την προσθήκη χαστροπικών αλάτων και αιθανόλης στο κυτταρόλυμα. Η διαδικασία δέσμευσης είναι αναστρέψιμη και ειδική για τα νουκλεϊκά οξέα. Οι προσμίξεις απομακρύνονται στη συνέχεια κατά τις πλύσεις με δύο διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα. Καθαρό γονιδιωματικό DNA τελικά εκλύεται υπό συνθήκες χαμηλής ιοντικής ισχύος σε ένα ελαφρώς αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης- PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης είναι μια *in vitro* ενζυμική μέθοδος η οποία κάνει δυνατή την παραγωγή πολυάριθμων αντιγράφων ενός μορίου DNA σε σύντομο χρονικό διάστημα. Με τη μέθοδο αυτή παράγονται τεράστια ποσά μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας, χρησιμοποιώντας μικρές αρχικές ποσότητες DNA (0.1-1 μg). Κατά την PCR χρησιμοποιείται ένα ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων, καθένας από τους οποίους υβριδοποιείται σε έναν κλώνο ενός δίκλωνου μορίου DNA που χρησιμεύει ως μήτρα. Οι υβριδοποιημένοι εκκινήτες λειτουργούν ως υπόστρωμα για μια θερμοσταθερή, όπως αυτή του *Thermus aquaticus* (Taq), DNA πολυμεράση κι έτσι για κάθε αλυσίδα του υποστρώματος δημιουργείται ένας συμπληρωματικός κλώνος DNA μέσω της διαδοχικής προσθήκης ελεύθερων δεοξυ-ριβονουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dCTP, dGTP). Η διαδικασία της PCR συνήθως περιλαμβάνει τρία βήματα που επαναλαμβάνονται για 30-40 κύκλους: την αποδιάταξη της μήτρας DNA, την υβριδοποίηση των εκκινήτων με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA-στόχου, και την επιμήκυνση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ειδικά όργανα που ονομάζονται θερμικοί κυκλοποιητές, οι οποίοι εκτελούν τα βήματα των κύκλων της PCR στους επιθυμητούς χρόνους και θερμοκρασίες.



Εικόνα 6. Τα απαραίτητα συστατικά που χρειάζονται για να πραγματοποιηθεί η PCR στον θερμικό κυκλοποιητή. Ο κάθε κύκλος περιλαμβάνει τα στάδια της αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης.

Για να προσδιοριστεί ο πολυμορφισμός rs1466535 (C/T) με PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Forward: 5'ATGTGACTGGGCTACGTATTGGG-3' και Reverse: 5'- TGAGGCAGGAGAATCGCTTGAA-3' και το προτυποποιημένο σύστημα KAPA Taq PCR Kit with Mg-free Buffers της εταιρείας KAPABIOSYSTEMS σε αναλογίες που προτείνει ο κατασκευαστής.

Το ενισχυμένο προϊόν των 237 ζευγών βάσεων προέκυψε μετά από 40 κύκλους PCR, οι οποίοι περιελάμβαναν τα παρακάτω βήματα:

Πίνακας 3. Οι συνθήκες της PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του τμήματος που περιλαμβάνει τον rs1466535

Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος
1 ^ο Ενεργοποίηση ενζύμου	94 °C	5 min
2 ^ο Αποδιάταξη	94 °C	40 sec
3 ^ο Υβριδοποίηση	55 °C	40 sec
4 ^ο Επιμήκυνση	72 °C	40 sec
5^ο Επανάληψη των βημάτων 2 έως 4 για 35 κύκλους		
6 ^ο Τελική επιμήκυνση	72 °C	5 min

Αλληλούχιση- sequencing

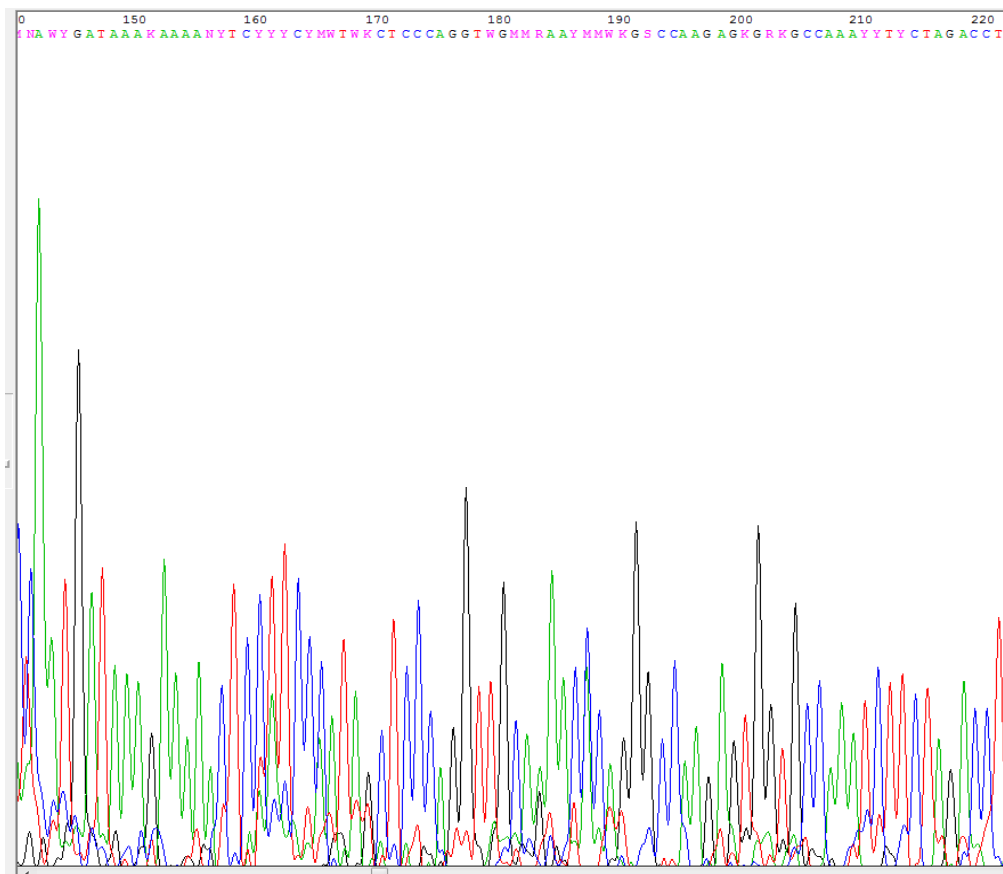
Η αλληλούχιση του DNA είναι η διαδικασία προσδιορισμού της αλληλουχίας του νουκλεϊκού οξέος- τη σειρά των νουκλεοτιδίων στο DNA. Περιλαμβάνει οποιαδήποτε μέθοδο ή τεχνολογία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της σειράς των τεσσάρων βάσεων: αδενίνη, γουανίνη, κυτοσίνη και θυμίνη. Η μεγάλη ταχύτητα αλληλούχισης που επιτυγχάνεται με την σύγχρονη τεχνολογία προσδιορισμού της αλληλουχίας DNA έχει συμβάλει στην αλληλούχιση πλήρων αλληλουχιών DNA ή του γονιδιώματος πολλών τύπων και ειδών ζωής, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπινου γονιδιώματος και άλλων πλήρων αλληλουχιών DNA πολλών ζωικών, φυτικών και μικροβιακών ειδών. Ένα παράδειγμα των αποτελεσμάτων της αυτοματοποιημένης αλληλουχίας DNA τερματισμού αλύσου. Οι πρώτες αλληλουχίες DNA ελήφθησαν στις αρχές της δεκαετίας του 1970 από ακαδημαϊκούς ερευνητές χρησιμοποιώντας κοπιώδεις μεθόδους βασισμένες σε δισδιάστατη χρωματογραφία. Μετά την ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού αλληλουχίας που βασίζονται σε φθορισμό με έναν προσδιοριστή αλληλουχίας DNA, η αλληλούχιση του DNA έγινε ευκολότερη και σημαντικά γρηγορότερη.

Η αλληλούχιση Sanger είναι μια μέθοδος προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA, βασισμένη στην εκλεκτική ενσωμάτωση τερματικών δι-δεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs) από την DNA πολυμεράση κατά την *in vitro* αναπαραγωγή του DNA. Αναπτύχθηκε από τον Frederick Sanger και συνεργάτες του το 1977, ήταν η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος προσδιορισμού αλληλουχίας για περίπου 40 χρόνια. Πιο πρόσφατα, η αλληλούχιση Sanger με μεγαλύτερο όγκο έχει αντικατασταθεί από μεθόδους προσδιορισμού αλληλουχίας "Next-Gen", ειδικά για αναλύσεις αυτοματοποιημένου γονιδιώματος μεγάλης κλίμακας. Ωστόσο, η μέθοδος Sanger παραμένει σε ευρεία χρήση, για έργα μικρότερης κλίμακας, επικύρωση των αποτελεσμάτων της Next-Gen και για την απόκτηση ιδιαίτερα μεγάλων διαδοχικών αλληλουχιών DNA (> 500 νουκλεοτιδίων).

Η κλασική μέθοδος τερματισμού αλυσίδας απαιτεί μονόκλωνο πρότυπο DNA, εκκινήτη, DNA πολυμεράση, φυσιολογικά δεξυριβονουκλεοτιδίδια (dNTPs) και τροποποιημένα δι-δεοξυνουκλεοτιδίδια (ddNTPs), με τα τελευταία να τερματίζουν την επιμήκυνση του κλώνου DNA. Τα ddNTPs στερούνται μιας 3'-OH ομάδας που απαιτείται για το σχηματισμό ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ δύο νουκλεοτιδίων και όταν ενσωματωθούν, προκαλούν τερματισμό της σύνθεσης του DNA. Επομένως, όταν προστίθεται ένα ddNTP διακόπτεται η σύνθεση της αλυσίδας του DNA. Ως αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας παράγονται όλα τα πιθανά μεγέθη του αρχικού προϊόντος. Τα ddNTPs μπορούν να επισημανθούν με ραδιενέργεια ή πιο σύγχρονα με φθορίζοντα μόρια, για ανίχνευση σε αυτοματοποιημένες μηχανές προσδιορισμού αλληλουχίας.

Με την αυτοματοποίηση της μεθόδου με τη χρήση γενετικών αναλυτών, γίνεται διαχωρισμός των διαφορετικών τμημάτων DNA με βάση το μέγεθος τους με τη χρήση της ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδή. Καθώς τα τμήματα DNA περνούν από τα τριχοειδή διεγείρεται η φθορίζουσα χρωστική με την οποία είναι σημασμένα τα ddNTPs και επειδή το μήκος κύματος της κάθε μίας διαφέρει μπορούν να διαχωριστούν. Το αποτέλεσμα που προκύπτει είναι ένα χρωματογράφημα (εικ. 7) όπου κάθε διαφορετική κορυφή αντιστοιχεί σε διαφορετική φθορίζουσα χρωστική και άρα διαφορετική βάση στη συγκεκριμένη θέση.

Στην μελέτη μας τα δείγματα των πολλαπλασιασμένων τμημάτων DNA για τον πολυμορφισμό rs1466535 αναλύθηκαν με τη μέθοδο Sanger (από την εταιρεία eurofinegenomics) για την αλληλούχιση του DNA.



Εικόνα 7. Το χρωματογράφημα που προκύπτει σαν αποτέλεσμα της αλληλούχισης του DNA. Κάθε διαφορετική κορυφή αντιστοιχεί σε διαφορετική φθορίζουσα χρωστική και άρα διαφορετική βάση στη συγκεκριμένη θέση

Απομόνωση RNA και σύνθεση cDNA

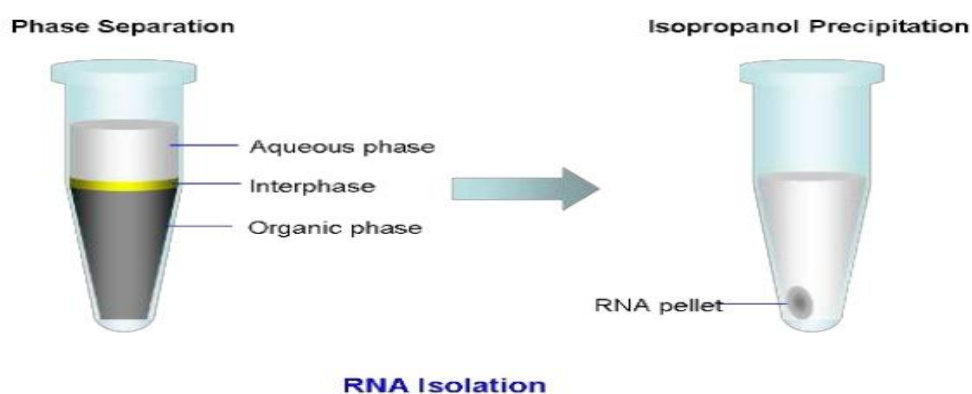
Απομόνωση RNA

Για την απομόνωση του RNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος TRIzol® (Trizol reagent-Invitrogen). Εν συντομία, η μέθοδος βασίζεται στην παρουσία δύο αντιδραστηρίων, στο ισοθειοκυανικό γουανιδίνιο που απενεργοποιεί τις RNAσες καθώς δρα ως ισχυρό αποδιατακτικό των πρωτεϊνών και στην οξική φαινόλη/ χλωροφόρμιο το οποίο βοηθά στην κατανομή του RNA στην υδατική φάση προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός του.

Το αντιδραστήριο TRIzol® είναι ένα μονοφασικό διάλυμα φαινόλης, ισοθειοκυανικής γουανιδίνης και άλλων συστατικών τα οποία διευκολύνουν την απομόνωση μιας ποικιλίας ειδών RNA μεγάλου ή μικρού μοριακού μεγέθους. Το αντιδραστήριο TRIzol® κατορθώνει να διατηρεί ακέραιο το RNA λόγω της εξαιρετικά αποτελεσματικής αναστολής της δραστηριότητας RNAσών ενώ ταυτόχρονα διαρρηγνύει τα κύτταρα και διαλύει τα κυτταρικά συστατικά κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης του δείγματος. Το εν λόγω αντιδραστήριο

επιτρέπει την ταυτόχρονη επεξεργασία ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων και αποτελεί μια βελτιωμένη μέθοδο απομόνωσης RNA ενός σταδίου που αναπτύχθηκε από τους Chomcynski και Sacchi το 1987.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 8 το αντιδραστήριο επιτρέπει την διαδοχική κατακρήμνιση του RNA, DNA και πρωτεϊνών από ένα μόνο δείγμα. Μετά την ομογενοποίηση του δείγματος με το αντιδραστήριο TRIzol® (500μl), προστίθεται χλωροφόρμιο (100μl) και το ομογενοποίημα αφήνεται να διαχωριστεί σε μία καθαρή ανώτερη υδατική στοιβάδα (περιέχουσα RNA), μια μεσαία φάση και ένα κόκκινο κατώτερο οργανικό στρώμα που περιέχει το DNA και τις πρωτεΐνες. Το RNA καταβυθίζεται από την υδατική στοιβάδα με την προσθήκη ισοπροπανόλης (500μl) Το κατακρημνισμένο RNA πλένεται με αιθανόλη 70% για να απομακρυνθούν οι ακαθαρσίες και στη συνέχεια επαναιωρείται σε H₂O RNase free προκειμένου να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω.



Εικόνα 8. Διαχωρισμός φάσεων και απομόνωση RNA μετά από προσθήκη ισοπροπανόλης.

Το απομονωμένο RNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ανάλυση RT-PCR όπως στη δική μας εργασία αλλά και σε άλλες μοριακές τεχνικές π.χ. Northern Blot ανάλυση, Dot blot υβριδοποίηση, πολυ(A)+επιλογή, in vitro μετάφραση, δοκιμασία προστασίας RNAσης και μοριακή κλωνοποίηση.

Σύνθεση cDNA

Η σύνθεση του cDNA από το ολικό RNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του TAKARA kit. Το Takara kit μας δίνει τη δυνατότητα να συνθέσουμε έναν κλώνο cDNA από ένα ολικό ή πολυA+ RNA με τη βοήθεια της PrimeScript RTase, μία αντίστροφη μεταγραφάση που

παράγεται από M-MLV (ιό μυϊκής λευχαιμίας ποντικού). Αυτό το ένζυμο είναι ικανό να συνθέσει cDNA έως 12 kb μήκους. Η PrimeScript RTase μπορεί να συνθέσει αποτελεσματικά το cDNA στους 42°C, ακόμη και από πρότυπα RNA που περιέχουν πλούσιες σε GC περιοχές ή πολύπλοκες δευτερογενείς δομές, καθιστώντας περιττή την εκτέλεση των παραπάνω αντιδράσεων σε υψηλές θερμοκρασίες οι οποίες μπορεί να αποικοδομήσουν το RNA. Το πρώτο cDNA κλώνου που συντίθεται με αυτό το kit μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ποικιλία εφαρμογών, συμπεριλαμβανομένης της σύνθεσης δεύτερου κλώνου, υβριδισμού, PCR και Real time PCR.

Πρωτόκολλο σύνθεσης cDNA

Για κάθε cDNA αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 13μl από το Master Mix και 7μl από το ολικό RNA που απομονώθηκε από τους ιστούς.

Το master mix περιείχε:

- 4μl από το 5X PrimeScript Buffer (for Real Time),
- 1μl PrimeScript RT Enzyme Mix I,
- 1μl oligodT για τα γονίδια ή 1μl ανάστροφος για κάθε miR εκκινητές
- 7μl RNase free dH₂O

Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα στον θερμικό κυκλοποιητή Kyrattec SuperCycler με τις ακόλουθες διαδοχικές συνθήκες

- 37°C για 30 λεπτά για τη δημιουργία των cDNA
- 85°C για 5 λεπτά για την αδρανοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης
- 4°C για την συντήρηση τους μέχρι την απόσυρση των δειγμάτων από την συσκευή

Ποσοτικοποίηση έκφρασης με SYBR Green Real Time PCR

Η ποσοτική PCR αποτελεί μια γρήγορη, ευαίσθητη και αξιόπιστη μέθοδο ποσοτικοποίησης μορίων DNA και cDNA. Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου αποτελεί μια τροποποιημένη μορφή της τεχνολογίας PCR στην οποία χρησιμοποιείται ένας φθορίζων ανιχνευτής που επιτρέπει τον εντοπισμό των παραγόμενων μορίων DNA από ειδική κάμερα, μέσω της συνεχούς καταγραφής της

έντασης του φθορισμού στο πέρας του χρόνου. Εκτελείται σε εξειδικευμένα μηχανήματα (θερμικοί κυκλοποιητές πραγματικού χρόνου), εξοπλισμένα με ένα πολύπλοκο σύστημα κατόπτρων και φίλτρων που «διαβάζουν» τον φθορισμό που εκπέμπεται από διάφορες φθορίζουσες χρωστικές, καθώς αυτές ενσωματώνονται στα προϊόντα της PCR. Σε κάθε αντίδραση σε συγκεκριμένο χρόνο για συγκεκριμένη ποσότητα DNA υπάρχει ένα σημείο της έντασης φθορισμού που σηματοδοτεί την είσοδο της καμπύλης ενίσχυσης του παραγόμενου DNA στην εκθετική φάση της αντίδρασης πολυμερισμού. Το σημείο αυτό ορίζεται ως το "κατώφλι" της μεταβολής του ρυθμού αύξησης της συγκέντρωσης του προϊόντος της αντίδρασης και αποτελεί την τιμή Ct (cycle threshold). Έτσι, για κάθε αντίδραση, ανάλογα με το ποσό DNA προς ενίσχυση, χρειάζεται ένας αριθμός κύκλων προκειμένου να παραχθεί αρκετό προϊόν DNA και το σήμα φθορισμού να υπερβεί το κατώφλι αυτό και αυτός ο αριθμός κύκλων συσχετίζεται με τον αριθμό μορίων που βρίσκεται στο δείγμα. Τα επίπεδα της τιμής Ct είναι αντιστρόφως ανάλογα με την ποσότητα του παραγόμενου DNA στο συγκεκριμένο δείγμα. Επομένως, η μικρή τιμή του Ct σημαίνει και μεγάλο αριθμό μορίων DNA και αντιστρόφως, μεγάλη τιμή Ct σημαίνει μικρό αριθμό αρχικών μορίων DNA στο δείγμα.

Η ποσοτικοποίηση στην ποσοτική PCR επιτυγχάνεται βάσει μια πρότυπης καμπύλης, η οποία δημιουργείται από δείγματα με γνωστή συγκέντρωση ή καλύτερα με γνωστό αριθμό αντιγράφων του γονιδίου που πρόκειται να ποσοτικοποιηθεί (standards). Στην περίπτωση που γίνεται ποσοτικοποίηση γονιδίων που εκφράζονται ενδογενώς στον άνθρωπο για τα οποία δε γνωρίζουμε την αρχική ποσότητα του προς ενίσχυση μορίου DNA πρέπει να γίνει κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων με τη χρήση ενός γονιδίου αναφοράς. Το κύριο χαρακτηριστικό των γονιδίων αναφοράς είναι τα αμετάβλητα επίπεδα των μορίων τους ανά κύτταρο σε όλες τις συνθήκες του πειράματος. Για να γίνει σύγκριση δειγμάτων χρησιμοποιώντας γονίδια αναφοράς, με αντίδραση είναι ακόμη στη φάση της εκθετικής αύξησης.

Οι φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται σήμερα στην ποσοτική PCR διακρίνονται σε ειδικές και μη ειδικές. Η φθορίζουσα χρωστική που χρησιμοποιήθηκε ήταν η SYBR Green, μία μη ειδική χρωστική που παρουσιάζει ελάχιστο ή μηδενικό φθορισμό όταν είναι ελεύθερη στο διάλυμα (A), η οποία προσδένεται ομοιόμορφα στα δίκλινα μόρια DNA, ένα μόριο ανά στροφή DNA, ώστε ο φθορισμός να είναι ανάλογος του μεγέθους του μορίου και της ποσότητας αυτού. Το SYBR Green μετά από διέγερση εκπέμπει φθορισμό στα 530 nm μόνο όταν είναι σε σύμπλοκο με δίκλινο DNA. Κατά την διάρκεια του πολυμερισμού των αλυσίδων σε κάθε κύκλο αυξάνεται ο αριθμός των δίκλωνων μορίων

DNA με αποτέλεσμα περισσότερα μόρια της χρωστικής να προσδένονται σε αυτά και έτσι να αυξάνεται η ένταση του φθορισμού.

Πρωτόκολλο Real Time PCR

Στη μελέτη μας χρησιμοποιήθηκε το KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) kit της εταιρείας KAPABIOSYSTEMS με τη βοήθεια του οποίου πραγματοποιήθηκε η Real Time PCR. Το πολυμερές της KAPA SYBR FAST DNA έχει κατασκευαστεί με σκοπό να εκτελεί βέλτιστα και σε αυστηρές συνθήκες qPCR αντίδρασης, παρουσιάζοντας σημαντικές βελτιώσεις στην αναλογία σήματος προς θόρυβο (φθορισμό), τον κύκλο ποσοτικοποίησης (Cq), τη γραμμικότητα και την ευαισθησία. Το πολυμερές KAPA SYBR FAST DNA και το ρυθμιστικό διάλυμα βελτιώνουν την απόδοση ενίσχυσης των δύσκολων περιοχών, συμπεριλαμβανομένων και των πλούσιων σε GC και AT προτύπων.

Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση ήταν οι ακόλουθες:

- 10μl KAPA SYBR® FAST Master mix (2X)
- 0,25μl miR ή U6 primer (forward)
- 0,25μl miR ή U6 primer (reverse)
- 7,5μl PCR grade water
- 2μl cDNA από τα δείγματα

Σκοπός του εν λόγω πειράματος είναι η μέτρηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων LRP1, DAB2IP, TSP2 και EZH2 καθώς και των miRNAs mir-335-5p, mir-363-3p, mir-545-3p. Το GAPDH και το U6snRNA ως γονίδιο αναφοράς για τα γονίδια και τα miRNAs αντίστοιχα.. Οι αλληλουχίες όλων των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4. Αλληλουχίες των εκκινητών των υπό μελέτη γονιδίων και miRNAs καθώς και των γονιδίων αναφοράς.

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
LRP1	5'-GAGCTGAACCACGCCTTTG-3'	5'-GGTAGACACTGCCACTCCGATAC-3'
DAB2IP	5'-CCTGGACGATGTGCTCTATG-3'	5'-TCTTCTTCTTCTTGTCCGGTCTC-3'
TSP2	5'-ACGAGTTTGGGTCTGTGGACTTCA-3'	5'-TAGAAGCGGCTGCTTGACTGGTAA-3'
EZH2	5'-AATCAGAGTACATGCGACTGAG-3'	5'- GCTGTATCCTTCGCTGTTTCC -3'
mir-335-5p	5'-GCGGTCAAGAGCAATAACGAA-3'	5'- GTGCAGGGTCCGAGGTATTC-3'
mir-363-3p	5'-ACACTCCAGCTGGGGAATTGCACGGTATCCA-3'	5'- TGGTGTCTGCGAGTTCG -3'
mir-545-3p	5'-TCAGTAAATGTTTATTAGATGA-3'	5'- GTGCAGGGTCCGAGGTATTC-3'
GAPDH	5'-CATCTCTGCCCTCTGCTG -3'	5'- GCCTGCTTCACCACCTTCTTG -3'
U6snRNA	5'-ATTGCAACGATACAGAGAAGATT-3'	5'- GGAACGCTTCACGAATTTG -3'

Western Blot

Προκειμένου να προσδιοριστεί η διαφορά έκφρασης των πρωτεϊνών LRP1, MMP2 και MMP9 χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική τεχνική του στυπώματος κατά Western σε δείγματα ασθενών αλλά και στα μη ανευρυσματικά δείγματα ελέγχου.

Απομόνωση πρωτεϊνών

Αρχικά, μικρή ποσότητα από τον αορτικό ιστό ιστού τοποθετήθηκε σε eppendorf στο καθένα από τα οποία προστέθηκαν 200μL διαλύματος λύσης που περιλαμβάνει: 4μL Tris HCl (pH= 8, C=1M), 30μL NaCl 1M, 2μL EDTA 0,5M, 20μL NP40 10%, 20μL Γλυκερόλη 100%, 2μL PMSF 100mM και 122μL dH₂O και επιπλέον 10μL σε κάθε δείγμα από μίγμα αναστολέων πρωτεασών.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μηχανική ομογενοποίηση του ιστού κατά την 3ωρη επώαση στον πάγο. Μετά το πέρας της επώασης, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 13.000rpm για χρόνο 30 λεπτών, ώστε να ληφθεί το υπερκείμενο π[ου περιέχει τις πρωτεΐνες.

Ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών επιπέδων πρωτεΐνης των δειγμάτων

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών επιπέδων πρωτεΐνης στα δείγματα έγινε με τη μέθοδο φασματοσκοπίας Bradford, η οποία βασίζεται στη δέσμευση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, κυρίως στα βασικά αμινοξέα των πρωτεϊνών, η οποία υφίσταται μια μετατόπιση στο μέγιστο της απορρόφησής της, από τα 465nm (καστανό) στα 595nm (κυανό χρώμα) -όπου και μετράται φωτομετρικά- όταν αλληλεπιδράσει με τις ελεύθερες αμινομάδες των πρωτεϊνών. Η ένταση του χρώματος και κατά συνέπεια της οπτικής πυκνότητας, είναι ευθέως ανάλογη του ποσού της πρωτεΐνης στο διάλυμα. Όσο περισσότερη πρωτεΐνη υπάρχει στο διάλυμα, τόσο περισσότερες θα είναι και οι διαθέσιμες αμινομάδες για να προσδεθεί η χρωστική και άρα τόσο πιο μεγάλη είναι η ένταση του χρώματος. Με τη μέθοδο Bradford μπορεί να μετρηθεί συγκέντρωση πρωτεϊνών από 1-100 μg.

Για την μέτρηση χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες που περιείχαν 20μl από τις εκχυλισμένες πρωτεΐνες (αραίωση 1:10) και 980μL από το αντιδραστήριο Bradford. Στο τυφλό διάλυμα χρησιμοποιήθηκαν 20μL dH₂O. Τα δείγματα φωτομετρήθηκαν (οπτική πυκνότητα) σε μήκος κύματος 595nm. Από τις τιμές της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων έχει προκατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Με βάση αυτή την καμπύλη υπολογίζεται η ποσότητα πρωτεΐνης (μg) που

περιέχεται σε κάθε δείγμα ώστε να χρησιμοποιηθεί ίση ποσότητα πρωτεΐνης. Στην παρούσα μελέτη, φορτώθηκε ποσότητα πρωτεΐνης 30μg.

Στύπωμα κατά western

Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμεύει στην ανίχνευση και ταυτοποίηση διαφόρων πρωτεϊνών του κυττάρου, χρησιμοποιώντας κυρίως το μέγεθος αλλά και το φορτίο τους. Μετά την απομόνωση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της μάζας των ολικών πρωτεϊνών και τον υπολογισμό του όγκου που θα φορτωθεί το κάθε δείγμα αραιώνεται σε ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης, το οποίο περιέχει:

50% γλυκερόλη,

0.05% χρωστική παρακολούθησης (μπλε βρωμοφαινόλης)

10% SDS

250 mM Tris·HCl, pH 6.8,

Ακολουθεί θέρμανση των πρωτεϊνικών δειγμάτων στους 95°C για 10 λεπτά, προκειμένου να μετουσιωθεί η δομή υψηλότερης τάξης- αποδιάταξη, διατηρώντας ταυτόχρονα τις σουλφιδικές γέφυρες. Η μετουσίωση της υψηλής δομής εξασφαλίζει ότι το αρνητικό φορτίο των αμινοξέων δεν εξουδετερώνεται, επιτρέποντας στην πρωτεΐνη να κινηθεί σε ένα ηλεκτρικό πεδίο.

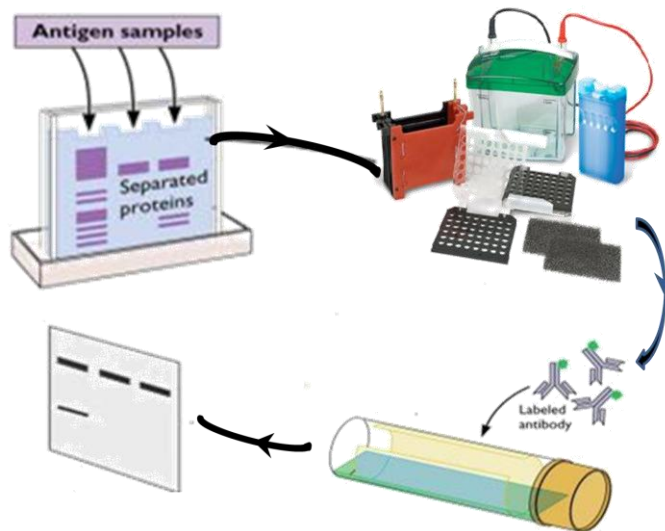
Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικοί τύποι gel πολυακρυλαμίδης: το ανώτερο που είναι το gel στοιβάξης και το κατώτερο που είναι διαχωρισμού. Το υψηλότερο είναι ελαφρώς όξινο (pH 6.8) και έχει χαμηλότερη συγκέντρωση ακρυλαμιδίου καθιστώντας το ένα πορώδες τζελ, το οποίο διαχωρίζει ελάχιστα την πρωτεΐνη, αλλά επιτρέπει να σχηματιστούν λεπτές, έντονα καθορισμένες ζώνες. Το χαμηλότερο τζελ, το διαχωριστικό, είναι βασικό (pH 8.8) και έχει υψηλότερη περιεκτικότητα πολυακρυλαμιδίου, καθιστώντας τους πόρους του στενότερους. Στην εργασία μας χρησιμοποιήθηκαν τα έτοιμα gel Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels (Biorad)

Το διάλυμα τρεξίματος παρασκευάζεται από το πυκνό (10X) το οποίο περιέχει:

- 144g Γλυκερίνης
- 30g Trizma Base
- ποσότητα H₂O μέχρι τη συμπλήρωση 1L

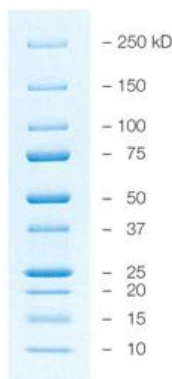
Στη συνέχεια αραιώνεται το πυκνό διάλυμα προσθέτοντας σε 50mL 10X διαλύματος τρεξίματος 450mL H₂O και 5mL SDS. Το SDS, που είναι ανιονικό απορρυπαντικό (σε αναλογία 1,4 g SDS ανά g πρωτεΐνης) αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες, δεσμεύεται σε αυτές

και τις φορτίζει αρνητικά. Οπότε, η πρωτεΐνη μπορεί να ηλεκτροφορηθεί και να διαχωριστεί με βάση το μέγεθός της καθώς έχει ομοιόμορφο αρνητικό φορτίο ανά μονάδα μάζας.



Εικόνα 9. Διαδικασία στυπώματος κατά Western.

Τα δείγματα τοποθετούνται στο gel για την ηλεκτροφόρηση και η συσκευή της ηλεκτροφόρησης πληρώνεται με το διάλυμα τρεξίματος και ξεκινάει η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης. Έτσι, η πρωτεΐνη διαχωρίζεται βάσει μεγέθους κυρίως, καθώς οι μικρότερες πρωτεΐνες ταξιδεύουν ευκολότερα και επομένως ταχύτερα από τις μεγαλύτερες πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες έχουν αρνητικό φορτίο επειδή έχουν μετουσιωθεί με θέρμανση και θα κινηθούν προς το θετικό ηλεκτρόδιο όταν εφαρμοστεί τάση. Η τάση $-120V$ είναι πολύ σημαντική, καθώς η υψηλή τάση μπορεί να υπερθερμανθεί και να παραμορφώσει τις ζώνες. Μαζί με τα προς ανάλυση δείγματα τοποθετείται συνήθως στη αρχή ένα δείγμα μάρτυρας της ηλεκτροφόρησης που είναι ειδικά κατασκευασμένος ώστε να δίνει ζώνες γνωστού μοριακού βάρους. (εικ. 10) Οι ζώνες αυτές συνήθως επιλέγονται ώστε να βρίσκονται σε παρόμοιο μέγεθος με τις πρωτεΐνες που πρόκειται να μελετηθούν.



Εικόνα 10. Μάρτυρας ζωνών γνωστού μοριακού βάρους. (Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standards #1610373-Biorad)

Για να μπορούν οι πρωτεΐνες να ανιχνευθούν από τα αντισώματα, πρέπει να μετακινηθούν από gel σε μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (nitrocellulose) ή διφθοριούχου πολυβινυλιδενίου (PVDF). Η νιτροκυτταρίνη χρησιμοποιείται για την υψηλή συγγένειά της με τις πρωτεΐνες και τις ικανότητες συγκράτησης. Ωστόσο, είναι εύθραυστη και δεν επιτρέπει τη χρήση της μεμβράνης για έλεγχο. Αντιθέτως, οι μεμβράνες PVDF, τις οποίες και χρησιμοποιήσαμε παρέχουν καλύτερη μηχανική στήριξη και επιτρέπουν την αποθήκευση του στυπώματος.

Η μεταφορά γίνεται με τη χρήση ενός ηλεκτρικού πεδίου προσανατολισμένου κάθετα προς την επιφάνεια του gel, προκαλώντας την απομάκρυνση των πρωτεϊνών από το gel και πάνω στη μεμβράνη.

Το διάλυμα μεταφοράς περιέχει:

- 100mL διάλυμα τρεξίματος χωρίς SDS
- 200mL μεθανόλης
- 700mL dH₂O.

Η μεμβράνη PVDF ενεργοποιείται τοποθετούμενη διαδοχικά για 10sec σε μεθανόλη, για 2min σε dH₂O και για 15min στο διάλυμα μεταφοράς.

Η μεμβράνη τοποθετείται μεταξύ της επιφάνειας του gel και του θετικού ηλεκτροδίου σε ένα σάντουιτς. Το σάντουιτς περιλαμβάνει ένα στρώμα ινών (σφουγγάρι) σε κάθε άκρο και χαρτιά φίλτρου Whatman για την προστασία του gel και της μεμβράνης στύπωσης. Η μεμβράνη πρέπει να τοποθετηθεί έτσι ώστε οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες να μπορούν να μεταναστεύσουν από το gel στη μεμβράνη. Αυτός ο τύπος μεταφοράς ονομάζεται ηλεκτροφορητική μεταφορά και πραγματοποιείται εφαρμόζοντας πεδίο 100V για 1h.

Συνεχίζοντας, η μεμβράνη επωάζεται σε διάλυμα 5% BSA (Bovine Serum albumin) ή μη αποβουτυρωμένο γάλα που έχει αραιωθεί σε TBS-Tween (20 mM Tris/pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% Tween20) για 1h για να παρεμποδιστεί η μη ειδική σύνδεση των αντισωμάτων. Έτσι, όταν το αντίσωμα προστίθεται, όλα τα σημεία στην μεμβράνη είναι κατειλημμένα από πρωτεΐνες και τα αντισώματα δεσμεύονται μόνο στις συγκεκριμένες πρωτεΐνες στόχους. Αυτό μειώνει το "θόρυβο" στο τελικό προϊόν του στυπώματος Western, που οδηγεί σε πιο σαφή αποτελέσματα, και εξαλείφει ψεύτικα θετικά αποτελέσματα.

Η συγκέντρωση του αντισώματος εξαρτάται από τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το αντίσωμα μπορεί να αραιωθεί στο ρυθμιστικό διάλυμα TBS-Tween. Μετά από πλύσεις με TBS-Tween τοποθετούνται τα πρωτογενή αντισώματα με τα οποία επωάζεται η μεμβράνη ολονύκτια στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση σφραγισμένα σε ζελατίνη. Τα πρωτογενή

αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώση 1:1000 ήταν τα LRP1 (CD91 rabbit anti-human, B8225-1, Assay Biotech), MMP9 (rabbit anti-human H-129, sc-10737, Santa Cruz) και MMP2 (mouse anti-human, Acris antibodies, AM00257AF-N).

Την επόμενη μέρα γίνονται ακόμα τρεις εκπλύσεις με διάρκεια 10min με PBS-Tween. Το πλύσιμο είναι πολύ σημαντικό καθώς ελαχιστοποιεί το φόντο και αφαιρεί το μη δεσμευμένο αντίσωμα. Ακολούθως, η μεμβράνη εκτίθεται σε ένα άλλο δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση- HRP σε αραιώση 1:1000 (anti-rabbit GenScript A00098 ή anti-mouse GenScript A00160).

Το σήμα αναπτύχθηκε με το σύστημα ανίχνευσης ενισχυμένης χημειοφωταύγειας ECL West Pico (Pierce). Το παράγων σήμα καταγράφεται σε φωτογραφικό φιλμ που αναπτύσσεται με τα διαλύματα εμφάνισης και μονιμοποίησης σε σκοτεινό δωμάτιο. Η ανθρώπινη πρωτεΐνη GAPDH (Acris antibodies, ACR001PT) χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός έλεγχος για να εξασφαλιστεί η ίση φόρτωση δειγμάτων. Τα φιλμ σαρώθηκαν (GS-800, BioRad scanner) και αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το ImageJ.

Κυτταρικές καλλιέργειες – Διαμόλυνση με mimic

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν εμβρυονικοί ινοβλάστες ποντικού (MEF cells), κύτταρα τα οποία υπερεκφράζουν το προς μελέτη γονίδιο LRP1 και προσκολλώνται στην επιφάνεια της φλάσκας έχοντας ατρακτοειδές σχήμα. Τα κύτταρα MEF καλλιεργήθηκαν σε DMEM καλλιεργητικό μέσο με 10% FBS και 1% pen/strep στους 37°C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ σε τελικό όγκο 6ml για φλάσκα 25 cm² και σε τελικό όγκο 12ml για φλάσκα 75 cm². Τα κύτταρα αυτά προσκολλώνται στην επιφάνεια της φλάσκας και η αποκόλλησή τους γίνεται ενζυμικά με 1x τρυψίνη έως ότου τα κύτταρα αποκολληθούν πλήρως από την επιφάνεια της φλάσκας. Η διαδικασία της ανακαλλιέργειας των κυττάρων επαναλαμβάνεται κάθε 3-4 ημέρες και περιλαμβάνει το διαχωρισμό σημαντικής ποσότητας κυττάρων, ώστε να μειωθεί η συγκέντρωσή τους και πλήρωση της φλάσκας ωσότου υπάρχει επαρκής αριθμός κυττάρων για το πείραμα της διαμόλυνσης. Η διατήρηση των κυττάρων για μεγάλο χρονικό διάστημα γίνεται με αποθήκευσή τους στους -80°C, ενώ βρίσκονται σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Ως κρυοπροστατευτική ουσία χρησιμοποιείται το DMSO και η διαδικασία προσαρμόζεται ανάλογα με τις ποσότητες κυττάρων που προορίζονται για φύλαξη. Για να ληφθούν τελικά τα κρυοφιαλίδια με 1mL κύτταρα το καθένα, χρησιμοποιούνται φλάσκες οι οποίες βρίσκονται σε επίπεδα πληρότητας της τάξης του 80-90%. Το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και οι φλάσκες ξεπλένονται με PBS 1X. Κατόπιν, τα κύτταρα συλλέγονται σε αποστειρωμένο σωληνάριο

χωρητικότητας 15mL, φυγοκεντρώνται στις 3000 rpm για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο, που περιέχει τοξικές μεταβολικές ενώσεις και νεκρά κύτταρα, αποχύνεται και στη θέση του προστίθεται 1mL μέσου ψύξης 95%(v/v) ορός (FBS)/ 5%(v/v) DMSO. Με τη βοήθεια πιπέτας, το ίζημα επαναιωρείται και το περιεχόμενο μεταφέρεται σε κρυσταλλοειδή. Ακολουθεί φύλαξη σε σταδιακά μειούμενη θερμοκρασία (περίπου 1°C ανά ώρα) μέχρι η θερμοκρασία να φτάσει σε ένα κρίσιμο σημείο (-20°C), προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός πάγου στο εσωτερικό τους, να ελαχιστοποιηθεί η απώλεια νερού και να υπάρξει ο απαραίτητος χρόνος προσαρμογής. Κατόπιν, τα κύτταρα μεταφέρονται στους -80°C.



Εικόνα 11. Φλάσκες και τρυβλία κυτταροκαλλιέργειών

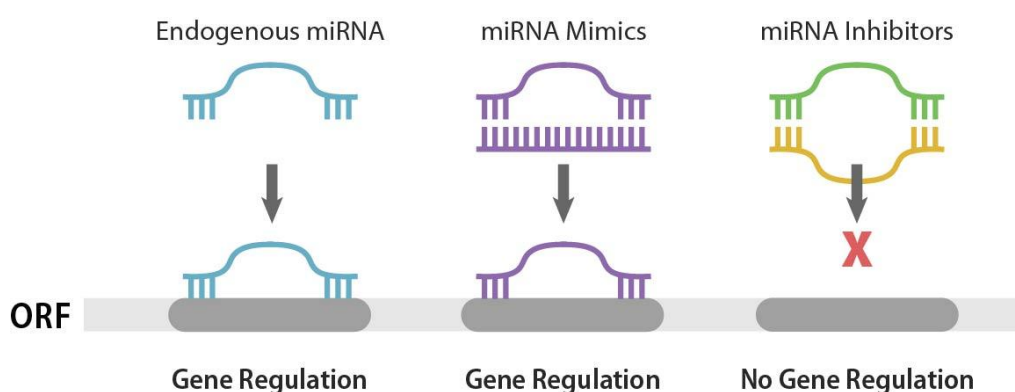
Όταν υπήρχε περίσσεια κυτάρων ακολούθησε το πείραμα της διαμόλυνσης με mimics για τα miR-335-5p και miR-545-3p για να δούμε την επίδραση του στην έκφραση του LRP1. Η τεχνολογία miRNA mimics χρησιμοποιεί συνθετικά, μη φυσικά νουκλεϊκά οξέα που μπορούν να προσδεθούν στη μοναδική αλληλουχία των γονιδίων στόχων (mRNAs) με ειδικό τρόπο και να προκαλέσουν μετα-μεταγραφικά κατασταλτικά αποτελέσματα παρόμοια με τα ενδογενή miRNA. Δηλαδή, το miRNA-mimic μπορεί να δράσει μόνο στο συγκεκριμένο γονίδιο-στόχο του, αλλά ένα φυσικό miRNA μπορεί να δράσει σε οποιοδήποτε γονίδιο φέρει την αλληλουχία δέσμευσης. Έτσι η τεχνολογία miRNA-mimic παράγει τεχνητά miRNAs που δρουν με μηχανισμό όμοιο των miRNA, χωρίς να προκαλεί αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης οποιοδήποτε ενδογενούς miRNA. (Εικ. 12) Βασιζόμενοι στην περιοχή πρόσδεσης των miRNAs miRNA mimics που χρησιμοποιήθηκαν είχαν την εξής αλληλουχία:

miR-335-5p: UCAAGAGCAAUAACGAAAAAUGU

miR-545-3p: UCAGCAAACAUUUAUUGUGUGC

Την πρώτη μέρα τα κύτταρα MEF διαμοιράστηκαν σε 12-πηγαδιών πιάτο καλλιέργειας (εικ.11) με 1ml θρεπτικού μέσου ανά πηγάδι. Όταν τα πηγάδια έφτασαν σε

πληρότητα 50% πραγματοποιήθηκε η διαμόλυνση με το kit jetPRIME in vitro DNA & siRNA transfection reagent (Polyplus transfection S.A.). 11pmoles mimic του κάθε miRNA αραιώθηκε σε 100μl jetPRIME Buffer για να έχουμε τελική συγκέντρωση 10nM, στο οποίο προστέθηκε 3μl jetPRIME reagent. Το μείγμα της διαμόλυνσης μεταφέρθηκε σε κάθε πηγαδάκι και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες, ακολούθησε αλλαγή θρεπτικού μέσου και επώαση για άλλες 24 ώρες. Μετά από 48 ώρες από τη διαμόλυνση συλλέχθηκαν τα κύτταρα, απομονώθηκε RNA με τη μέθοδο του Trizol, και ακολούθησε κατασκευή cDNA και real time PCR, όπως περιγράφηκε παραπάνω, για να μετρηθεί η έκφραση τόσο των miRNAs όσο και του LRP1.



Εικόνα 12. Λειτουργία των miRNA mimic. Η τεχνολογία miRNA mimic χρησιμοποιεί συνθετικά, νουκλεϊκά οξέα που μπορούν να προσδεθούν στη μοναδική αλληλουχία των γονιδίων στόχων (mRNAs) με ειδικό τρόπο και να προκαλέσουν μετα-μεταγραφικά κατασταλτικά αποτελέσματα παρόμοια με τα ενδογενή miRNA. (<https://www.coderegenesis.com/>)

Στατιστική ανάλυση

Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό GraphPad Prism (έκδοση 6.0). Τα αποτελέσματα με τιμές πιθανότητας μικρότερες από 0,05 ($p < .05$) ταξινομήθηκαν ως στατιστικά σημαντικά. Χρησιμοποιήθηκε t-test ανεξαρτησίας δειγμάτων για τη διερεύνηση της στατιστικής διαφοράς στις σχετικές εκφράσεις των πρωτεϊνών LRP1 και των MMPs, των mRNAs LRP1, DAB2IP, EZH2 και TSP2 και των miRNAs μεταξύ των AKA και της ομάδας ελέγχου. Ο συντελεστής συσχέτισης Pearson υπολογίστηκε για να εκτιμηθεί η συσχέτιση μεταξύ της σχετικής έκφρασης των γονιδίων LRP1 και DAB2IP και της σχετικής έκφρασης των miRNAs. Η δοκιμή χ^2 χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών στα περιστατικά και τους μάρτυρες.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

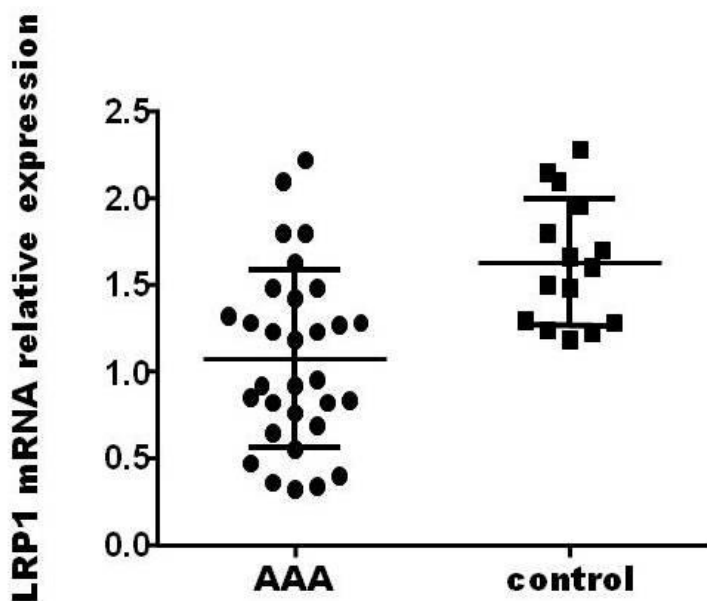
Στη μελέτη μας εξετάστηκαν συνολικά δείγματα από 31 ασθενείς με ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής. Γειτονικές μη ανευρυσματικές περιοχές των 15 δειγμάτων, που ήταν διαθέσιμες, χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Στον παρακάτω πίνακα (Πιν.4) φαίνεται ποσοστιαία τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των υπό μελέτη ασθενών.

Πίνακας 5. *Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη μας.*

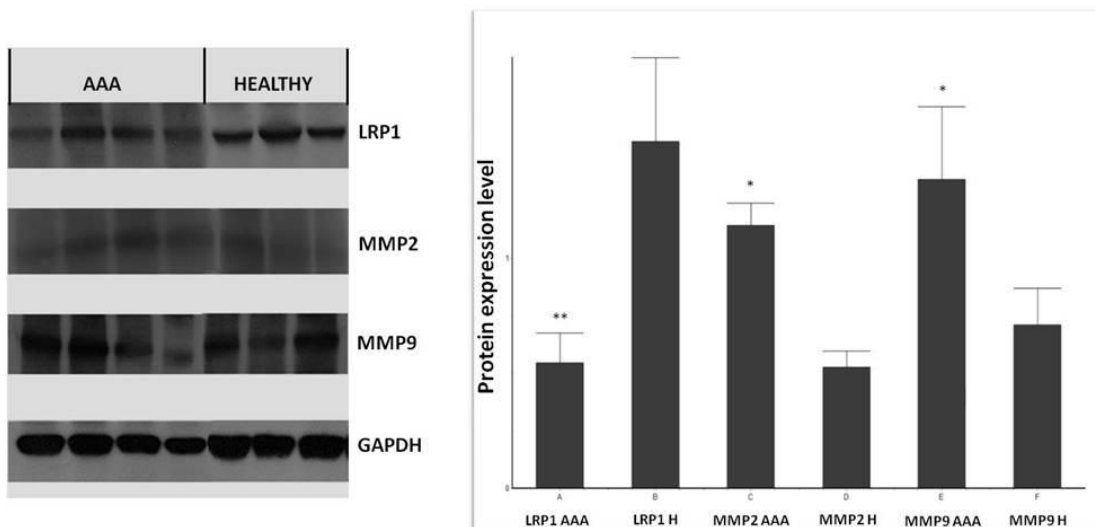
Παράμετρος	Τιμή (n=31)
Φύλο (Θ/Α)	2/29
Ηλικία (έτη \pm SD)	71.8 \pm 8.23
Κάπνισμα (%)	28 (90.3%)
Διαβήτης (%)	6 (19.4%)
Υπέρταση (%)	28 (90%)
Υπερχοληστερολαιμία (%)	10 (32.3%)
Τριγλυκερίδια (%)	8 (25.8%)
Στεφανιαία νόσος (%)	7 (22.6%)
Χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (%)	12 (38.7%)
Χρόνια νεφρική νόσος (%)	6 (19.4%)
Χρήση στατινών (%)	11 (35.5%)
Αντιαιμοπεταλικά φάρμακα (%)	13 (41.9%)

Ανάλυση της έκφρασης του LRP1 σε επίπεδο mRNA και πρωτεϊνών - Κατώτερη έκφραση τόσο του mRNA όσο και της πρωτεΐνης.

Εξετάστηκαν 31 δείγματα από ασθενείς με ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής και ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν 15 δείγματα από μη ανευρυσματικές παρακείμενες περιοχές. Αρχικά αναλύθηκαν τα επίπεδα του LRP1 σε επίπεδο mRNA μεταξύ ιστών ΑΚΑ και μαρτύρων. Η σχετική έκφραση LRP1 στα ΑΚΑ δείγματα ($n = 31, 1.076 \pm 0.091$) βρέθηκε ~1,5 φορές σημαντικά ($p < 0.005$) μειωμένη σε σύγκριση με τους μάρτυρες ($n = 15, 1.629 \pm 0.094$). (Εικ. 13) Η διαφορική έκφραση του LRP1 επιβεβαιώθηκε περαιτέρω με ανάλυση στυπώματος Western. Οι μετρήσεις οπτικής πυκνότητας των ζωνών αποκάλυψαν ότι υπήρξε περίπου 2,76 φορές μείωση της ποσότητας LRP1 στα δείγματα ΑΚΑ σε σύγκριση με τα μη παθολογικά. Η σχετική έκφραση της πρωτεΐνης LRP1 ήταν σημαντικά ($P < 0.01$) χαμηλότερη στους ΑΚΑ (0.55 ± 0.13) σε σύγκριση με τους υγιείς ιστούς (1.51 ± 0.36). (Εικ. 14)



Εικόνα 13. Ανάλυση της σχετικής έκφρασης του LRP1 σε επίπεδο mRNA στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής (ΑΚΑ) και στους αορτικών ιστούς ελέγχου με qrt-real time PCR. Η στατιστική ανάλυση έδειξε σημαντικά χαμηλότερο επίπεδο έκφρασης mRNA μεταξύ αορτικών ιστών ΑΚΑ ($n = 31, 1.076 \pm 0.091$) και ελέγχου ($n = 15, 1.629 \pm 0.094$), με ($P < 0.05$).



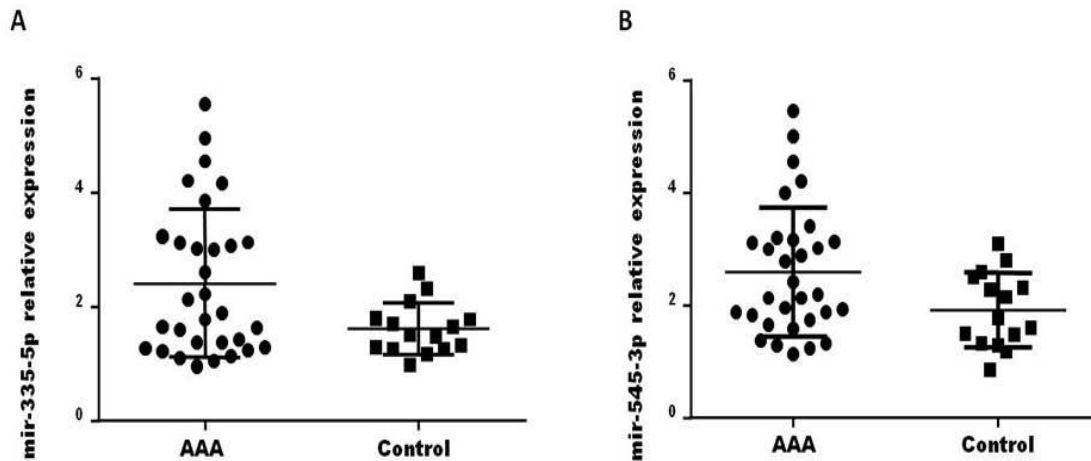
Εικόνα 14. Ανάλυση Western Blot για την έκφραση των LRP1, MMP2 και MMP9 σε επίπεδο πρωτεΐνης. Στο αριστερό μέρος, αντιπροσωπευτικό σχήμα της Western blot ανάλυσης των πρωτεϊνών LRP1, MMP2 και MMP9. Δεξιά, η ανάλυση των επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών τους σε ιστούς ΑΚΑ σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Το επίπεδο της πρωτεΐνης LRP1 έδειξε σημαντική μείωση, ενώ και οι δύο MMPs αυξημένη έκφραση στους ιστούς ΑΚΑ.

Γονοτύπηση - Δεν υπάρχουν αλληλόμορφα κινδύνου στα δείγματα μας

Έγινε ανάλυση της γονιδιακής αλληλουχίας των δειγμάτων ΑΚΑ και των υγιών μαρτύρων για τον πολυμορφισμό rs1466535. Τα περισσότερα άτομα της μελέτης εμφάνισαν τον ετερόζυγο C/T γονότυπο ενώ μόνο τέσσερις ασθενείς και δύο μάρτυρες ήταν ομόζυγοι για το αλληλίο C. Δεν πραγματοποιήθηκε περαιτέρω στατιστική ανάλυση, καθώς δεν υπήρχε συσχέτιση μεταξύ του SNP και του πληθυσμού μας.

Ανάλυση της έκφρασης των microRNAs - υπερέκφραση των δύο πιθανών ρυθμιστών

Στη συνέχεια, μελετήσαμε τα επίπεδα έκφρασης των 2 υποψήφιων miRNA στα δείγματα ΑΚΑ και τους αρτητικούς ιστούς ελέγχου. Τόσο το miR-335-5p ($n = 31$, 2.415 ± 0.23) όσο και το miR-545-3p ($n = 31$, 2.601 ± 0.17) ήταν σημαντικά ($P < 0.05$) υπερεκφρασμένα (miR-335-5p: 1.615 ± 0.12 , miR-545-3p: 1.918 ± 0.17). (Εικ. 15) Πιο αναλυτικά, εκτιμήσαμε μια αύξηση 1.49 φορές του miR-335-5p και περίπου 1.36 φορές του miR-545-3p.



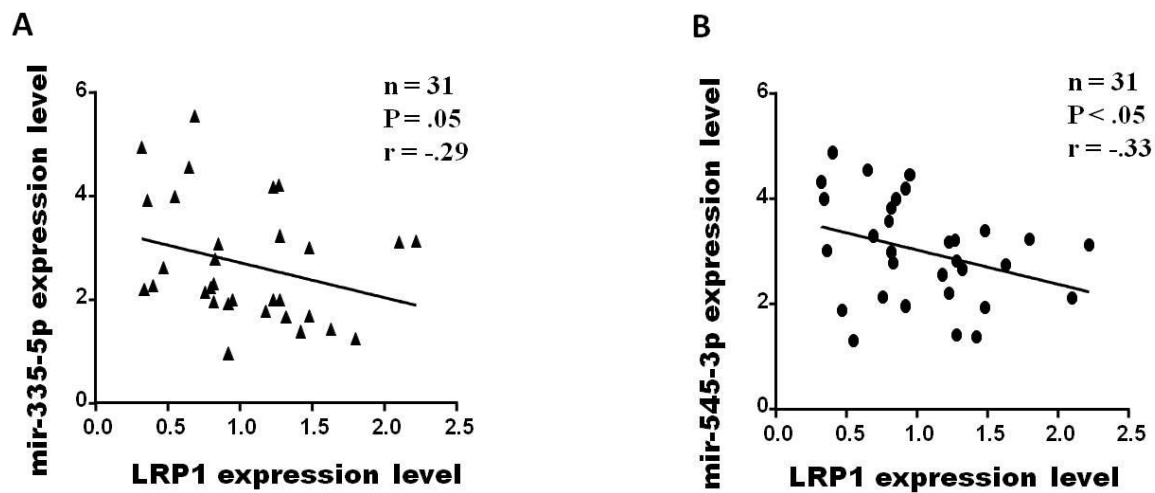
Εικόνα 15. Ανάλυση της σχετικής έκφρασης των δύο microRNAs (miRNAs) σε ιστούς ανθρώπινης κοιλιακής αρτηρίας (AKA n=31) και αρτικών ιστών ελέγχου (n=15) με ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο. Τόσο το A. miR-335-5p (2.415 ± 0.23) όσο και το B. miR-545-3p (2.601 ± 0.17) έδειξαν σημαντική αύξηση ($P < 0.05$) στους ιστούς AKA σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (A: 1.615 ± 0.12 · B : 1.918 ± 0.17 αντίστοιχα)

Λειτουργική μελέτη σε κύτταρα – το miR-335-5p ρυθμιστής της έκφρασης του LRP1.

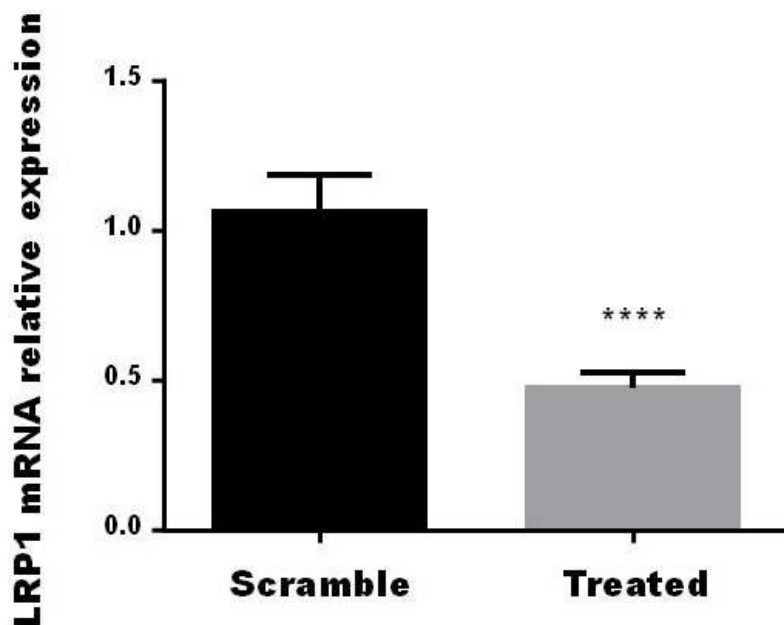
Η μειωμένη σχετική έκφραση του LRP1 και η υψηλότερη έκφραση αμφοτέρων των miR-545-3p και miR-335-5p, μας οδήγησαν να εξετάσουμε τη συσχέτιση μεταξύ έκφρασης LRP1 και κάθε miRNA μέσω του συντελεστή συσχέτισης Pearson. (Εικ. 16) Αυτή η ανάλυση έδειξε μικρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης LRP1 και των miR-545-3p ($r = -0.33$, $P < 0.05$) και miR-335-5p. ($r = -0.29$, $P = 0.05$)

Οι βάσεις δεδομένων των miRNAs υποδεικνύουν ότι το miR-335-5p ενδεχομένως στοχεύει στο γονίδιο LRP1, χωρίς αυτό να έχει πειραματικά αποδειχθεί, ενώ για το miR-545-3p υπάρχουν ισχυρότερες πειραματικές ενδείξεις. Για να επιβεβαιώσουμε ότι αυτά τα miRNAs στοχεύουν το γονίδιο μελέτης, πραγματοποιήσαμε λειτουργική μελέτη, στην οποία εξετάσαμε αν η υπερέκφραση των miRNAs σε κύτταρα MEF (mouse embryonic fibroblasts - εμβρυονικοί ινοβλάστες ποντικού) έχει επίδραση στην έκφραση LRP1. Μετά τη μεταμόσχευση κυττάρων με μιμητικό miRNA για το miR-335-5p, ερευνήσαμε τη σχετική έκφραση του LRP1 σε επίπεδο mRNA. Παρατηρήθηκε εξαιρετικά σημαντική διαφορά ($P < 0.0001$) στην σχετική έκφραση του LRP1 μεταξύ των κυττάρων που υπερέκφραζαν miR-335-5p (0.47 ± 0.02) και ελέγχου (1.06 ± 0.05). (Εικ.17) Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι η υπερέκφραση του miR-335-5p προκαλεί μεταβολή της έκφρασης του LRP1. Όσον αφορά το miR-545-3p, πραγματοποιήθηκε μια παρόμοια λειτουργική ανάλυση. Παρόλο που πολλές βάσεις δεδομένων παρουσιάζουν ότι αυτό το μόριο στοχεύει το

LRP1 με πειραματικές ενδείξεις, η λειτουργική ανάλυση μας δεν αποκάλυψε καμία άμεση λειτουργία του mir-545-3p στο LRP1.



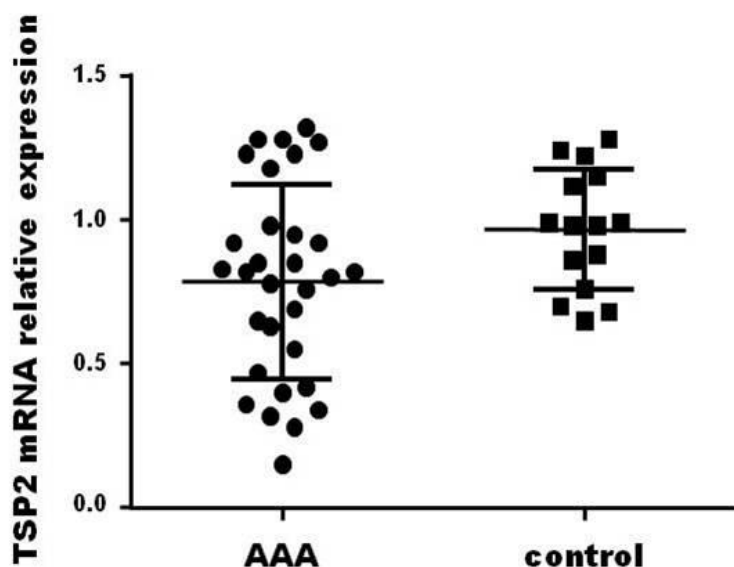
Εικόνα 16. Ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ έκφρασης LRP1 και έκφρασης των miRNAs, mir-335-5p και mir-545-3p, μέσω του συντελεστή συσχέτισης Pearson. Περιορισμένη αρνητική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ των επιπέδων έκφρασης mir-335-5p ($r = -0.29$, $P = 0.05$) και mir-545-3p ($r = -0.33$, $P < 0.05$)



Εικόνα 17. Ανάλυση της σχετικής έκφρασης του LRP1 σε επίπεδο mRNA στα διαμολυσμένα κύτταρα με το μιμητικό του mir-335-5p με real time PCR. Εξαιρετικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ των κυττάρων που υπερεκφράζουν το mir-335-5p (0.47 ± 0.02) και του ελέγχου (1.06 ± 0.05) (**** $P < 0.0001$)

Ανάλυση έκφρασης των μορίων-κλειδιών: TSP2, MMP2 και MMP9. - Αυξημένα επίπεδα των MMP2 και MMP9.

Εξετάσαμε επίσης σε επίπεδο mRNA την έκφραση του TSP2 προκειμένου να διασαφηνιστεί η οδός μέσω της οποίας το LRP1 θα μπορούσε να οδηγήσει σε σχηματισμό ανευρύσματος. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην σχετική έκφραση του TSP2 μεταξύ ιστών ΑΚΑ (0.785 ± 0.06) και υγιών μαρτύρων (0.965 ± 0.05) (Εικ. 18) Τα επίπεδα των πρωτεϊνών MMP2 και MMP9 μετρήθηκαν επίσης σε εφόσον έχουν εμπλακεί στην ανάπτυξη ΑΚΑ και τη ρύθμιση του LRP1. Η σχετική έκφραση της πρωτεΐνης MMP2 βρέθηκε σημαντικά υψηλότερη ($P < 0.05$), με περίπου 2.15 φορές αλλαγή στους ιστούς ΑΚΑ (1.14 ± 0.09) σε σύγκριση με τους υγιείς ιστούς (0.53 ± 0.07). Η πρωτεΐνη MMP9 ήταν επίσης υπερ-εκφρασμένη, με 1.89 φορές αύξηση στους ΑΚΑ (1.345 ± 0.3) σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (0.71 ± 0.16) (Εικ. 14)

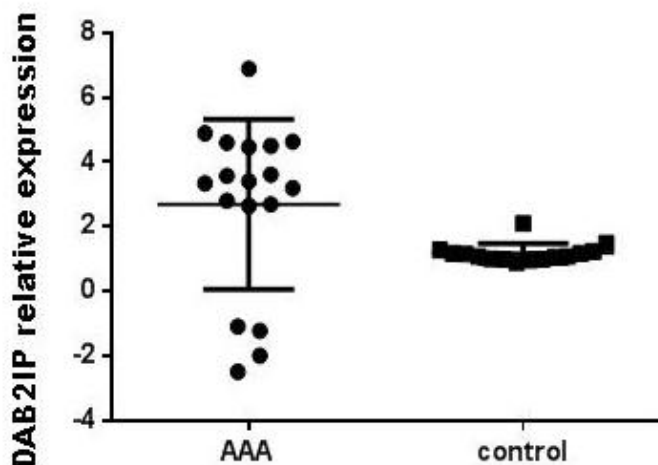


Εικόνα 18. Ανάλυση της σχετικής έκφρασης TSP2 σε mRNA επίπεδο στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής (ΑΚΑ) και στους αορτικούς ιστούς ελέγχου με qrt-real time PCR. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά ($P = 0.065$) μεταξύ των δειγμάτων ΑΚΑ (0.785 ± 0.06) και των αορτικών ιστών ελέγχου (0.965 ± 0.05).

Ανάλυση της έκφρασης του DAB2IP σε επίπεδο mRNA

Η έκφραση του γονιδίου DAB2IP μελετήθηκε σε 18 ανευρυσματικά δείγματα ($n = 18$) και 15 μάρτυρες ($n = 15$). Όσον αφορά τη σχετική έκφραση του DAB2IP στα δείγματα ΑΚΑ

(2.692 ± 0.62) παρατηρήθηκε μία αύξηση κατά 2.29 φορές ($p < 0.05$) σε σύγκριση με τους μάρτυρες, 1.175 ± 0.077) (Εικ. 19)

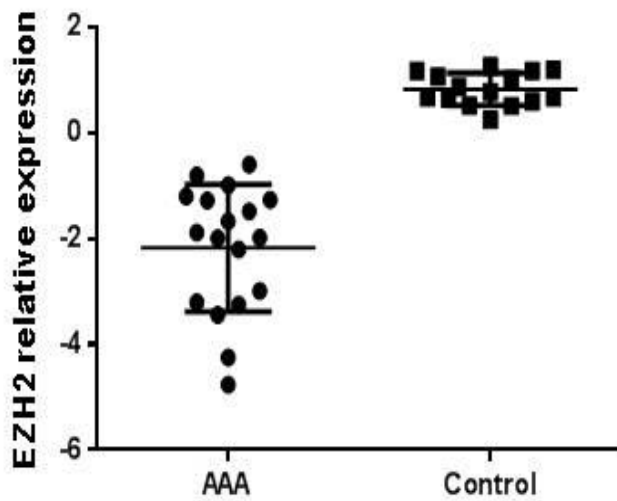


Εικόνα 19. Ανάλυση της έκφρασης του DAB2IP σε επίπεδο mRNA στους ιστούς AKA και τους μη ανευρωματικούς αορτικούς ιστούς ελέγχου με ποσοτική πραγματικού χρόνου PCR. Η στατιστική ανάλυση έδειξε αυξημένο επίπεδο έκφρασης στα δείγματα AKA ($n = 18$, 2.692 ± 0.62) σε σύγκριση με τους μάρτυρες ($n=15$, 1.175 ± 0.077), με $p < 0.05$.

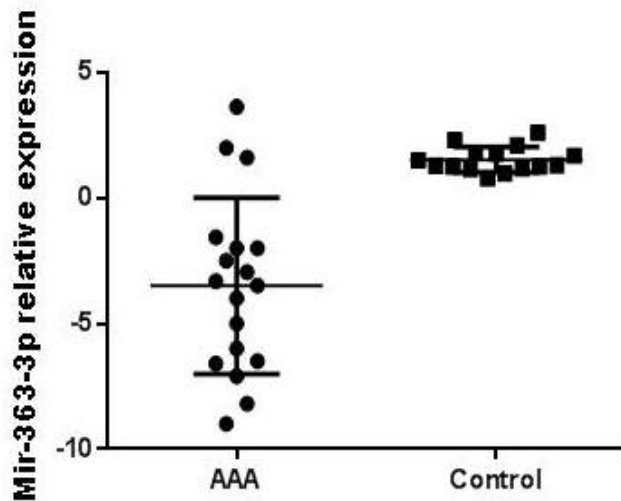
Ανάλυση της έκφρασης των πιθανών ρυθμιστών του DAB2IP: EZH2 και miR-363-3p.

Προκειμένου να ερευνήσουμε τους πιθανούς μεσολαβητές της έκφρασης του DAB2IP συνεχίσαμε με την ανάλυση της έκφρασης του *EZH2*. Τα αποτελέσματά μας παρουσίασαν μια ιδιαίτερα σημαντική ($p < 0.0001$), περίπου 3.62 φορές, μείωση της σχετικής έκφρασης του *EZH2* στα δείγματα AKA (-2.178 ± 0.284) σε σύγκριση με τους μάρτυρες (0.8307 ± 0.079). (Εικ. 20)

Το miR-363-3p είναι ένας άλλος πιθανός ρυθμιστής του μελετώμενου γονιδίου, καθώς από τις βάσεις δεδομένων φαίνεται να στοχεύει σε αυτό. Μετρήσαμε τη σχετική έκφραση του miR-363-3p στα δείγματα AKA (-3.494 ± 0.828) και τους μάρτυρες (1.536 ± 0.1313) και βρήκαμε μια εξαιρετικά σημαντική μείωση, περίπου 3.28 φορές ($p < 0.0001$). (Εικ.22)



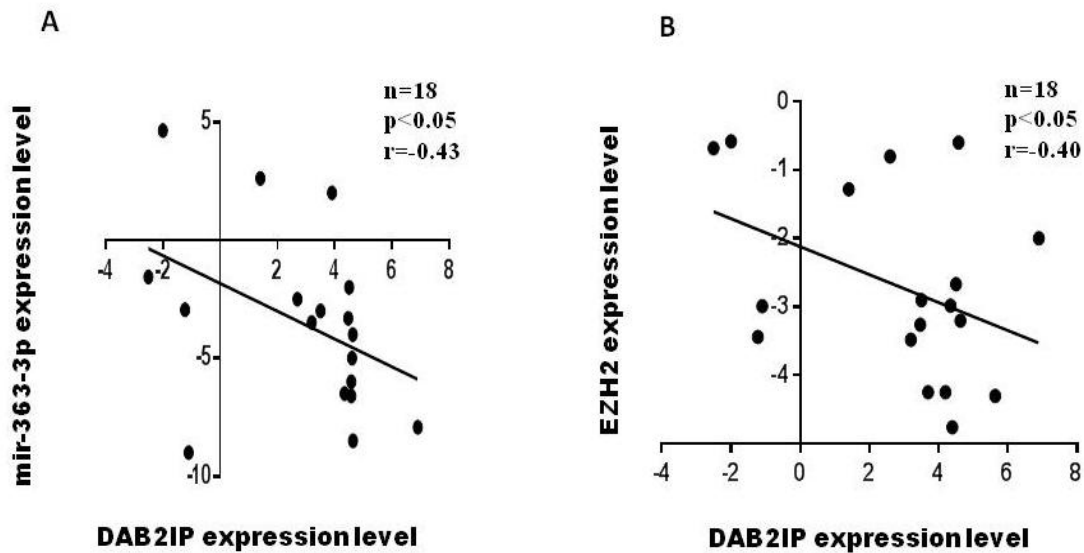
Εικόνα 20. Ανάλυση της έκφρασης του EZH2 σε επίπεδο mRNA στα δείγματα ΑΚΑ και στα δείγματα μαρτύρων με ποσοτική πραγματικού χρόνου PCR. Χαμηλότερο επίπεδο έκφρασης παρατηρήθηκε στα ΑΚΑ δείγματα (n=18, -2.178 ± 0.284) από τους μη ανευρωματικούς μάρτυρες (n= 15, 0.8307 ± 0.079), με $p < 0.0005$.



Εικόνα 21. Ανάλυση της σχετικής έκφρασης του mir-363-3p σε ιστούς ΑΚΑ (n= 18) και αορτικούς μη ανευρωματικούς ιστούς ελέγχου (n=15) με ποσοτική πραγματικού χρόνου PCR. Το mir-363-3p βρέθηκε σημαντικά ($p < 0.0005$) μειωμένο σε ιστούς ΑΚΑ (-3.494 ± 0.828) σε σύγκριση με τους μη ανευρωματικούς μάρτυρες (1.536 ± 0.1313).

Η στατιστικώς σημαντική αυξημένη έκφραση του DAB2IP και η μειωμένη έκφραση των EZH2 και mir-363-3p μας οδήγησαν να εξετάσουμε τη συσχέτιση μεταξύ έκφρασης

DAB2IP και κάθε μορίου-ρυθμιστή μέσω του συντελεστή συσχέτισης Pearson (Εικ. 22). Αυτή η ανάλυση έδειξε περιορισμένη αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης DAB2IP και EZH2 ($r = -0.45$, $p < 0.05$). Παρόμοια περιορισμένη αρνητική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ του DAB2IP και του mir-363-3p ($r = -0.40$, $p < 0.05$).



Εικόνα 22. Ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ της έκφρασης DAB2IP και (A) της έκφρασης του EZH2 και (B) της έκφρασης του mir-363-3p, μέσω του συντελεστή συσχέτισης Pearson. Μία περιορισμένη αρνητική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του DAB2IP και των EZH2 ($r = -0.45$, $p < 0.05$) και mir-363 ($r = -0.40$, $p < 0.05$).

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το ΑΚΑ είναι μια απειλητική για τη ζωή, πολύπλοκη, πολυπαραγοντική ασθένεια που επηρεάζεται από γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου. [136] Η παθογένεση του είναι αποτέλεσμα πολλών βιολογικών διεργασιών με κυριότερες τη φλεγμονή, την αποδόμηση της εξωκυτταρικής μήτρας και την απόπτωση των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων. [298] Τα στοιχεία από την πληθυσμιακή επιδημιολογία υποδηλώνουν ότι υπάρχει ισχυρό γενετικό υπόβαθρο στον κίνδυνο για ΑΚΑ, με την κληρονομικότητα να φτάνει ακόμα και το 70-80% ενώ οι περιβαλλοντικοί παράγοντες με κυριότερο το κάπνισμα συμβάλλουν στο υπόλοιπο 20-30%. [36] Εξαιτίας της καθυστέρησης στην εμφάνιση του ΑΚΑ αλλά και τη δυσκολία συλλογής μεγάλου αριθμού προσβεβλημένων οικογενειών, οι έρευνες για το γενετικό υπόβαθρο έχουν μετατοπιστεί προς τις μελέτες συσχέτισης γονιδιώματος GWAS.

Η δυσλειτουργία του γονιδίου LRP1 έχει συσχετισθεί ευρέως με την ανάπτυξη του ΑΚΑ. Οι GWAS έχουν αποκαλύψει μια ισχυρή γενετική συσχέτιση του LRP1 με την ανάπτυξη αορτικού ανευρύσματος. [143] Ωστόσο, μια πρόσφατη μετα-ανάλυση έθεσε υπό αμφισβήτηση τη συσχέτιση που είχε εντοπιστεί προηγουμένως μεταξύ LRP1 και ΑΚΑ. [142] Επομένως, ο πρώτος στόχος μας ήταν να διερευνήσουμε τη διαφορική έκφραση του LRP1 σε ιστούς ανευρύσματος κοιλιακής αορτής σε σύγκριση με μη ανευρυσματικούς αορτικούς ιστούς. Για το λόγο αυτό μελετήσαμε την έκφραση του LRP1 τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν μια σημαντική μείωση, περίπου 1,5 φορές στην έκφραση του mRNA του LRP1 και μια μείωση, περίπου 2,76 φορές, στην πρωτεΐνη LRP1 στα δείγματα ΑΚΑ σε σύγκριση με τους μη ανευρυσματικούς μάρτυρες. Τα ευρήματά μας υποστηρίζουν την υπόθεση ότι το LRP1 είναι ένας βιολογικά πιθανός υποψήφιος για να συμβάλει στον σχηματισμό ΑΚΑ μέσω της μειωμένης λειτουργίας του. [299] Ο Chan και οι συνεργάτες του ήταν οι πρώτοι που μελέτησαν την έκφραση του LRP1 σε επίπεδο πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας μικρότερο αριθμό αορτικών δειγμάτων (n=12) και υγιών αορτικών ιστών από νεκρούς δότες οργάνων σαν μάρτυρες. [155] Στην έρευνα τους βρήκαν ότι η έκφραση του LRP1 μειώνεται στο μισό στα παθολογικά δείγματα, κάτι που έρχεται σε απόλυτη συμφωνία με τα δικά μας αποτελέσματα. Επί του παρόντος, άλλη μια μελέτη έχει αναφέρει σημαντική μείωση στην έκφραση του LRP1 σε βιοψίες αορτής, ενώ αντίθετα δεν έχει βρεθεί διαφορά στην έκφραση της κυκλοφορούσας πρωτεΐνης σε Αυστραλούς ασθενείς, υποδηλώνοντας ότι η δυσλειτουργία του LRP1 είναι εντοπισμένη στο αορτικό τοίχωμα σε ασθενείς με ΑΚΑ. [154]

Οι Bown et al στη GWAS που πραγματοποίησαν σε 1866 ασθενείς AKA και 5435 υγιείς μάρτυρες και στη μελέτη επιβεβαίωσης των κύριων σημάτων για τα SNPs αναφέρουν ότι ο πολυμορφισμός rs1466535 σχετίζεται με το AKA και την έκφραση του LRP1. Συγκεκριμένα αναφέρουν ότι το αλληλόμορφο C είναι το αλληλόμορφο κινδύνου το οποίο παραδόξως οδηγεί σε αυξημένη έκφραση LRP1. [143] Ωστόσο οι Galora et al, ενώ επιβεβαίωσαν το σημαντικό ρόλο του πολυμορφισμού rs1466535 ως παράγοντα κινδύνου για το AKA, υπέδειξαν το T ως αλληλόμορφο κινδύνου. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήσαμε και στη μελέτη μας ανάλυση της γονιδιακής αλληλουχίας των δειγμάτων AKA και των υγιών μαρτύρων για τον πολυμορφισμό rs1466535. [300] Τα περισσότερα άτομα της μελέτης μας εμφάνισαν τον ετερόζυγο C/T γονότυπο, όποτε στον πληθυσμό μας δεν υπήρχε συσχέτιση της νόσου με τον πολυμορφισμό αυτό.

Αν και δεν υπάρχει άμεση απόδειξη για το ρόλο του LRP1 στο σχηματισμό AKA, μελέτες σε ποντικά LRP1^{-/-} έχουν δείξει το σημαντικό ρόλο της πρωτεΐνης αυτής στη διατήρηση της αγγειακής ακεραιότητας. Οι αρτές αυτών των ποντικών έχουν φαινότυπο τύπου σύνδρομου Marfan με διάσπαση των ελαστικών στρωμάτων και υπερπλασία των VSMC, αυξημένη αγγειακή στρεβλότητα, πάχυνση και διάταση. [156, 157, 301] Σύγκριση στις συγκεντρώσεις της κυκλοφορούσας χοληστερόλης σε ποντικά LRP1^{-/-} και μάρτυρες έδειξε ότι οι παρατηρούμενες παθολογίες είναι ανεξάρτητες από το μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών. [302] Το LRP1 άλλωστε εμπλέκεται σε ποικίλες βιολογικές διεργασίες όπως η μετανάστευση και ο πολλαπλασιασμός των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων, η διατήρηση των μεταλλοπρωτεϊνών μήτρας, των συμπλεγμάτων αναστολέων πρωτεάσης και των συστατικών εξωκυττάριας μήτρας των οποίων η διαταραχή αποτελεί τις βασικές παθοφυσιολογικές αιτίες του AKA. [153]

Η έλλειψη ισορροπίας μεταξύ της σύνθεσης και της αποδόμησης της εξωκυττάριας μήτρας παίζει έναν κρίσιμο ρόλο στην παθογένεση AKA. [303] Η LRP1 αλληλεπιδρά και διευκολύνει την ενδοκυττάρωση και την αποδόμηση πολλών βιολογικών μορίων εμπλεκόμενων στην αποδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας που έχουν συσχετιστεί με το AKA όπως τα MMP2, MMP9 και TSP2. [153] Στο στάδιο αυτό της μελέτης διερευνήθηκε η έκφραση των συστατικών κλειδιών για την ανάπτυξη AKA, MMP2, MMP9 και TSP2 που ρυθμίζονται από την LRP1. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης MMP2 και MMP9 ήταν σημαντικά αυξημένα, αλλά δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην σχετική έκφραση του TSP2 στους AKA ιστούς σε σύγκριση με τους μη ανευρυσματικούς μάρτυρες. Η μείωση της LRP1 μπορεί να ρυθμίσει τη δραστηριότητα των MMP μέσω δύο μονοπατιών: άμεσο και έμμεσο, μέσω της δέσμησης στις TSPs. [153] Τα αποτελέσματά μας προτείνουν την πορεία της άμεσης δράσης της LRP1 στη ρύθμιση των MMPs καθώς δεν παρατηρήθηκε

σημαντική διαφορά στην σχετική έκφραση του TSP2 . Σε συμφωνία με τα δικά μας αποτελέσματά, η μελέτη από τους Chan et al (2015) ανέφερε ότι η κάθαρση της MMP-9 είναι εξαρτώμενη από την LRP1. [304] Τα σημαντικά αυξημένα επίπεδα των MMP2 και MMP9 στους ιστούς AKA είναι συμβατά με προηγούμενες μελέτες που υπαινίσσονται τον κύριο ρόλο αυτών των μορίων στην ανάπτυξη και την πρόοδο της νόσου. Εκτός από τα αυξημένα επίπεδα στους ιστούς, έχουν αναφερθεί επίσης αυξημένες συγκεντρώσεις της MMP-9 στο πλάσμα ασθενών AKA και έχουν συσχετιστεί με το μέγεθος του ανευρύσματος και τον μελλοντικό κίνδυνο ρήξης του. [305-311] Τέλος, οι Longo et al έχουν δείξει ότι τα MMP-2 και MMP-9 έχουν συνεργιστικό και συν- εξαρτώμενο ρόλο στον σχηματισμό και τον εκφυλισμό του ανευρύσματος. [65]

Οι GWAS μελέτες έχουν συσχετίσει επίσης το γονίδιο DAB2IP με την ανάπτυξη του AKA. Οι Gretarsdottir et al αναγνώρισαν ότι ο πολυμορφισμός rs7025486 εντός του γονιδίου DAB2IP προσδίδει ευαισθησία για την ανάπτυξη AKA. [145] Αυτός ο πολυμορφισμός επιβεβαιώθηκε επίσης ως τόπος κινδύνου με ισχυρές ενδείξεις με πρόσφατη μετα-ανάλυση. [299] Μια περαιτέρω μετα-ανάλυση από τον Jones et al το 2017 αποκάλυψε ότι ένα άλλο SNP, το rs10985349, σχετίζεται επίσης με την ευαισθησία του κοιλιακού αορτικού ανευρύσματος. [142] Από όσο γνωρίζουμε, υπάρχει μόνο μία μελέτη σχετικά με την έκφραση του DAB2IP, παρά την ισχυρή συσχέτιση αυτών των 2 γενετικών τόπων εντός του DAB2IP γονιδίου με τον κίνδυνο του ανευρύσματος της κοιλιακής αορτής. Οι Lenk et al κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η έκφραση του DAB2IP μειώνεται σημαντικά σε ιστούς AKA σε σύγκριση με τους μάρτυρες, χρησιμοποιώντας chip μελέτης έκφρασης πλήρους γονιδιώματος σε 13 μεμονωμένα δείγματα RNA και 2 pooled συγκεντρωμένα δείγματα RNA. [312] Η μελέτη μας εξέτασε την έκφραση DAB2IP σε 18 δείγματα AKA σε σύγκριση με μάρτυρες. Σε αντίθεση με τους Lenk et al, τα αποτελέσματά μας έδειξαν σημαντική αύξηση της σχετικής έκφρασης DAB2IP, περίπου 2,75 φορές, σε παθολογικούς ιστούς σε σύγκριση με μη ανευρυσματικούς.

Το DAB2IP είναι ένα γονίδιο καταστολέας όγκων που εμπλέκεται στην κυτταρική σηματοδότηση, επιβίωση, μετανάστευση, ωρίμανση και απόπτωση. Οι in vitro λειτουργικές μελέτες έχουν δείξει ότι η απώλεια της πρωτεΐνης οδηγεί σε αυξημένο πολλαπλασιασμό κυττάρων και μειωμένη απόπτωση, μέσω της οδού PI3-Akt και των μονοπατιών ASK1. [163] Επομένως η υπερέκφραση αυτού του γονιδίου μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη απόπτωση των κυττάρων της περιοχής όπως τα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα και με αυτό τον τρόπο να συνδεθεί με την παθοφυσιολογία του ανευρύσματος.

Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η έκφραση του DAB2IP ρυθμίζεται από την EZH2 στον καρκίνο, μια μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης που αποτελεί μέρος του Polycomb συμπλόκου

καταστολέα. [313, 314] Έχει αναφερθεί ένας σημαντικός αρνητικός συσχετισμός μεταξύ υπερεκφρασμένου EZH2 και μειωμένης ρύθμισης του DAB2IP στον καρκίνο του προστάτη και του μυελοβλαστώματος. Η καταστολή του DAB2IP στα κύτταρα του μυελοβλαστώματος μπορεί να αντιστραφεί τουλάχιστον εν μέρει με την αναστολή της EZH2, επομένως έχει προταθεί ως πιθανός στόχος φαρμάκου στον καρκίνο του προστάτη. [165, 166] Στη μελέτη μας για να διασαφηνίσουμε τη δράση του EZH2, ελέγξαμε τα επίπεδα έκφρασης του. Η σχετική έκφραση του EZH2 βρέθηκε μειωμένη κατά 2,17 φορές στους ανευρυσματικούς αορτικούς ιστούς συγκριτικά με τους μάρτυρες. Μια περαιτέρω στατιστική ανάλυση έδειξε μια περιορισμένη αρνητική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης EZH2 και DAB2IP επιβεβαιώνοντας την αντίστροφη σχέση των δυο και στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής εκτός από τον καρκίνο.

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο τρόπος αλληλεπίδρασης γονιδίου-περιβάλλοντος μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων. Η επιγενετική αναφέρεται σε κληρονομικές και αποκτηθείσες τροποποιήσεις στο γονιδίωμα που μεταβάλλουν τη γονιδιακή έκφραση χωρίς να αλλάζουν την αλληλουχία DNA. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις περιλαμβάνουν μεθυλίωση του DNA, τροποποιήσεις ιστονών και μη-κωδικά RNA. [159]

Τα microRNAs είναι βασικά μόρια της μετα-μεταγραφικής ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, κι έτσι μπορούν να δρουν ως μεσολαβητές της έκφρασης των προς μελέτη γονιδίων LRP1 και DAB2IP. Τα miRNAs μπορούν να ρυθμίσουν την γονιδιακή έκφραση μέσω της αποδόμησης του mRNA και της αναστολής της μετάφρασης. Σημειώνοντας ότι η μείωση σε επίπεδο πρωτεΐνης του LRP1 είναι υψηλότερη σε σύγκριση με το mRNA, υποθέσαμε ότι η LRP1 ρυθμίζεται κυρίως μέσω μεταφραστικής αναστολής. Συνεπώς, εξετάσαμε αν τα miRNAs επηρεάζουν την ανάπτυξη του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής. Χρησιμοποιώντας διάφορες βάσεις δεδομένων πρόβλεψης miRNA και εστιάζοντας σε αυτά που ενδεχομένως στοχεύουν τα LRP1 και DAB2IP, μετρήσαμε την έκφραση των miR-545-3p και miR-335-5p, τα οποία θεωρήθηκαν πιθανοί υποψήφιοι μεσολαβητές της έκφρασης LRP1 και το miR-363-3p για το DAB2IP.

Όσον αφορά τα miR-545-3p και miR-335-5p, που ρυθμίζουν το LRP1, βρέθηκαν σημαντικά υπερεκφρασμένα στους ιστούς AKA σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες και μια περαιτέρω στατιστική ανάλυση έδειξε μια περιορισμένη αλλά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ των δύο miRNAs και της έκφρασης LRP1. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματά μας δεν συμφωνούν με προηγούμενη μελέτη που διενεργήθηκε από τον Chan et al (2017) ο οποίος δεν παρατήρησε σημαντικά διαφοροποιημένη έκφραση του miR-545-3p σε ανευρυσματικούς αορτικούς ιστούς. [304] Σχετικά με το miR-335-5p δεν

υπάρχουν άλλα διαθέσιμα δεδομένα για την έκφραση του σε ιστούς ΑΚΑ. Στη συνέχεια, διεξήγαμε μια λειτουργική μελέτη για να διασαφηνιστεί ο ιδιαίτερος ρόλος της υπερέκφρασης των δύο miRNAs στην έκφραση LRP1. Προηγουμένως, μόνο οι Song et al μελέτησαν το λειτουργικό ρόλο του miR-545-3p στην έκφραση του LRP1. [315] Σε συμφωνία με αυτή τη μελέτη, η λειτουργική μας μελέτη δεν έδειξε καμία συσχέτιση μεταξύ miR-545-3p και έκφρασης LRP1, παρόλο που η έκφραση miR-545-3p είχε βρεθεί σημαντικά αυξημένη στα δείγματα μας. Τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν ότι ο ρόλος της υπερέκφρασης του miR-545-3p στο ΑΚΑ μπορεί να έγκειται στη ρύθμιση άλλων γονιδίων. Από την άλλη πλευρά, η έκφραση του LRP1 σε επίπεδο mRNA μειώθηκε σημαντικά μετά την υπερέκφραση του miR-335-5p. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ένα νέο μεσολαβητή της έκφρασης LRP1, το miR-335-5p.

Σχετικά με τη ρύθμιση του DAB2IP, το miR-363-3p ήταν σημαντικά μειωμένο στους ιστούς ΑΚΑ σε σύγκριση με τους μάρτυρες και αποκαλύφθηκε μια περιορισμένη αρνητική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης DAB2IP και αυτού του miRNA μέσω του συντελεστή Pearson. Το miR-363-3p έχει συσχετιστεί με καρκίνο του προστάτη και η αλληλεπίδραση με το DAB2IP έχει αναφερθεί ότι οδηγεί σε καταστολή της επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετατροπής (EMT). [316] Η διαταραχή της EMT έχει αναφερθεί ότι παίζει ρόλο σε πολυάριθμες χρόνιες καρδιαγγειακές νόσους όπως η καρδιακή ανεπάρκεια, η πνευμονική υπέρταση και διάφορες μορφές χρόνιας αγγειοπάθειας. [317]

Συμπερασματικά, η μελέτη μας υποδεικνύει δυο πιθανά μοριακά μονοπάτια που μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη ΑΚΑ. Επιβεβαιώσαμε τη μείωση του LRP1 στους ιστούς ΑΚΑ και αποκαλύφθηκε η πιθανή εμπλοκή του miR-335-5p στη ρύθμιση της, υποδεικνύοντας το miR-335-5p ως νέο μεσολαβητή της έκφρασης LRP1 στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής. Επιπλέον, υποδείξαμε μια συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης LRP1 και MMPs, ενώ δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ του TSP2 και του LRP1. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το μόριο TSP2 δεν εμπλέκεται στην οδό LRP1-MMPs στην ανάπτυξη του ΑΚΑ. Επίσης το miR-545-3p φαίνεται να σχετίζεται με τη νόσο, όχι όμως με την LRP1. Επίσης η μελέτη μας αποκαλύπτει μια αυξημένη έκφραση του DAB2IP που θα μπορούσε να διαμορφωθεί μέσω της παράλληλης μειωμένης ρύθμισης των EZH2 και miR-363-3p.

Αξίζει να αναφερθεί ότι ένα περιορισμός αυτής της μελέτης αποτελεί ο μικρότερος αριθμός μη ανευρυσματικών αορτικών ιστών που χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες σε σύγκριση με τους παθολογικούς. Επιπλέον, προκειμένου να ενισχυθούν τα ευρήματά μας, λειτουργική μελέτη θα πρέπει επίσης να διεξαχθεί και για το miR-363-3p αλλά και να επαναληφθεί για τα άλλα 2 miRNAs σε ανθρώπινα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα που

καλλιεργούνται από ιστούς ΑΚΑ. Θα πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω η επίπτωση επιπρόσθετων μορίων στη ρύθμιση του LRP1 και του DAB2IP.

Η διαφορετική ρύθμιση των γονιδίων LRP1 και DAB2IP μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ΑΚΑ μέσω διαφορετικών παθοφυσιολογικών οδών όπως η αυξημένη απόπτωση των VSMC, η αποδόμηση των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας ή διαταραγμένη EMT. Με την κατανόηση της παθοφυσιολογίας του σχηματισμού του ανευρύσματος, στοχευμένες θεραπείες μπορούν να σχεδιαστούν για να εμποδίζουν την ανάπτυξη ή τη ρήξη του ανευρύσματος.

6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχοι: Τα γονίδια LRP1 και DAB2IP έχουν προταθεί ως πιθανά υποψήφια γονίδια που οδηγούν στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής (ΑΚΑ). Ο σκοπός της μελέτης μας ήταν να αποσαφηνιστεί εάν τα miR-335-5p και miR-545-3p είναι ρυθμιστές της έκφρασης LRP1 και να διερευνηθεί η επίδραση της έκφρασης LRP1 σε άλλα σημαντικά μόρια στην παθογένεση ΑΚΑ, όπως οι MMP2, MMP9 και TSP2 καθώς και αν το miR-363-3p και το EZH2 είναι ρυθμιστές του DAB2IP.

Υλικά-Μέθοδοι: Δείγματα συλλέχθηκαν από ασθενείς κατά τη διάρκεια ανοικτής χειρουργικής επέμβασης ΑΚΑ και παρακείμενες μη ανευρυσματικές περιοχές χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης mRNA των γονιδίων και των miRNAs υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας rt-real time PCR. Με την μέθοδο Western blot ποσοτικοποιήσαμε τα επίπεδα των πρωτεϊνών LRP1, MMP2 και MMP9. Λειτουργική μελέτη ακολούθησε, εξετάζοντας την επίδραση της υπερέκφρασης των miR-545-3p και miR-335-5p στην έκφραση του LRP1.

Αποτελέσματα: Παρατηρήθηκε μία σημαντική μείωση τόσο του mRNA όσο και της πρωτεΐνης LRP1 (1.5 φορές και 2.76 φορές μείωση, αντίστοιχα) σε ανθρώπινους ιστούς ΑΚΑ σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Τα miR-335-5p (1.49 φορές αύξηση) και miR-545-3p (1.36 φορές αύξηση) εμφανίστηκαν υπερεκφραζόμενα στους ιστούς ΑΚΑ. Η συσχέτιση Pearson έδειξε περιορισμένη αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης LRP1 και των 2 miRNAs. Η λειτουργική μελέτη έδειξε εξαιρετικά σημαντική μειωμένη έκφραση LRP1 στα κύτταρα που υπερεκφράζουν το miR-335-5p. Τα επίπεδα του MMP2 και MMP9 ήταν σημαντικά υψηλότερα σε ΑΚΑ ιστούς. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην έκφραση του TSP2 mRNA. Το DAB2IP ήταν σημαντικά αυξημένο (2.29 φορές) στους ιστούς ΑΚΑ, ενώ τα EZH2 και miR-363-3p βρέθηκαν μειωμένα (3.28 και 3.62 φορές αντίστοιχα). Περιορισμένη αρνητική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ της έκφρασης DAB2IP και EZH2 και μεταξύ του DAB2IP και του miR-363-3p.

Συμπεράσματα: Στη μελέτη μας, η μείωση του LRP1 στους ιστούς ΑΚΑ επιβεβαιώθηκε και αποδόθηκε σε μεσολαβούμενη ρύθμιση μέσω του miR-335-5p. Υποδεικνύεται ότι το LRP1 έχει άμεση επίδραση στη ρυθμιστική δράση των MMPs. Επίσης βρέθηκε αυξημένη έκφραση του DAB2IP σε ιστούς ΑΚΑ. Για τη ρύθμιση αυτή προτείνουμε 2 δυνητικούς μεσολαβητές, τα EZH2 και miR-363-3p. Η μελέτη και άλλων μορίων στη ρύθμιση των γονιδίων αυτών θα διασαφηνίσει το μοριακό μονοπάτι της νόσου.

7. ABSTRACT

Objectives: The LRP1 and DAB2IP genes have been suggested as potential candidate genes leading abdominal aortic aneurysm (AAA). The aim of our study was to elucidate whether mir-335-5p and mir-545-3p are regulators of LRP1 expression and mir-363-3p and EZH2 are mediators of DAB2IP, and to investigate the effect of LRP1 expression in other important molecules of AAA pathogenesis, such as MMP2, MMP9 and TSP2.

Materials-Methods: Samples were collected from patients during open surgical AAA repair and adjacent non-aneurysmatic regions were used as controls. Relative mRNA expression levels of genes and miRNAs LRP1 were measured using rt-real time PCR. Western blot was used to quantify the levels of LRP1, MMP2 and MMP9 protein. A functional study followed, testing the effect of mir-335-5p overexpression on LRP1 expression.

Results: A significant reduction of both LRP1 mRNA and protein level (1.5 fold and 2.76 fold decrease, respectively) was observed in human AAA tissues compared to controls. AAA tissues showed a significant overexpression of both mir-335-5p (~1.49 fold increase) and mir-545-3p (1.36 fold increase). The Pearson correlation showed a limited negative correlation between LRP1 expression levels and both miRNAs. The functional study showed extremely significant decreased expression of LRP1 in cells overexpressing mir-335-5p. The functional study indicated an extremely significant reduced LRP1 mRNA expression in cells overexpressing mir-335-5p. MMP2 and MMP9 levels were significantly increased in AAA tissues. No significant difference in expression of TSP2 mRNA was observed. DAB2IP was significantly overexpressed (2.29 times) in AAA tissues, while EZH2 and mir-363-3p were found to be decreased (3.28 and 3.62 times respectively). A limited negative association was found between DAB2IP and EZH2 expression and between DAB2IP and mir-363-3p.

Conclusions: In our study, LRP1 reduction in AAA tissues was confirmed and attributed to mediated regulation via mir-335-5p. It is suggested that LRP1 has a direct effect on the regulatory activity of MMPs. We recommend 2 potential mediators, EZH2 and mir-363-3p of DAB2IP expression in AAA tissues. The study of other molecules in the regulation of these genes will elucidate the molecular pathway of the disease.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. OpexStax College. Anatomy and Physiology. Houston, TX: OpenStax College; 2013.
2. Sherwood, L. (2015). Human physiology: from cells to systems. Cengage learning.
3. Legg JS, & Legg LM. (2016). Abdominal aortic aneurysms. Radiologic technology, 88(2), 145-163.
4. Παπαλάμπρος, Ε. Λ. "Χειρουργική." Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (2012).
5. Sampson UK, Norman PE, Fowkes FGR, Aboyans V, Song Y, Harrell Jr F, et al. (2014). Estimation of global and regional incidence and prevalence of abdominal aortic aneurysms 1990 to 2010. Global heart, 9(1), 159-170.
6. Li X, Zhao G, Zhang J, Duan Z, & Xin S. (2013). Prevalence and trends of the abdominal aortic aneurysms epidemic in general population-a meta-analysis. PLoS One, 8(12), e81260.
7. Singh K, Bonna KH, Jacobsen BK, Bjork L, Solberg S (2001). Prevalence of and risk factors for abdominal aortic aneurysms in a population-based study: The Tromso Study. Am J Epidemiol 154: 236–244,
8. Alcorn HG, Wolfson SK Jr, Sutton-Tyrrell K, Kuller LH, O'Leary D (1996). Risk factors for abdominal aortic aneurysms in older adults enrolled in The Cardiovascular Health Study. Arterioscler Thromb Vasc Biol 16: 963–970.
9. Pleumeekers HJ, Hoes AW, van der Does E, van Urk H, Hofman A, et al. (1995). Aneurysms of the abdominal aorta in older adults. The Rotterdam Study. Am J Epidemiol 142: 1291–1299
10. Brown LC, Powell JT (1999). Risk factors for aneurysm rupture in patients kept under ultrasound surveillance. UK Small Aneurysm Trial Participants. Ann Surg 230: 289–296; discussion 296–287. 73.
11. Lindholt JS, Vammen S, Juul S, Fasting H, Henneberg EW (2000). Optimal interval screening and surveillance of abdominal aortic aneurysms. Eur J Vasc Endovasc Surg 20: 369–373
12. Norman P & Powell JT (2007). Abdominal aortic aneurysm: the prognosis in women is worse than in men. Circulation 115, 2865–2869
13. Bengtsson H, Sonesson B, Bergqvist D (1996). Incidence and prevalence of abdominal aortic aneurysms, estimated by necropsy studies and population screening by ultrasound. Ann N Y Acad Sci;800:1-24.
14. Sakalihasan N, Michel JB, Katsargyris A, Kuivaniemi H, Defraigne JO, Nchimi A, Powell JT et al (2018). Abdominal aortic aneurysms. Nat Rev Dis Primers. 4(1):34.

15. Dahl M, Frost L, Sogaard R, Klausen IC, Lorentzen V, & Lindholt J. (2018). A population-based screening study for cardiovascular diseases and diabetes in Danish postmenopausal women: acceptability and prevalence. *BMC cardiovascular disorders*, 18(1), 20.
16. Zomporodi, S., Leander, K., Roy, J., Steuer, J., & Hultgren, R. (2018). Understanding abdominal aortic aneurysm epidemiology: socioeconomic position affects outcome. *J Epidemiol Community Health*, 72(10): 904-910.
17. Acosta S, Ogren M, Bengtsson H, Bergqvist D, Lindblad B, et al. (2006) Increasing incidence of ruptured abdominal aortic aneurysm: a population based study. *J Vasc Surg* 44: 237–243.
18. Wilmink AB, Quick CR (1998). Epidemiology and potential for prevention of abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg*, 85:155.
19. Boll AP, Severens JL, Verbeek AL, van der Vliet JA (2003). Mass screening on abdominal aortic aneurysm in men aged 60 to 65 years in The Netherlands. Impact on life expectancy and cost-effectiveness using a Markov model. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 26: 74–80
20. Multicentre Aneurysm Screening Study G (2002). Multicentre aneurysm screening study (MASS): cost effectiveness analysis of screening for abdominal aortic aneurysms based on four year results from randomised controlled trial. *BMJ* 325: 1135.
21. Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzner NR, et al. (2006) ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. *Circulation* 113:463–654.
22. Gadowski GR, Pilcher DB, Ricci MA (1994) Abdominal aortic aneurysm expansion rate: effect of size and beta-adrenergic blockade. *J Vasc Surg* 19: 727– 731. 77.
23. Yeung JM, Heeley M, Gray S, Lingam MK, Manning G, et al. (2002). Does the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphism affect rate of abdominal aortic aneurysm expansion? *Eur J Vasc Endovasc Surg* 24: 69–71.
24. Powell JT, Greenhalgh RM (2003). Clinical practice. Small abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med* 348:1895–1901.

25. Scott RA, Ashton HA, Kay DN (1991). Abdominal aortic aneurysm in 4237 screened patients: prevalence, development and management over 6 years. *Br J Surg* 78:1122–1125.
26. Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, et al. (2000). The aneurysm detection and management study screening program: validation cohort and final results. Aneurysm Detection and Management Veterans Affairs Cooperative Study Investigators. *Arch Intern Med* 160:1425–1430.
27. Wanhainen A (2008) How to define an abdominal aortic aneurysm– influence on epidemiology and clinical practice. *Scand J Surg* 97(2):105–109.
28. Brady AR, Thompson SG, Fowkes FG, et al. (2004) Abdominal aortic aneurysm expansion: risk factors and time intervals for surveillance. *Circulation* 110:16–21.
29. Lederle FA, Nelson DB, Joseph AM (2003). Smokers' relative risk for aortic aneurysm compared with other smoking-related diseases: a systematic review. *J Vasc Surg* 38:329–334.
30. Kent KC, Zwolak RM, Egorova NN, et al. (2010). Analysis of risk factors for abdominal aortic aneurysm in a cohort of more than 3 million individuals. *J Vasc Surg* 52:539–548
31. Wilmink TB, Quick CR, Day NE (1999). The association between cigarette smoking and abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 30:1099–1105.
32. Salem MK, Rayt HS, Hussey G, et al. (2009). Should Asian men be included in abdominal aortic aneurysm screening programmes? *Eur J Vasc Endovasc Surg* 38:748–749.
33. Fleming C, Whitlock EP, Beil TL, Lederle FA (2005). Screening for abdominal aortic aneurysm: a best-evidence systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 142:203–211.
34. Blanchard JF, Armenian HK, Friesen PP (2000). Risk factors for abdominal aortic aneurysm: results of a case-control study. *Am J Epidemiol* 151:575–583.
35. Larsson E, Granath F, Swedenborg J, Hultgren R (2009). A population-based case-control study of the familial risk of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 49:47–50.
36. Wahlgren CM, Larsson E, Magnusson PK, Hultgren R, Swedenborg J (2010). Genetic and environmental contributions to abdominal aortic aneurysm development in a twin population. *J Vasc Surg.* 51(1):3-7.
37. Majumder PP, St Jean PL, Ferrell RE, Webster MW, Steed DL (1991). On the inheritance of abdominal aortic aneurysm. *Am J Hum Genet* 48:164–170
38. Kuivaniemi H, Shibamura H, Arthur C, et al. (2003). Familial abdominal aortic aneurysms: collection of 233 multiplex families. *J Vasc Surg* 37:340–345.

39. Verloes A, Sakalihan N, Koulischer L, Limet R (1995). Aneurysms of the abdominal aorta: familial and genetic aspects in three hundred thirteen pedigrees. *J Vasc Surg* 21:646–655.
40. Whitehouse WM Jr, Wakefield TW, Graham LM, et al. (1983). Limb-threatening potential of arteriosclerotic popliteal artery aneurysms. *Surgery* 93:694–699.
41. Graham LM, Zelenock GB, Whitehouse WM Jr, et al. (1980). Clinical significance of arteriosclerotic femoral artery aneurysms. *Arch Surg* 115:502–507.
42. Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, et al. (1997). Prevalence and associations of abdominal aortic aneurysm detected through screening. Aneurysm Detection and Management (ADAM) Veterans Affairs Cooperative Study Group. *Ann Intern Med* 126:441–449.
43. MacSweeney ST, O'Meara M, Alexander C, et al. (1993). High prevalence of unsuspected abdominal aortic aneurysm in patients with confirmed symptomatic peripheral or cerebral arterial disease. *Br J Surg* 80:582–584.
44. Baxter BT, Terrin MC, Dalman RL (2008). Medical management of small abdominal aortic aneurysms. *Circulation* 117:1883–1889.
45. Bengtsson H, Ekberg O, Aspelin P, et al. (1989). Ultrasound screening of the abdominal aorta in patients with intermittent claudication. *Eur J Vasc Surg* 3:497-502.
46. Cabellon S Jr, Moncrief CL, Pierre DR, et al. (1983). Incidence of abdominal aortic aneurysms in patients with atheromatous arterial disease. *Am J Surg* 146:575-6.
47. Forsdahl SH, Singh K, Solberg S, Jacobsen BK (2009). Risk factors for abdominal aortic aneurysms: a 7-year prospective study: the Tromsø Study, 1994–2001. *Circulation* 119(16):2202-2208.
48. Shantikumar S, Ajjan R, Porter KE, Scott DJ (2010). Diabetes and the abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 39:200–207.
49. Fitridge R, & Thompson M. (Eds.). (2007). *Mechanisms of vascular disease: a textbook for vascular surgeons*. Cambridge University Press.
50. Norman P & Powell JT (2010). Site specificity of aneurysmal disease. *Circulation* 121, 560–568
51. Nordon I, Brar R, Taylor J, Hinchliffe R, Loftus IM & Thompson MM (2009). Evidence from cross-sectional imaging indicates abdominal but not thoracic aortic aneurysms are local manifestations of a systemic dilating diathesis. *Journal of vascular surgery*, 50(1):171-176.
52. Hoshina K, Sho M, Nakahashi TK & Dalman RL. (2003). Wall shear stress and strain modulate experimental aneurysm cellularity. *J. Vasc. Surg.* 37: 1067–1074.
53. Golledge J & Norman P (2010). Atherosclerosis and abdominal aortic aneurysm: cause, response, or common risk factors? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30: 1075–1077.

54. McCormick ML, Gavrila D & Weintraub NL (2007). Role of oxidative stress in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27: 461–469.
55. Xiong W, Mactaggart J, Knispel R, Worth J, Zhu Z, Li Y, et al (2009). Inhibition of reactive oxygen species attenuates aneurysm formation in a murine model. *Atherosclerosis*, 202(1): 128-134.
56. Thompson RW, Geraghty PJ & Lee JK (2002). Abdominal aortic aneurysms: basic mechanisms and clinical implications. *Curr. Probl. Surg.* 39: 110– 230.
57. Golledge J (2019). Abdominal aortic aneurysm: update on pathogenesis and medical treatments. *Nat Rev Cardiol.* 16(4):225-242.
58. Schonbeck U, Sukhova GK, Gerdes N & Libby P (2002). T(H)2 predominant immune responses prevail in human abdominal aortic aneurysm. *Am. J. Pathol.* 161: 499–506.
59. Chan WL, Pejnovic N, Liew TV & Hamilton H (2005). Predominance of Th2 response in human abdominal aortic aneurysm: mistaken identity for IL-4- producing NK and NKT cells. *Cell. Immunol.* 233: 109–114.
60. Shimizu K, Mitchell RN & Libby P (2006). Inflammation and cellular immune responses in abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26(5): 987–994.
61. Maegdefessel L, Dalman RL, Tsao PS (2014). Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms: microRNAs, proteases, genetic associations. *Annu Rev Med.* 65:49-62.
62. Sangiorgi G, D'Averio R, Mauriello A, *et al.* (2001). Plasma levels of metalloproteinases-3 and -9 as markers of successful abdominal aortic aneurysm exclusion after endovascular graft treatment. *Circulation* 104: 1288–1295.
63. Silence J, Lupu F, Collen D, & Lijnen HR (2001). Persistence of atherosclerotic plaque but reduced aneurysm formation in mice with stromelysin-1 (MMP-3) gene inactivation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21: 1440–1445.
64. Thompson, R.W. & W.C. Parks. 1996. Role of matrix metalloproteinases in abdominal aortic aneurysms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 800: 157–174.
65. Longo GM, Xiong W, Greiner TC, *et al.* (2002). Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J. Clin. Invest* 110: 625–632.
66. Coscas R, Bensussan M, Jacob MP, Louedec L, Massy Z, Sadoine J et al (2017). Free DNA precipitates calcium phosphate apatite crystals in the arterial wall in vivo. *Atherosclerosis*, 259, 60-67.
67. Lindholt JS (2008). Aneurysmal wall calcification predicts natural history of small abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis* 197: 673–678.
68. Ailawadi G, Eliason JL & Upchurch GR (2003). Current concepts in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. *J. Vasc. Surg.* 38: 584–588.

69. Baxter BT, Davis VA, Minion DJ, Wang YP, Lynch TG, & McManus BM (1994). Abdominal aortic aneurysms are associated with altered matrix proteins of the nonaneurysmal aortic segments. *Journal of vascular surgery*, 19(5): 797-803.
70. Goodall S, Crowther M, Bell PR & Thompson MM (2002). The association between venous structural alterations and biomechanical weakness in patients with abdominal aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg.* 35: 937–942.
71. Makita S, Ohira A, Tachieda R, Itoh S, Moriai Y, Niinuma H et al. (2000). Dilation and reduced distensibility of carotid artery in patients with abdominal aortic aneurysms. *American heart journal*, 140(2): 297-302.
72. Xia S, Ozsvath K, Hirose H, & Tilson MD (1996). Partial amino acid sequence of a novel 40-kDa human aortic protein, with vitronectin-like, fibrinogen-like, and calcium binding domains: aortic aneurysm-associated protein-40 (AAAP-40)[human MAGP-3, proposed]. *Biochemical and biophysical research communications*, 219(1): 36-39.
73. Hirose H, & Tilson MD (2001). Abdominal aortic aneurysm as an autoimmune disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 947(1): 416-418.
74. Sugimoto T, Sada M, Miyamoto T & Yao H (2003). Genetic analysis on HLA loci in Japanese patients with abdominal aortic aneurysm. *European journal of vascular and endovascular surgery*, 26(2): 215-218.
75. Crawford CM, Hurtgen-Grace K, Talarico E, Marley J (2003). Abdominal aortic aneurysm: an illustrated narrative review. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*, 26(3): 184-195.
76. Akkersdijk GJ, van Bockel JH (1998). Ruptured abdominal aortic aneurysm: initial misdiagnosis and the effect on treatment. *Eur J Surg* 164:29–34
77. Assar AN, Zarins CK (2009). Ruptured abdominal aortic aneurysm: a surgical emergency with many clinical presentations. *Postgrad Med J.* 85(1003):268-273.
78. Chaikof EL, Brewster DC, Dalman RL, et al. (2009). SVS practice guidelines for the care of patients with an abdominal aortic aneurysm: executive summary. *J Vasc Surg* 50:880–896
79. Desai M, Eaton-Evans J, Hillery C, et al (2010). AAA stent-grafts: past problems and future prospects. *Ann Biomed Eng* 38: 1259–1274.
80. Sun ZH (2012). Abdominal aortic aneurysm: Treatment options, image visualizations and follow-up procedures. *J Geriatr Cardiol.* 9(1):49-60.
81. Endovascular stent-grafts for the treatment of abdominal aortic aneurysms. NICE technology appraisal guidance 167. www.nice.org.uk (accessed on October 26, 2011)
82. Ernst C (1993). Abdominal aortic aneurysm. *N Engl J Med* 328: 1167–1172.
83. Lawrence PF, Gazak C, Bhirangi L, et al (1999). The epidemiology of surgically repaired aneurysms in the United States. *J Vasc Surg* 30: 632–640.

84. Calero A, Illig KA (2016). Overview of aortic aneurysm management in the endovascular era. *Semin Vasc Surg.* 29(1-2):3-17.
85. Parodi JC, Palmaz JC, Barone HD (1991). Transfemoral intraluminal graft implantation for abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg* 5: 491–499.
86. Woodburn KR, May J, White GH (1998). Endoluminal abdominal aortic aneurysm surgery. *Br J Surg* 85: 435–443.14
87. May J, White G, Waugh R, *et al* (1994). Treatment of complex abdominal aortic aneurysms by a combination of endoluminal and extraluminal aortofemoral grafts. *J Vasc Surg* 19: 924–933.
88. Williamson AJ & Babrowski T (2018). Current endovascular management of complex pararenal aneurysms. *J. Cardiovasc. Surg.* 59: 336–341.
89. Katsargyris A & Verhoeven EL (2013). Endovascular strategies for infrarenal aneurysms with short necks. *J. Cardiovasc. Surg.* 54 (Suppl. 1), 21–26.
90. AbuRahma AF, Yacoub M, Mousa AY, Abu-Halimah S, Hass SM, Kazil J *et al.* (2016). Aortic neck anatomic features and predictors of outcomes in endovascular repair of abdominal aortic aneurysms following vs not following instructions for use. *Journal of the American College of Surgeons*, 222(4): 579-589.
91. Gruppo M, Mazzalai F, Lorenzetti R, Piatto G, Toniato A, & Ballotta E. (2012). Midline abdominal wall incisional hernia after aortic reconstructive surgery: a prospective study. *Surgery*, 151(6): 882-888.
92. Fassiadis N. Roidl M. Andrews S (2005). Randomized clinical trial of vertical or transverse laparotomy for abdominal aortic aneurysm repair. *British Journal Surgery*, 92: 1208-1211
93. Dubois L, Durant C, Harrington DM , *et al* (2013). Technical factors are strongest predictors of postoperative renal dysfunction after open trans peritoneal juxtarenal abdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg* 57:648–54.
94. Becquemin JP, Majewski M, Fermani N, *et al* (2008). Colon ischemia following abdominal aortic aneurysm repair in the era of endovascular abdominal aortic repair. *JVascSurg* 47:258–63, discussion263.
95. Prinssen M, Buskens E, Nolthenius RP, *et al* (2004). Sexual dysfunction after conventional and endovascular AAA repair: results of the DREAM trial. *JEndovascTher* 11:613–20.
96. Laser A, Baker N, Rectenwald J, *et al* (2011). Graft infection after endovascular abdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg* 54:58–63.
97. Kakkos S, Antoniadis P, Klonaris C. (2011) Open or endovascular repair of aortoenteric fistulas? A multicentre comparative study *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 41: 625-634.

98. Stavropoulos SW, Itkin M, Lakhani P, et al (2006). Detection of endoleaks after endovascular aneurysm repair with use of technetium-99m sulfur colloid and (99m)Tc-labeled red blood cell scans. *J Vasc Interv Radiol* 17:1739-43.
99. Moll FL, Powell JT, Fraedrich G, et al (2011). Management of abdominal aortic aneurysms clinical practice. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 41 Suppl 1:S1-S58.
100. Chaikof EL, Blankensteijn JD, Harris PL, et al (2002). Reporting standards for endovascular aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg* 35:1048-60
101. Cernohorsky P, Reijnen MM, Tiellu IF, et al (2011). The relevance of aortic endograft prosthetic infection. *J Vasc Surg* 54:327-33.
102. Wisselink W, Cuesta MA, Berends FJ, et al (2000). Retroperitoneal endoscopic ligation of lumbar and inferior mesenteric arteries as a treatment of persistent endoleak after endoluminal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg* 31:1240-4.
103. Laheij RJ, Buth J, Harris PL, et al (2000). Need for secondary interventions after endovascular repair of abdominal aortic aneurysms. Intermediate-term follow-up results of a European collaborative registry (EUROSTAR). *Br J Surg* 87:1666-73.
104. O'Connor S, Andrew P, Batt M, et al (2006). A systematic review and meta-analysis of treatments for aortic graft infection. *J Vasc Surg* 44:38-45.
105. Ohki T, Ouriel K, Silveira PG, et al (2007). Initial results of wireless pressure sensing forendovascular aneurysm repair: the APEX Trial--Acute Pressure Measurement to Confirm Aneurysm Sac EXclusion. *J Vasc Surg* 45:236-42.
106. Murphy EH, Szeto WY, Herdrich BJ, et al (2013). The management of endograft infections following endovascular thoracic and abdominal aneurysm repair. *J Vasc Surg* 58:1179-85.
107. Capoccia L, Speziale F, Menna D, et al (2016). Preliminary Results from a National Enquiry of Infection in Abdominal Aortic Endovascular Repair (Registry of Infection in EVAR--R.I.EVAR). *Ann Vasc Surg* 30:198-204.
108. Sharif MA, Lee B, Lau LL, et al (2007). Prosthetic stent graft infection after endovascular abdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg* 46:442-8.
109. EVAR trial participants (2005). Endovascular aneurysm repair versus open repair in patients with abdominal aortic aneurysm (EVAR trial 1): randomised controlled trial. *Lancet* 365:2179-86.
110. Fransen GA, Desgranges P, Laheij RJ, et al (2003). Frequency, predictive factors, and consequences of stent-graft kink following endovascular AAA repair. *J Endovasc Ther* 10:913-8.
111. Jonker FH, Schlosser FJ, Geirsson A, et al (2010). Endograft collapse after thoracic endovascular aortic repair. *J Endovasc Ther* 17:725-34.

112. Tadros RO, Lipsitz EC, Chaer RA, et al (2011). A multicenter experience of the management of collapsed thoracic endografts. *J Vasc Surg* 53:1217-22.
113. Maldonado TS, Rockman CB, Riles E, et al (2004). Ischemic complications after endovascular abdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg* 40:703-09
114. Miller A, Marotta M, Scordi-Bello I, et al (2009). Ischemic colitis after endovascular aortoiliac aneurysm repair: a 10-year retrospective study. *Arch Surg* 144:900-3.
115. Angiletta D, Marinazzo D, Guido G, et al (2011). Spinal cord, bowel, and buttock ischemia after endovascular aneurysm repair. *Ann Vasc Surg* 25:980.e15-9.103.
116. Freyrie A, Testi G, Gargiulo M, et al (2011). Spinal cord ischemia after endovascular treatment of infrarenal aortic aneurysm. Case report and literature review. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 52:731.
117. Moulakakis KG, Dalainas I, Mylonas S, et al (2010). Conversion to open repair after endografting for abdominal aortic aneurysm: a review of causes, incidence, results, and surgical techniques of reconstruction. *J Endovasc Ther* 17:694-702.
118. Gabriel EA, Locali RF, Romano CC, et al (2007). Analysis of the inflammatory response in endovascular treatment of aortic aneurysms. *Eur J Cardiothorac Surg* 31:406-12.
119. Johansen K, Koepsell T (1986). Familial tendency for abdominal aortic aneurysms. *JAMA*. 256:1934–1936.
120. Jones GT, Hill BG, Curtis N, Kabir TD, Wong LE, Tilyard MW, et al. (2016). Comparison of three targeted approaches to screening for abdominal aortic aneurysm based on cardiovascular risk. *Br J Surg*. 103:1139–1146.
121. Ogata T, MacKean GL, Cole CW, Arthur C, Andreou P, et al (2005). The lifetime prevalence of abdominal aortic aneurysms among siblings of aneurysm patients is eightfold higher than among siblings of spouses: an analysis of 187 aneurysm families in Nova Scotia, Canada. *J Vasc Surg* 42:891–897.
122. Rossaak JI, Hill TM, Jones GT, Phillips LV, Harris EL, van Rij AM (2001). Familial abdominal aortic aneurysms in the Otago region of New Zealand. *Cardiovasc Surg*. 9:241–248.
123. Akai A, Watanabe Y, Hoshina K, Obitsu Y, et al (2015). Family history of aortic aneurysm is an independent risk factor for more rapid growth of small abdominal aortic aneurysms in Japan. *J. Vasc. Surg.* 61: 287–290.
124. Sakalihan N, Defraigne JO, Kerstenne MA, Cheramy-Bien JP, et al (2014). Family members of patients with abdominal aortic aneurysms are at increased risk for aneurysms: analysis of 618 probands and their families from the Liege AAA Family Study. *Ann. Vasc. Surg.* 28: 787–797

125. van de Luijngaarden KM, Gonçalves FB, Hoeks SE, Majoor-Krakauer D, et al (2014). Familial abdominal aortic aneurysm is associated with more complications after endovascular aneurysm repair. *Journal of vascular surgery*, 59(2): 275-282.
126. Ryer EJ, Garvin RP, Thomas B, Kuivaniemi H, Franklin DP, Elmore JR (2015). Patients with familial abdominal aortic aneurysms are at increased risk for endoleak and secondary intervention following elective endovascular aneurysm repair. *Journal of vascular surgery*, 62(5): 1119-1124.
127. Sandford RM, Bown MJ, London NJ, Sayers RD (2007). The genetic basis of abdominal aortic aneurysms: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 33:381–390.
128. Shibamura H, Olson JM, van Vlijmen-Van Keulen C, et al (2004). Genome scan for familial abdominal aortic aneurysm using sex and family history as covariates suggests genetic heterogeneity and identifies linkage to chromosome 19q13. *Circulation*. 109:2103–2108.
129. Saratzis A, Bown MJ (2014). The genetic basis for aortic aneurysmal disease *Heart* 100:916-922.
130. Erhart P, Schiele S, Ginsbach P, Grond-Ginsbach C, Hakimi M, Böckler D, et al (2017). Gene Expression Profiling in Abdominal Aortic Aneurysms After Finite Element Rupture Risk Assessment. *J Endovasc Ther*. 24(6):861-869.
131. McColgan P, Peck GE, Greenhalgh RM, Sharma P (2009). The genetics of abdominal aortic aneurysms: a comprehensive meta-analysis involving eight candidate genes in over 16700 patients. *Int Surg* 94:350–358.
132. Biros E, Norman PE, Jones GT, et al (2011). Meta-analysis of the association between single nucleotide polymorphisms in TGF- β receptor genes and abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis* 219: 218–223.
133. Helgadottir A, Gretarsdottir S, Thorleifsson G, et al (2012). Apolipoprotein(a) genetic sequence variants associated with systemic atherosclerosis and coronary atherosclerotic burden but not with venous thromboembolism. *J Am Coll Cardiol* 60:722–729
134. Nikpay M, Goel A, Won HH, et al (2015). A comprehensive 1,000 Genomes based genome-wide association meta-analysis of coronary artery disease. *Nat Genet*. 47:1121–1130.
135. Biros E, Norman PE, Walker PJ, Nataatmadja M, West M, Golledge J (2011). A single nucleotide polymorphism in exon 3 of the kallikrein 1 gene is associated with large but not small abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis* 217:452–457.
136. Golledge J, Kuivaniemi H (2013). Genetics of abdominal aortic aneurysm *Curr Opin Cardiol* 28(3):290-6.

137. Chen X, Zheng C, He Y, et al (2015). Identification of key genes associated with the human abdominal aortic aneurysm based on the gene expression profile. *Mol Med Rep.* 12(6):7891-8.
138. Beckman JA & Creager MA (2006). in *Vascular Medicine: A Companion to Braunwald's Heart Disease* (eds Creager, M. A., Dzau, V. J., Loscalzo, J.) 560–569 (Elsevier Saunders,).
139. Telomeres Mendelian Randomization Collaboration (2017). Association between telomere length and risk of cancer and non- neoplastic diseases: a Mendelian randomization study. *JAMA Oncol.* 3: 636–651
140. Tsui JC. Experimental models of abdominal aortic aneurysms (2010). *Open Cardiovasc Med J* 4:221–30. 63
141. Daugherty A, Cassis LA. Mouse models of abdominal aortic aneurysms (2004). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:429–34.
142. Jones GT, Tromp G, Kuivaniemi H, et al (2017). Meta-analysis of genomewide association studies for abdominal aortic aneurysm identifies four new disease-specific risk loci. *Circ Res.* 120:341–353.
143. Bown MJ, Jones GT, Harrison SC, et al. (2011). CARDIoGRAM Consortium; Global BPgen Consortium; DIAGRAM Consortium; VRCNZ Consortium. Abdominal aortic aneurysm is associated with a variant in low-density lipoprotein receptor-related protein 1. *Am J Hum Genet.* 89:619–627.
144. Helgadóttir A, Thorleifsson G, Magnusson KP, et al (2008). The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. *Nat Genet.* 40:217–224.
145. Gretarsdóttir S, Baas AF, Thorleifsson G, et al (2010). Genome-wide association study identifies a sequence variant within the DAB2IP gene conferring susceptibility to abdominal aortic aneurysm. *Nat Genet.* 42:692– 697.
146. Harrison SC, Smith AJ, Jones GT, et al (2013). Aneurysm Consortium. Interleukin-6 receptor pathways in abdominal aortic aneurysm. *Eur Heart J* 34:3707–3716.
147. Jones GT, Bown MJ, Gretarsdóttir S, et al (2013). A sequence variant associated with sortilin-1 (SORT1) on 1p13.3 is independently associated with abdominal aortic aneurysm. *Hum Mol Genet* 22:2941–2947.
148. Bradley DT, Hughes AE, Badger SA, et al (2013). A variant in LDLR is associated with abdominal aortic aneurysm. *Circ Cardiovasc Genet.* 6:498–504.
149. Chaer RA, Vasoncelos R, Marone LK, Al-Khoury G, et al (2012). Synchronous and metachronous thoracic aneurysms in patients with abdominal aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg.* 56: 1261–1265.
150. Kuivaniemi H, Ryer EJ, Elmore JR, & Tromp G (2015). Understanding the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 13: 975–987.

151. Brownstein AJ, Brownstein AJ, Ziganshin BA, Kuivaniemi H, Body SC, et al (2017). Genes associated with thoracic aortic aneurysm and dissection: an update and clinical implications. *Aorta* 5: 11–20.
152. Tromp G, Weinsheimer S, Ronkainen A & Kuivaniemi H (2014). Molecular basis and genetic predisposition to intracranial aneurysm. *Ann. Med.* 46, 597–606.
153. Wild JB, Stather PW, Sylvius N, Choke E, et al. (2012). Low density lipoprotein receptor related protein 1 and abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 44(2):127-32.
154. Moxon JV, Behl-Gilhotra R, Morton SK, Krishna SM, et al (2015). Plasma Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 Concentration is not Associated with Human Abdominal Aortic Aneurysm Presence. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 50(4):466-73.
155. Chan CY, Chan YC, Cheuk BL, Cheng SW (2013). A pilot study on low-density lipoprotein receptor-related protein-1 in Chinese patients with abdominal aortic aneurysm *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 46(5):549-556.
156. Boucher P, Gotthardt M, Li WP, Anderson RG, Herz J (2003). LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science* 300: 329-32
157. Zhou L, Takayama Y, Boucher P, Tallquist MD, Herz J. LRP1 regulates architecture of the vascular wall by controlling PDGFRbeta-dependent phosphatidylinositol 3-kinase activation. *PLoS One.* 2009;4:e6922. doi: 10.1371/journal.pone.0006922
158. Bown MJ (2014). Genomic insights into abdominal aortic aneurysms. *The Annals of The Royal College of Surgeons of England*, 96(6): 405-414.
159. Kim HW, Stansfield BK (2017). Genetic and Epigenetic Regulation of Aortic Aneurysms *Biomed Res Int.* 2017: 7268521.
160. Pearce WH, Shively VP (2006). Abdominal aortic aneurysm as a complex multifactorial disease: Interactions of polymorphisms of inflammatory genes, features of autoimmunity, and current status of MMPs. *Ann NY Acad Sci.* 1085:117-132.
161. Hahn-Dantona E, Ruiz JF, Bornstein P, Strickland DK (2001). The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism. *J Biol Chem* 276:15498-503.
162. Liu L, Xu C, Hsieh JT, Gong J and Xie D (2016). DAB2IP in cancer. *Oncotarget* 7(4): 3766-3776,
163. Xie D, Gore C, Zhou J, Pong RC, et al (2009). DAB2IP coordinates both PI3K-Akt and ASK1 pathways for cell survival and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci US* 106(47): 19878-19883
164. Zhang H, He Y, Dai S, Xu Z, et al (2008). AIP1 functions as an endogenous inhibitor of VEGFR2-mediated signaling and inflammatory angiogenesis in mice. *J Clin Invest* 118: 3904- 3916.

165. Chen H, Tu SW and Hsieh JT (2005). Down-regulation of human DAB2IP gene expression mediated by polycomb Ezh2 complex and histone deacetylase in prostate cancer. *J Biol Chem* 280(23): 22437-22444.
166. Smits M, van Rijn S, Hulleman E, Biesmans D, et al (2012). EZH2-regulated DAB2IP is a medulloblastoma tumor suppressor and a positive marker for survival. *Clin Cancer Res* 18(15): 4048-4058.
167. Toghiani BJ, Saratzis A, Harrison SC, Verissimo AR, et al (2015). The potential role of DNA methylation in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis*;241:121–129.
168. Toghiani BJ, Saratzis A, Freeman PJ, Sylvius N, Bown MJ (2018). UKAGS collaborators. SMYD2 promoter DNA methylation is associated with abdominal aortic aneurysm (AAA) and SMYD2 expression in vascular smooth muscle cells. *Clin Epigenetics*. 10:29.
169. Lee KWK and Pausova Z (2013). Cigarette smoking and DNA methylation. *Frontiers in Genetics* 4:132
170. Breitling LP, Yang R, Korn B, Burwinkel B, and Brenner H (2011). Tobacco-smoking-related differential DNA methylation: 27K discovery and replication,” *American Journal of Human Genetics* 88 (4): 450–457.
171. Mercer BA, Wallace AM, Brinckerhoff CE, and D’Armiento JM (2009). Identification of a cigarette smoke-responsive region in the distal MMP-1 promoter, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 40 (1):4–12.
172. Satta R, Maloku E, Zhubi A et al (2008). Nicotine decreases DNA methyltransferase 1 expression and glutamic acid decarboxylase 67 promoter methylation in GABAergic interneurons, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(42): 16356–16361.
173. Joehanes R, Just AC, Marioni RE et al. (2016). Epigenetic signatures of cigarette smoking. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, vol. 9(5): 436–447.
174. Tsaprouni LG, Yang TP, Bell J et al. (2014). Cigarette smoking reduces DNA methylation levels at multiple genomic loci but the effect is partially reversible upon cessation. *Epigenetics*, 9(10): 1382–1396.
175. Ambatipudi S, Cuenin C, Hernandez-Vargas H et al (2016). Tobacco smoking-associated genome-wide DNA methylation changes in the EPIC study. *Epigenomics* 8(5):599– 618.
176. Bhamidipati CM, Whatling CA, Mehta GS et al. (2014). 5-Lipoxygenase pathway in experimental abdominal aortic aneurysms, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 34(12): 2669–2678,
177. Zhao L, Moos MPW, Grabner R et al. (2004). The 5-lipoxygenase pathway promotes pathogenesis of hyperlipidemia-dependent aortic aneurysm, *Nature Medicine* 10(9):966–973.

178. Jones PA, Taylor SM, and Wilson VL (1983). Inhibition of DNA methylation by 5-azacytidine, *Recent Results in Cancer Research* 84: 202–211.
179. Wilson VL and Jones PA (1983). DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells, *Science*, 220(4601):1055–1057.
180. Jung M. and Pfeifer GP. (2015). Aging and DNA methylation,” *BMC Biology*, 13(1), 7.
181. Hiltunen MO, Turunen MP, Hakkinen TP et al (2002). DNA hypomethylation and methyltransferase expression in atherosclerotic lesions, *Vascular Medicine*, 7(1): 5-11.
182. Lin X, Zhang W, Lu Q, et al (2016). Effect of MTHFR gene polymorphism impact on atherosclerosis via genome-wide methylation, *Medical Science Monitor*, 22: 341–345,
183. Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, and Issa JP (1998). Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Advances in Cancer Research*, 72: 141–169,
184. El-Sammak M., Kandil M., El Hifni S., Hosni R., and Ragab M. (2004). Elevated plasma homocysteine is positively associated with age independent of C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in selected Egyptian subjects,” *International Journal of Medical Sciences*, 1(3):181–192.
185. Spotila LD, Jacques PF, Berger PB, Ballman KV, et al (2003). Age dependence of the influence of methylenetetrahydrofolate reductase genotype on plasma homocysteine level. *American journal of epidemiology*, 158(9): 871-877.
186. Straßburg, Krems, Lührmann, Hartmann, & Neuhäuser-Berthold. (2004). Effect of age on plasma homocysteine concentrations in young and elderly subjects considering serum vitamin concentrations and different lifestyle factors. *International journal for vitamin and nutrition research*, 74(2): 129-136.
187. Horvath, S. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome biology*, 14(10): 3156.
188. Ryer, E., Ronning, K., Erdman, R., Schworer, C., et al (2015). The potential role of DNA methylation in abdominal aortic aneurysms. *International journal of molecular sciences*, 16(5): 11259-11275.
189. Stenvinkel P, Karimi M, Johansson S, Axelsson J, et al (2007). Impact of inflammation on epigenetic DNA methylation—a novel risk factor for cardiovascular disease?. *Journal of internal medicine*, 261(5): 488-499.
190. Kochanek S, Radbruch A, Tesch H, Renz D, Doerfler W (1991). DNA methylation profiles in the human genes for tumor necrosis factors alpha and beta in subpopulations of leukocytes and in leukemias. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(13): 5759.

191. Liu ZH, Chen LL, Deng XL et al (2012). Methylation status of CpG sites in theMCP-1 promoter is correlated to serumMCP-1 in type 2 diabetes, *Journal of Endocrinological Investigation*, 35(6): 585–589.
192. Sullivan KE, Reddy ABM, Dietzmann K, Suriano AR, et al. (2007). Epigenetic regulation of tumor necrosis factor alpha. *Molecular and cellular biology*, 27(14): 5147-5160.
193. Wang J, Jiang Y, Yang A, Sun W, et al (2013). Hyperhomocysteinemia-induced monocyte chemoattractant protein-1 promoter DNA methylation by nuclear factor- κ B/DNA methyltransferase 1 in apolipoprotein E–deficient mice. *BioResearch open access*, 2(2): 118-127.
194. Wessels I, Fleischer D, Rink L, Uciechowski P (2010). Changes in chromatin structure and methylation of the human interleukin-1 β gene during monopoiesis. *Immunology*, 130(3): 410-417.
195. Makino J, Ogasawara R, Kamiya T, Hara H et al. (2016). Royal jelly constituents increase the expression of extracellular superoxide dismutase through histone acetylation in monocytic THP-1 cells. *Journal of Natural Products*, 79(4): 1137-1143.
196. Soe NN, Sowden M, Baskaran P, Kim Y, et al (2013). Acetylation of cyclophilin A is required for its secretion and vascular cell activation. *Cardiovascular research*, 101(3): 444-453.
197. Moodie FM, Marwick JA, Anderson CS, Szulakowski P, et al (2004). Oxidative stress and cigarette smoke alter chromatin remodeling but differentially regulate NF- κ B activation and proinflammatory cytokine release in alveolar epithelial cells. *The FASEB Journal*, 18(15): 1897-1899.
198. Pons D, de Vries FR, van den Elsen PJ, Heijmans BT, Quax PH, Jukema JW (2009). Epigenetic histone acetylation modifiers in vascular remodelling: new targets for therapy in cardiovascular disease. *European heart journal*, 30(3): 266-277.
199. Esteller M (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet*. 12(12): 861-74.
200. Mattick JS, Makunin IV (2006). Non-coding RNA. *Hum Mol Genet*. 15(suppl_1), R17-R29
201. Horvitz HR, Sulston JE (1980). Isolation and genetic characterization of cell-lineage mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 96:435–454.
202. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 75:843–854.
203. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993; 75:855–862.
204. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, et al (2000). The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 403:901–906.

205. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, et al (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 408:86–89.
206. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391:806–811.
207. Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*. 286:950–952.
208. Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP- dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*. 101:25–33.
209. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ (2000). An RNA-directed nuclease mediates post- transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 404:293–296.
210. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res*. 34:D140–144.
211. Bartel DP (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116:281–297.
212. Hammond SM (2015). An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev*. 87:3-14.
213. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*. 14:1902–1910.
214. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 294:853–858.
215. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 294:858–862.
216. Lee RC, Ambros V (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 294:862–864.
217. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, et al (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23:4051–4060.
218. Bortolin-Cavaille ML, Dance M, Weber M, Cavaille J (2009). C19MC microRNAs are processed from introns of large Pol-II, non-protein-coding transcripts. *Nucleic Acids Res*. 37:3464–3473.
219. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 10: 1957–1966.
220. Kim VN, Han J, Siomi MC (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10:126–139.
221. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, et al (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 425:415–419.

222. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 21:4663–4670.
223. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 18:3016–3027.
224. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, et al (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature.* 432:235–240.
225. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature.* 432:231–235.
226. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 17:3011–3016.
227. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science.* 303: 95–98.
228. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA.* 10:185–191.
229. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science.* 293:834–838.
230. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, et al (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell.* 106: 23–34.
231. Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* 15:2654–2659.
232. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell.* 123:631–640.
233. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature.* 436:740–744.
234. Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science.* 293:1146–1150.
235. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias, *Cell* 115 209–216.
236. Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP, Zamore PD (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell.* 123:607–620.
237. Ye X, Huang N, Liu Y, Paroo Z, Huerta C, Li P, et al (2011). Structure of C3PO and mechanism of human RISC activation. *Nat Struct Mol Biol.* 18: 650–657

238. Robb GB, Rana TM (2007). RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading. *Mol Cell*. 26: 523–537.
239. Liu X, Jin DY, McManus MT, Mourelatos Z (2012). Precursor microRNA-programmed silencing complex assembly pathways in mammals. *Mol Cell*. 46: 507–517.
240. Maniataki E, Mourelatos Z (2005). A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA, *Genes Dev*. 19: 2979–2990.
241. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing, *Cell* 123: 631–640.
242. Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J (2009). A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 7(4):147-54.
243. Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E (2008). Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 132: 9–14.
244. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9:102–114.
245. Pillai RS, Artus CG, Filipowicz W (2004). Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis, *RNA-Publ. RNA Soc*. 10: 1518–1525.
246. Richard WC, Erik JS (2009). Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs, *Cell* 136: 642–655.
247. Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC (2002). Cleavage of scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA, *Science* 297: 2053–2056.
248. Tang G, Reinhart BJ, Bartel DP, Zamore PD (2003). A biochemical framework for RNA silencing in plants, *Genes Dev*. 17: 49–63.
249. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115: 787-98
250. Tay Y, Zhang J, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I (2008). MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* 455(7216): 1124–8.
251. Carthew RW, Sontheimer EJ (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 136(4):642–55.
252. Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 27:91–105,
253. Hibio N, Hino K, Shimizu E, Nagata Y, Ui-Tei K (2012). Stability of miRNA 5'terminal and seed regions is correlated with experimentally observed miRNA mediated silencing efficiency. *Sci Rep* 2: 996.

254. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120:15–20
255. Parker R, Sheth U (2007). P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* 25: 635–646.
256. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318: 1931–1934
257. Yang, Jennifer X., Raphael H. Rastetter, and Dagmar Wilhelm. "Non-coding RNAs: an introduction." *Non-coding RNA and the Reproductive System*. Springer, Dordrecht, 2016. 13–32.
258. Place RF, Li LC, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R (2008). MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:1608–1613.
259. Huang V, Place RF, Portnoy V, Wang J, et al (2012). Upregulation of cyclin B1 by miRNA and its implications in cancer. *Nucleic Acids Res* 40: 1695–1707
260. Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Group, R.G.E.R., Genome Science, G. et al (2005). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 309: 1559–1563
261. Taft RJ, Kaplan CD, Simons C, Mattick JS (2009c). Evolution, biogenesis and function of promoter associated RNAs. *Cell Cycle* 8: 2332–2338
262. Wei JW, Huang K, Yang C, Kang CS (2017). Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review). *Oncol Rep.* 37(1): 3-9.
263. Nilsen TW (2007). Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet* 23: 243-9.
264. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P et al (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433: 769-73.
265. He L & Hannon GJ (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Rev. Genet.* 5: 522–531.
266. Mendell JT (2005). MicroRNAs: critical regulators of development, cellular physiology and malignancy. *Cell Cycle* 4: 1179–1184
267. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD et al (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2999-3004.
268. Barbarotto E, Schmittgen TD, Calin GA (2008). MicroRNAs and cancer: profile, profile, profile. *Int J Cancer.* 122:969–977.
269. He L, Thomson JM, Hemann MT et al (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435: 828-33.
270. Lu J, Getz G, Miska EA et al (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435: 834-8.

271. Michael MZ, SM OC, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ (2003). Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 1: 882-91
272. Fernandez -Hernando C, Ramirez CM, Goedeke L, Suarez Y (2013). MicroRNAs in metabolic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 33: 178–185.
273. Ardekani AM, Naieni MM (2010). MicroRNAs in Human Diseases. *Avicenna J Med Biotech* 2(4):161-179.
274. Chen WL, Lin JW & Huang HJ (2008). SCA8 mRNA expression suggests an antisense regulation of KLHL1 and correlates to SCA8 pathology. *Brain Res.* 1233, 176–184.
275. Albinsson S, Suarez Y, Skoura A, Offermanns S et al (2010). MicroRNAs are necessary for vascular smooth muscle growth, differentiation, and function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 6: 1118–1126.
276. Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, et al (2007). Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell* 129: 303–317
277. Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y et al. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nature Med.* 13, 486–491 (2007).
278. Van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams A. et al (2006). A signature pattern of stressresponsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103: 18255–18260.
279. Fang Y, Shi C, Manduchi E, Civelek M, Davies PF (2010). MicroRNA-10a regulation of proinflammatory phenotype in athero-susceptible endothelium *in vivo* and *in vitro*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107: 13450–13455.
280. Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry E et al (2009). miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature* 460: 705–710.
281. Nicoli S, Standley C, Walker P, Hurlstone A, et al (2010). MicroRNA-mediated integration of haemodynamics and Vegf signalling durin angiogenesis. *Nature* 464: 1196–1200.
282. Ji R, Cheng Y, Yue J, Yang J, Liu X, et al (2007). MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circ. Res.* 100: 1579–1588.
283. Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, et al (2006). A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nature Genet.* 38: 813–818.
284. Sethupathy P, Borel C, Gagnebin M, Grant GR et al (2007). Human microRNA-155 on chromosome 21 differentially interacts with its polymorphic target in the AGTR1 3' untranslated region: a mechanism for functional single-nucleotid polymorphisms related to phenotypes. *Am. J.Hum. Genet.* 81: 405–413.

285. Fu XM, Zhou YZ, Cheng Z, Liao XB, Zhou XM, et al (2015). MicroRNAs: novel players in aortic aneurysm. *BioMed research international*, 2015
286. Maegdefessel L, Spin JM, Raaz U, Eken SM, et al. (2014). miR-24 limits aortic vascular inflammation and murine abdominal aneurysm development. *Nature communications*, 5: 5214.
287. Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, et al. (2008). The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Developmental cell*, 15(2): 261-271.
288. Zhu J, Chen T, Yang L, Li Z, et al. (2012). Regulation of microRNA-155 in atherosclerotic inflammatory responses by targeting MAP3K10. *PloS one*, 7(11): e46551.
289. Boon RA, Seeger T, Heydt S, Fischer A, et al. (2011). MicroRNA-29 in aortic dilation: implications for aneurysm formation. *Circulation research*, 109(10): 1115-1119.
290. Zampetaki A, Attia R, Mayr U, Gomes RS, et al. (2014). Role of miR-195 in aortic aneurysmal disease. *Circulation research*, 115(10): 857-866.
291. Liao XB, Zhang ZY, Yuan K, Liu Y, et al (2013). MiR-133a modulates osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells. *Endocrinology*, 154(9): 3344-3352.
292. Cui RR, Li SJ, Liu LJ, Yi L, et al. (2012). MicroRNA-204 regulates vascular smooth muscle cell calcification in vitro and in vivo. *Cardiovascular research*, 96(2): 320-329.
293. Boettger T, Beetz N, Kostin S, Schneider J, Krüger M, Hein L, Braun T. (2009). Acquisition of the contractile phenotype by murine arterial smooth muscle cells depends on the Mir143/145 gene cluster. *The Journal of clinical investigation*, 119(9): 2634-2647.
294. Davis-Dusenbery BN, Wu C, Hata A (2011). Micromanaging vascular smooth muscle cell differentiation and phenotypic modulation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31(11): 2370-2377.
295. Pahl MC, Derr K, Gäbel G, Hinterseher I, et al (2012). MicroRNA expression signature in human abdominal aortic aneurysms. *BMC Med Genomics*. 5:25.
296. Kin K, Miyagawa S, Fukushima S, Shirakawa Y, Torikai K, Shimamura K, et al (2012). Tissue- and plasma-specific microRNA signatures for atherosclerotic abdominal aortic aneurysm. *J Am Heart Assoc*. 1(5):e000745.
297. Stather PW, Sylvius N, Sidloff DA, Dattani N, et al (2015). Identification of microRNAs associated with abdominal aortic aneurysms and peripheral arterial disease. *Br J Surg* 102(7): 755-66.
298. Nordon IM, Hinchliffe RJ, Loftus IM, Thompson MM (2011). Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Nat Rev Cardiol* 8(2): 92-102.
299. Bradley DT, Badger SA, McFarland M, Hughes AE (2016). Abdominal aortic aneurysm genetic associations: mostly false? A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 51(1): 64-75.

300. Galora S, Saracini C, Pratesi G, Sticchi E, et al (2015). Association of rs1466535 LRP1 but not rs3019885 SLC30A8 and rs6674171 TDRD10 gene polymorphisms with abdominal aortic aneurysm in Italian patients. *J Vasc Surg.* 61(3):787-92.
301. Boucher P, Li WP, Matz RL, Takayama Y, et al (2007). LRP1 functions as an atheroprotective integrator of TGFbeta and PDGF signals in the vascular wall: implications for Marfan syndrome. *PLoS One* 2: e448.
302. Moxon JV, Liu D, Wong G, Weir JM, et al (2014). Comparison of the serum lipidome in patients with abdominal aortic aneurysm and peripheral artery disease. *Circ Cardiovasc Genet* 7: 71e9.
303. Morris DR, Biros E, Cronin O, Kuivaniemi H, Golledge J (2014). The association of genetic variants of matrix metalloproteinases with abdominal aortic aneurysm: a systematic review and meta-analysis. *Heart.* 100(4): 295-302.
304. Chan CY, Chan YC, Cheuk BL, Cheng SW (2017). Clearance of matrix metalloproteinase-9 is dependent on low-density lipoprotein receptor-related protein-1 expression downregulated by microRNA-205 in human abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg.* 65(2): 509-520.
305. Tamarina NA, McMillan WD, Shively VP, Pearce WH (1997). Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in aneurysms and normal aorta. *Surgery.* 122(2):264-71; discussion 271-2.
306. McMillan WD, Tamarina NA, Cipollone M, Johnson DA, Parker MA, Pearce WH (1997). Size matters: the relationship between mmp-9 expression and aortic diameter. *Circulation.* 96(7): 2228-32.
307. Crowther M, Goodall S, Jones JL, Bell PR, Thompson MM (2000). Increased matrix metalloproteinase 2 expression in vascular smooth muscle cells cultured from abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 32: 575–583.
308. Nishimura K, Ikebuchi M, Kanaoka Y, Ohgi S, et al (2003). Relationships between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in the wall of abdominal aortic aneurysms. *Int Angiol.* 22(3): 229-38.
309. Golledge J, Tsao PS, Dalman RL, Norman PE (2008). Circulating markers of abdominal aortic aneurysm presence and progression. *Circulation.*; 118(23):2382-92.
310. Stather PW, Sidloff DA, Dattani N, Gokani VJ, et al (2014). Meta-analysis and metaregression analysis of biomarkers for abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg.* 101(11):1358-72.
311. Tang W, Yao L, Hoogeveen RC, Alonso A, et al (2018). The Association of Biomarkers of Inflammation and Extracellular Matrix Degradation with the Risk of Abdominal Aortic Aneurysm: The ARIC Study *Angiology* 1-11.

312. Lenk GM, Tromp G, Weinsheimer S, Gatalica Z, Berguer R, Kuivaniemi H (2007). Whole genome expression profiling reveals a significant role for immune function in human abdominal aortic aneurysms. *BMC Genomics* 8: 237.
313. Simon JA, Lange CA (2008). Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutat Res* 647(1-2): 21-9.
314. Min J, Zaslavsky A, Fedele G, McLaughlin SK, et al (2010). An oncogene-tumor suppressor cascade drives metastatic prostate cancer by coordinately activating Ras and nuclear factor-kappaB. *J Nat Med* 16(3): 286-94.
315. Song H, Bu G (2009). MicroRNA-205 inhibits tumor cell migration through down-regulating the expression of the LDL receptor-related protein 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 388(2): 400-5.
316. Lo UG, Pong RC, Yang D, Gandee L, et al (2018). IFN-r-induced IFIT5 promotes epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer via microRNA processing. *Cancer research* 2207.
317. Kovacic JC, Mercader N, Torres M, Boehm M, Fuster V (2012). Epithelial-to-mesenchymal and endothelial-to-mesenchymal transition: from cardiovascular development to disease. *Circulation* 125(14): 1795-808.