



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Τα microRNAs miR-16 και miR-511 ως βιοδείκτες στον ορό ασθενών με
διπολική διαταραχή**

Τάσιου Μαρία

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Χατζηευθυμίου Αποστολία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας, Επιβλέπουσα
- Σπελέτας Ματθαίος, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας
- Μπόγδανος Δημήτριος, Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως
μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στις
Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής

Λάρισα, Φεβρουάριος 2024



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

**MicroRNAs miR-16 and miR-511 as biomarkers in serum of patients with
bipolar disorder**

By
Tasiou Maria

Advisory Thesis committee:

- Hatziefthimiou Apostolia, Associate Professor of Medical Physiology, Supervisor
- Speletas Matthaïos, Professor of Medical Immunology
- Bogdanos Dimitrios, Professor of Internal Medicine and Autoimmune Diseases

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Clinical Applications of Molecular Medicine

Larisa, February 2024

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας σε συνεργασία με το Εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Ιατρικής Φυσιολογίας κα. Χατζηευθυμίου Αποστολίας. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω θερμά για την καθοδήγηση, την εμπιστοσύνη και αμέριστη υποστήριξη που μου έδειξε όλο αυτό το διάστημα, όπως και για τις πολύτιμες συμβουλές και προβληματισμούς που έθεσε, δίνοντας ένα κίνητρο για κριτική σκέψη καθ'όλη τη διάρκεια της επιστημονικής έρευνας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Υγιεινής και Επιδημιολογίας κ. Χατζηχριστοδούλου Χρήστο για την καταλυτική συμβολή του στην πραγματοποίηση της συγκεκριμένης μελέτης στο εργαστήριο της Μοριακής Επιδημιολογίας, όπως και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ψυχιατρικής κ. Χριστοδούλου Νικόλαο, διευθυντή της Ψυχιατρικής Κλινικής του ΠΓΝ Λάρισας για τη βοήθεια και τις συμβουλές του.

Επίσης, ευχαριστώ πολύ τον Καθηγητή Ιατρικής Ανοσολογίας κ. Σπελέτα Ματθαίο για το ενδιαφέρον του και τη συμμετοχή στην τριμελή επιτροπή και τον πρόεδρο του ΠΜΣ κ. Μπόγδανο Δημήτριο, Καθηγητή Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων, που δέχτηκε να γίνει μέλος της τριμελούς επιτροπής μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του εργαστηρίου, που βοήθησαν στην πραγματοποίηση των πειραμάτων και την απόκτηση νέων γνώσεων, την κα. Κυρίτση Μαρία, τον κ. Βόντα Αλέξανδρο, τη Δαδούλη Κατερίνα, την Αλεξία, την Κωνσταντίνα, την Εύη, την Εύα, τον Αχιλλέα, τον Ζαφείρη. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις καθηγήτριες Ασπροδίνη Ευτυχία και Βασιλάκη Άννα του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας για τις συμβουλές και χρήσιμες γνώσεις που μετέδωσαν καθ'όλη τη διάρκεια του προγράμματος, όπως και τον Μισέλ για τη βοήθειά του.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένειά μου γιατί αυτό το ταξίδι έφτασε στον προορισμό χάρη στην αμέριστη στήριξή τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	6
Abstract	7
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Σύνθεση των miRNAs.....	10
1.1.1 Βιογένεση των microRNAs.....	11
1.1.2 Μεταγραφή των miRNAs.....	12
1.1.3 Επεξεργασία και ωρίμανση των microRNAs.....	12
1.1.4 Μηχανισμοί δράσης των miRNAs	14
1.2 Απελευθέρωση των microRNAs στον εξωκυττάριο χώρο & βιολογικά υγρά.....	17
1.2.1 Μηχανισμοί απελευθέρωσης των microRNAs στο εξωκυττάριο περιβάλλον.....	17
1.2.2 Τρόποι απελευθέρωσης και μεταφοράς των cimiRNAs στα βιολογικά υγρά.....	19
1.2.3 Πρόσληψη των cimiRNAs	22
1.3 Ο ρόλος των miRNAs στο ΚΝΣ	22
<i>I. Ο ρόλος των microRNAs στη ρύθμιση της νευρωνικής επιβίωσης</i>	<i>25</i>
<i>II. Ο ρόλος των microRNAs σε διαδικασίες μάθησης και μνήμης</i>	<i>25</i>
<i>III. Ρύθμιση της συναπτικής ανάπτυξης, ωρίμανσης ή/και πλαστικότητας από τα microRNAs</i>	<i>26</i>
1.3.1 Τα miRNAs ως βιοδείκτες και συσχέτιση με ασθένειες του ΚΝΣ.....	28
1.4 Συναισθηματικές διαταραχές	29
1.4.1 Μεταβολές της έκφρασης των cimiRNAs στις συναισθηματικές διαταραχές.....	31
1.4.2 Ο πιθανός ρόλος των microRNAs στην παθοφυσιολογία των συναισθηματικών διαταραχών .	35
<i>I. Ο ρόλος των microRNAs στη νευροδιαβίβαση</i>	<i>36</i>
<i>II. Ο ρόλος των microRNAs στη συναπτική πλαστικότητα</i>	<i>37</i>
<i>III. Ο ρόλος των microRNAs σε αποκρίσεις στρες</i>	<i>38</i>
<i>IV. Ο ρόλος των microRNAs στη νευροφλεγμονή</i>	<i>39</i>
<i>V. microRNAs και επιγενετικοί μηχανισμοί</i>	<i>40</i>
1.4.3 Ο ρόλος του miR-16 και του miR-511 στις συναισθηματικές διαταραχές	41
Σκοπός	45
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	46
ΥΛΙΚΟ	46
2. ΜΕΘΟΔΟΙ	50
2.1 Συλλογή δειγμάτων	50
2.2 Απομόνωση μικρών μορίων RNA από δείγματα ορού	50
2.3 Προσδιορισμός των επιπέδων (συγκέντρωσης) των μικρών μορίων RNA στα δείγματα	52
2.4 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription - RT)	54
2.5 Ψηφιακή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης– Digital Polymerase Chain Reaction (dPCR) ..	55
2.6 Στατιστική ανάλυση δεδομένων.....	60

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	61
3.1 Δημογραφικά, κοινωνικο-οικονομικά και ιατρικά στοιχεία υγιών και ασθενών.....	61
3.2 Επίπεδα ολικού RNA ορού	65
3.3 Ποιοτικός έλεγχος των δειγμάτων.....	67
3.4 Προσδιορισμός των miR-16 και miR-511 στον ορό υγιών ατόμων και ασθενών με διπολική διαταραχή	69
3.4.1 Επίπεδα miR-16.....	69
3.4.2 Επίπεδα miR-511.....	72
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	76
<i>Κοινωνικο-οικονομικά και δημογραφικά στοιχεία.....</i>	<i>76</i>
<i>Επίπεδα miR-16 και miR-511 στον ορό ασθενών και υγιών ατόμων</i>	<i>78</i>
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	84

Περίληψη

Η διπολική διαταραχή αποτελεί μία από τις κυριότερες εκπροσώπους των συναισθηματικών διαταραχών, που πλήττουν εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως και εμφανίζουν αυξητική τάση τα τελευταία χρόνια. Οι ασθενείς με διπολική διαταραχή αδυνατούν να ανταποκριθούν αποτελεσματικά στις υπάρχουσες θεραπευτικές αγωγές και αυτό καθιστά αναγκαίο την εύρεση βιοδεικτών που θα συνέβαλλαν σε μία ακριβή και στοχευμένη θεραπεία της νόσου.

Μια πληθώρα microRNAs, που εντοπίζονται σε βιολογικά υγρά, έχουν συσχετισθεί με την εμφάνιση συναισθηματικών διαταραχών, κυρίως της κατάθλιψης, στοχεύοντας μόρια mRNA που συμμετέχουν σε μονοπάτια παθογένειας τέτοιων ασθενειών. Στα πλαίσια αυτά, σχεδιάστηκε μία μελέτη ασθενών – μαρτύρων για την διερεύνηση δύο υποψήφιων microRNA, των miR-16 και miR-511, ως βιοδείκτες σε ασθενείς με διπολική διαταραχή. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν τα επίπεδα του miR-16 και miR-511 στον ορό 24 ασθενών με διπολική διαταραχή και 21 υγιών ατόμων με τη μέθοδο της Ψηφιακής Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης.

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι τα επίπεδα του miR-16 ήταν σημαντικά μειωμένα στην ομάδα των ασθενών συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (6.95 ± 6.62 και 15.42 ± 9.05 στους ασθενείς και υγιείς αντίστοιχα, $p=0.004$). Τα επίπεδα του miR-16 δεν εμφάνισαν κάποια σημαντική συσχέτιση με την ηλικία, το BMI, τα σκορ των MDQ και MDI, τη διάρκεια και την ηλικία έναρξης της νόσου των ασθενών.

Το miR-511 ανιχνεύτηκε στον ορό 7 ασθενών (miR-511 positive patients, 33% των ασθενών) και 9 υγιών ατόμων (miR-511 positive control, 45% των υγιών ατόμων), ενώ δεν ανιχνεύτηκε στον ορό 9 ασθενών (miR-511 negative patients, 57 % των ασθενών) και 10 υγιών ατόμων (miR-511 negative control, 50 % των υγιών ατόμων). Στο σύνολο των δειγμάτων, τα επίπεδα του miR-511, είναι αυξημένα στους ασθενείς σε σύγκριση με τους υγιείς, χωρίς αυτή η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική (1.61 ± 4.43 και 0.0011 ± 0.0015 στους ασθενείς και υγιείς αντίστοιχα, $p=0.36$). Εντούτοις, οι miR-511 positive patients παρουσίασαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα του miR-511 στο ορό σε σύγκριση με την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου (miR-511 positive control) (3.69 ± 6.34 και 0.0023 ± 0.0015 στους ασθενείς και υγιείς αντίστοιχα, $p=0.0002$). Τέλος, συγκρίθηκαν τα ιατρικά στοιχεία μεταξύ των miR-511 negative ασθενών και miR-511 positive ασθενών και βρέθηκε ότι οι miR-511 positive ασθενείς έχουν σημαντικά υψηλότερα σκορ στο ερωτηματολόγιο Διαταραχής του Θυμικού (MDQ) σε σχέση με τους miR-511 negative ασθενείς ($p=0.03$).

Συμπερασματικά, με βάση τα παραπάνω ευρήματα τόσο το miR-16 όσο και το miR-511 φαίνεται να αποτελούν πολλά υποσχόμενους βιοδείκτες της διπολικής διαταραχής.

Abstract

Bipolar disorder is one of the main representatives of affective disorders, affecting millions of people worldwide and showing an increasing tendency in recent years. Patients with bipolar disorder fail to respond effectively to existing treatments and this makes it necessary to find biomarkers that would contribute to an accurate and targeted treatment of the disease. A multitude of microRNAs, found in biological fluids, have been associated with the occurrence of affective disorders, mainly depression, targeting mRNA molecules involved in the pathogenesis of such diseases. In this context, a case-control study was designed to investigate two candidate microRNAs, miR-16 and miR-511, as biomarkers in patients with bipolar disorder. Specifically, the levels of miR-16 and miR-511 were studied in the serum of 24 patients with bipolar disorder and 21 healthy individuals using the Digital Polymerase Chain Reaction method.

The results of the study showed that miR-16 levels were significantly decreased in the patient group compared to the control group (6.95 ± 6.62 and 15.42 ± 9.05 in patients and control group respectively, $p=0.004$). MiR-16 levels did not show any significant correlation with age, BMI, MDQ and MDI scores, duration and age of disease onset of the patients.

MiR-511 was detected in the serum of 7 patients (miR-511 positive patients, 33% of patients) and 9 healthy individuals (miR-511 positive control, 45% of control group), while it was not detected in the serum of 9 patients (miR-511 negative patients, 57 % of patients) and 10 healthy subjects (miR-511 negative control, 50 % of control group). In all samples, miR-511 levels are increased in patients compared to healthy individuals, without this difference being statistically significant (1.61 ± 4.43 and 0.0011 ± 0.0015 in patients and control group respectively, $p=0.36$). However, miR-511 positive patients showed significantly increased levels of miR-511 in serum compared to the corresponding control group (miR-511 positive control) (3.69 ± 6.34 and 0.0023 ± 0.0015 in patients and control group respectively, $p=0.0002$). Finally, the medical data between miR-511 negative patients and miR-511 positive patients were compared and it was found that miR-511 positive patients have significantly higher Mood Disorder Questionnaire (MDQ) scores than miR-511 negative patients ($p=0.03$).

In conclusion, based on the above findings both miR-16 and miR-511 appear to be promising biomarkers of bipolar disorder.

Λέξεις – Κλειδιά: microRNAs, miR-16, miR-511, βιοδείκτες, κυκλοφορούντες βιοδείκτες, διπολική διαταραχή, συναισθηματικές διαταραχές

Keywords: microRNAs, miR-16, miR-511, biomarkers, circulating biomarkers, bipolar disorder, affective disorders

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

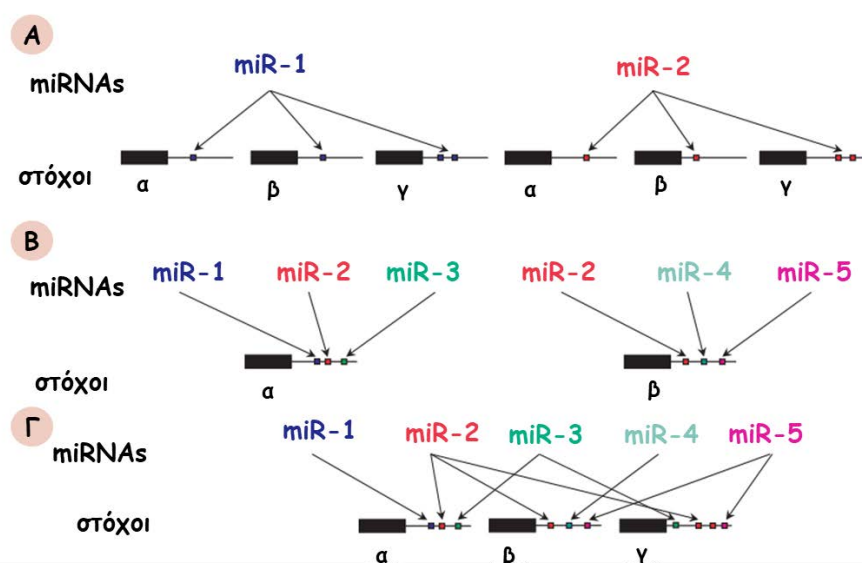
Οι διαταραχές του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα νευροεκφυλιστικών, ογκολογικών, φλεγμονωδών και αναπτυξιακών καταστάσεων. Η παρουσία μηχανισμών που έχουν προκύψει εξελικτικά για την απομόνωση και προστασία του εγκεφάλου καθιστά δύσκολη την άμεση μελέτη του εγκεφαλικού ιστού και την έγκαιρη διάγνωση των παθήσεων που προσβάλλουν το ΚΝΣ. Η ανάπτυξη και αξιοποίηση εναλλακτικών δεικτών είναι λοιπόν καίριας σημασίας για τη διάγνωση τέτοιων νόσων και την ομαδοποίηση των ασθενών σε υποπληθυσμούς με στόχο την πρόγνωση και την εξατομικευμένη θεραπεία όπως και την κατανόηση της αιτιοπαθολογίας τους (Rao et al., 2013).

Η ραχδαία εξέλιξη των τεχνολογιών οδήγησε στην ανάπτυξη νέων μεθόδων για την ανακάλυψη βιοδεικτών. Οι εξελίξεις στον τομέα της έρευνας των μη-κωδικοποιούντων RNA, των λειτουργικών δηλαδή μορίων RNA που δεν μεταφράζονται σε πρωτεΐνες (συνιστούν το 95% του συνόλου του γονιδιώματος), έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας καθώς τα μόρια αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για προγνωστικούς και διαγνωστικούς σκοπούς (Ying et al., 2008).

Στην ομάδα των μη-κωδικοποιούντων RNA ανήκουν τα εκτενώς μέχρι σήμερα μελετημένα microRNAs (miRNAs), καθώς ο βιολογικός τους ρόλος είναι σημαντικός για την πραγματοποίηση ποικίλων κυτταρικών διαδικασιών. Μάλιστα, η παρουσία αυτών των μορίων σε περιφερικούς ιστούς (π.χ. αίμα) φαίνεται πως μπορεί να αξιοποιηθεί για την «αποτύπωση» των αλλαγών που υφίστανται τα κύτταρα από τα οποία προέρχονται, καθιστώντας τα μόρια δυνητικούς βιοδείκτες.

Τα miRNAs είναι μικρά, μονόκλωνα μόρια RNA μεγέθους 20-23 νουκλεοτιδίων που προκύπτουν από τη μεταγραφή γονιδίων που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες (Nguyen et al., 2022). Τα δύο πρώτα miRNAs ανακαλύφθηκαν το 1993 και το 2000, στον νηματοειδή σκώληκα *C. Elegans*. Τα πρώτα αυτά miRNAs βρέθηκε ότι συμμετέχουν σε αναπτυξιακές διαδικασίες, ελέγχοντας τη μοίρα των κυττάρων και καθοδηγώντας τη μετάβαση από το ένα αναπτυξιακό στάδιο της νύμφης στο επόμενο (Ambros et al., 2018). Έκτοτε προσδιορίστηκαν χιλιάδες miRNAs σε πολλά είδη και έως σήμερα καταχωρούνται νέα μόρια στην κύρια βάση δεδομένων για miRNAs, την miRBase (<http://www.mirbase.org>). Σύμφωνα με τα δεδομένα της miRBase μέχρι σήμερα έχουν προσδιορισθεί ~2.600 ώριμα miRNAs στον άνθρωπο, με το 60% των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες να διαθέτει συντηρημένες περιοχές-στόχους τους (Nguyen et al., 2022; Iftikhar et al., 2016).

Κύριος ρόλος αυτών των μορίων είναι η καταστολή της γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο μεταγραφής ή μετάφρασης. Οι βασικοί στόχοι τους είναι μόρια αγγελιοφόρου RNA (messenger RNA - mRNA) με τα οποία αλληλεπιδρούν μέσω μιας περιοχής η οποία εκτείνεται από το 2^ο έως το 7^ο νουκλεοτίδιο ('seed region'), στοχεύοντας την 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR) του mRNA-στόχου (Chirpman et al., 2019). Ένα miRNA μπορεί να στοχεύει πολλά διαφορετικά mRNAs, ενώ ένα mRNA μπορεί να αποτελεί στόχο για διαφορετικά miRNAs υποδηλώνοντας την πλειοτροπική φύση των miRNAs και τη σημασία τους ως στοιχεία ενός πολύπλοκου ρυθμιστικού δικτύου (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Η αλληλεπίδραση διαφορετικών microRNAs (miRNAs) με πολλαπλά mRNA-στόχους. (Α) Ένα miRNA αναγνωρίζει πολλαπλούς στόχους. (Β) Ένα mRNA-στόχος διαθέτει θέσεις αναγνώρισης για πολυάριθμα microRNAs στην 3' UTR του. (Γ) Η απεικόνιση του πολύπλοκου δικτύου αμοιβαίων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των miRNAs και των mRNAs. Πηγή: Peter et al., 2010 (τροποποιημένο).

Η έκφραση των miRNAs μπορεί να ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων ιστών και κυτταρικών τύπων ενώ εκτιμάται ότι μπορούν να ρυθμίζουν την έκφραση ~60% των ανθρώπινων γονιδίων (Ludwig et al., 2017). Επειδή τα miRNAs ελέγχουν την έκφραση πολλαπλών μορίων-στόχων εμπλέκονται σε πολυάριθμες διαδικασίες σε επίπεδο κυττάρου όπως στη σηματοδότηση, τον μεταβολισμό, την κυτταρική διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Με τον τρόπο αυτό μπορούν να επηρεάσουν τελικά αναπτυξιακές αλλά και φυσιολογικές διαδικασίες όπως και συμπεριφορικές αποκρίσεις.

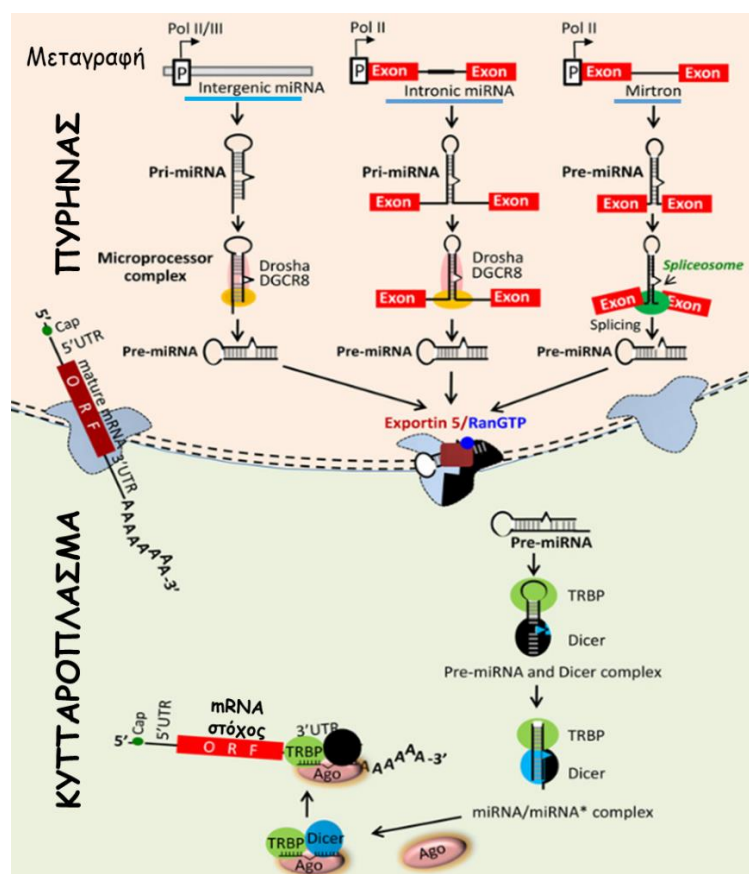
1.1 Σύνθεση των miRNAs

Τα miRNAs παράγονται από πρόδρομα μόρια με μια δομή φουρκέτας και χρειάζεται να υποστούν επεξεργασία ώστε να αποκτήσουν την τελική τους δομή που θα τους επιτρέψει να ασκήσουν τη

δράση τους. Η σύνθεσή τους χαρακτηρίζεται από τρία βήματα που περιλαμβάνουν: α) τη μεταγραφή του γονιδίου του miRNA, β) την επεξεργασία του πρόδρομου μετάγραφου έως ότου προκύψει το ώριμο miRNA και γ) τη συναρμολόγηση του τελεστή - ριβονουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου (miRNA induced silencing complex - miRISC) (Wahid et al., 2010).

1.1.1 Βιογένεση των microRNAs

Η σύνθεση των miRNAs διαδραματίζεται στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα. Τα αρχικά στάδια πραγματοποιούνται στον πυρήνα και στη συνέχεια η επεξεργασία τους λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 2). Ανάλογα με την προέλευση των miRNAs και τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην ωρίμανσή τους διακρίνονται τρία διαφορετικά μονοπάτια βιογένεσης (Macfarlane et al., 2010). Από τη μεταγραφή των αντίστοιχων γονιδίων τους προκύπτει ένα πρωτογενές πρόδρομο μόριο το pri-miRNA (primary transcripts miRNA), το οποίο ύστερα από κατάλληλη επεξεργασία δίνει ένα δευτερογενές πρόδρομο μετάγραφο, το pre-miRNA (precursor-miRNA), η τροποποίηση του οποίου οδηγεί στην παραγωγή του ώριμου miRNA (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Γενικοί μοριακοί μηχανισμοί βιογένεσης των miRNAs. Διακρίνονται τρία διαφορετικά μονοπάτια σύνθεσης των miRNAs, βάσει της προέλευσης και του τρόπου επεξεργασίας τους, με κοινό αποτέλεσμα όλων τη συναρμολόγηση του συμπλόκου miRNA induced silencing complex (RISC) που μεσολαβεί στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Πηγή: Shukla et al., 2011 (τροποποιημένο).

1.1.2 Μεταγραφή των miRNAs

Τα γονίδια των miRNAs εκτείνονται σε όλο το μήκος του ανθρώπινου γονιδιώματος και βάσει της θέσης τους σε αυτό μπορούν να ομαδοποιηθούν σε: ιντρονικά miRNAs σε κωδικοποιούσες μεταγραφικές μονάδες (transcriptional units ή TUs), ιντρονικά miRNAs σε μη κωδικοποιούσες TUs, εξονικά miRNAs σε κωδικοποιούσες TUs και εξονικά TUs σε μη κωδικοποιούσες TUs (Wahid et al., 2010).

Πάνω από τα δύο τρίτα όλων των miRNAs του ανθρώπου μεταγράφονται από ενδιάμεσες περιοχές των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, ενώ λιγότερα έχουν εντοπιστεί σε περιοχές ιντρονίων γονιδίων (Shukla et al., 2011). Περίπου τα μισά από τα γονίδια των γνωστών miRNAs εντοπίζονται ομαδοποιημένα. Αυτή η οργάνωση σε συστάδες (αλληλουχίες μεγάλου μήκους) οδηγεί στην έκφρασή τους ως πολυκιστρονικά πρωτογενή μετάγραφα. Διαφορετικά πρόδρομα miRNAs μεταγράφονται υπό τον έλεγχο ενός υποκινητή ως μία ενιαία μεταγραφική μονάδα (συστοιχία miRNAs). Κατόπιν, οι φουρκέτες των πρόδρομων μορίων επεξεργάζονται για την παραγωγή ξεχωριστών ώριμων miRNAs, χωρίς αυτό να συνεπάγεται ομολογία στη δομή και λειτουργία τους.

Η πλειοψηφία των miRNAs μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II, όμως σε ορισμένες περιπτώσεις μέσω της ύπαρξης ειδικών ρυθμιστικών στοιχείων, ενισχυτών, ανοδικά αυτών των γονιδιακών τόπων στρατολογείται η RNA πολυμεράση III και προκύπτουν συστάδες miRNAs από τη μεταγραφή ενός μεμονωμένου γονιδίου (Borchert et al., 2006).

1.1.3 Επεξεργασία και ωρίμανση των microRNAs

Οι κύριοι μεσολαβητές της βιογένεσης των miRNAs είναι οι δύο ριβονουκλεάσες Drosha και Dicer. Η Drosha δρα στον πυρήνα μετατρέποντας το pri-miRNA σε pre-miRNA ενώ η Dicer δρα στο κυτταρόπλασμα και οδηγεί στην παραγωγή των ώριμων miRNAs. Η Dicer συμμετέχει επίσης στα γεγονότα σίγησης της γονιδιακής έκφρασης (Εικόνα 2). Η επεξεργασία των miRNAs που βρίσκονται σε χρωμοσωμικές περιοχές μεταξύ δύο γονιδίων όπως και αυτών που εδράζονται σε εσώνια γίνεται στον πυρήνα από το μικροεπεξεργαστικό σύμπλοκο (multiprocessor complex), που αποτελείται από την Drosha και την πρωτεΐνη DGCR8 (DiGeorge syndrome Critical Region 8). Η DGCR8 προσδένεται στο δίκλωνο miRNA και δρα ως μη-καταλυτική υπομονάδα -ικρίωμα- αυτού του συμπλόκου, καταλήγοντας στη δημιουργία του pri-miRNA (Shukla et al., 2011).

Ένα σχετικά πρόσφατο μονοπάτι (non-canonical pathway), που ανακαλύφθηκε αρχικά στη *Drosophila* το 2007, αφορά τα mirtrons (Okamura et al., 2007). Τα mirtrons είναι miRNAs που θεωρούνται παραπροϊόντα του ματίσματος των ιντρονίων. Τα mirtrons διαφοροποιούνται από τα

υπόλοιπα miRNAs στο ότι η επεξεργασία τους πραγματοποιείται από το σωματίο ματίσματος, παρακάμπτοντας την δράση του μικροεπεξεργαστικού συμπλόκου (Ruby et al., 2007).

Η μετατόπιση των πρόδρομων miRNAs (pre-miRNAs) από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, ανεξάρτητα από την οδό βιοσύνθεσης τους, γίνεται μέσω μιας εξπορτίνης που δρα ως υποδοχέας πυρηνικής μεταφοράς και συζεύγνυται με μια μικρή G πρωτεΐνη. Το σύμπλοκο αυτό μεταφέρει τα pre-miRNAs στο κυτταρόπλασμα δια μέσου του πυρηνικού πόρου της πυρηνικής μεμβράνης. Η έξοδος των pre-miRNAs από τον πυρήνα πραγματοποιείται με τη βοήθεια της υδρόλυσης του GTP και την αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης του συμπλόκου (Muqbil et al., 2013).

Στον κυτταροπλασματικό χώρο, η Dicer μαζί με τον συμπαραγόντά της TRBP (transactivation response element RNA-binding protein) αφαιρεί την φουρκέτα στο ένα άκρο του μορίου παράγοντας ένα ώριμο δίκλωνο miRNA (miR/miR*). Τελικά, από τους δύο κλώνους επιλέγεται ένας για να αποτελέσει την αλυσίδα οδηγό (guide strand). Ο κλώνος αυτός (miR) συνήθως προκύπτει από τον βραχίονα του 5' άκρου (5p) του δίκλωνου miRNA και η επιλογή του γίνεται με βάση τη σύσταση των νουκλεοτιδίων του άκρου και της θερμοδυναμικής αστάθειάς του, στοχεύοντας το συμπληρωματικό mRNA-στόχο. Ο δεύτερος κλώνος που συμβολίζεται με αστερίσκο (miR*), ονομάζεται passenger strand και βρίσκεται σε χαμηλότερη ποσότητα, καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις αποικοδομείται και απορρίπτεται (Ying et al., 2008).

Μία πρωτεΐνη αργοναύτης (Argonaute 2 - AGO2) φορτώνει την αλυσίδα – οδηγό (miR) με ATP-εξαρτώμενο τρόπο και τη βοήθεια πρωτεϊνών συνοδών, τις Hsc70-Hsp90 chaperones ώστε να ξεκινήσει η συναρμολόγηση του συμπλόκου σίγησης (Medley et al., 2021). Μαζί με την Dicer, την TRBP1, πρωτεΐνες-μοριακά ικριώματα (π.χ. GW182) και πρωτεΐνες που διαθέτουν επικράτειες πρόσδεσης RNA, όπως η PRKRA (double-stranded RNA-dependent protein kinase activator A) που φαίνεται να αλληλεπιδρά και με την Dicer, σχηματίζουν ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλεγμα, το miRISC (miRNA-Induced Silencing Complex) που κατευθύνεται προς το κατάλληλο mRNA για να επάγει τη σίγηση (Lee Y et al., 2006; Shukla et al., 2011).

Το σύμπλοκο miRISC εντοπίζεται σε διάφορα διαμερίσματα του κυττάρου (π.χ. αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, κυτταροπλασματικά κοκκία, σύμπλεγμα Golgi, πρώιμα/όψιμα ενδοσώματα, λυσοσώματα, μιτοχόνδρια, πυρήνας), και τα μόρια που συμμετέχουν στην μετα-μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων εμπλουτίζονται στις περιοχές αυτές, προσδίδοντας έτσι μία χωρική διάσταση σε αυτό το σύνθετο επιγονιδιωματικό ρυθμιστικό κύκλωμα.

Ενώ το «φόρτωμα» του RISC συμβαίνει αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα, ποικίλες μελέτες επιβεβαιώνουν την μετέπειτα μεταφορά του στον πυρήνα με τη δράση καρνοφερινών (Roberts, 2014). Στον πυρήνα το miRISC εντοπίζεται σε αφθονία σε περιοχές με έντονη μεταγραφική δραστηριότητα, για παράδειγμα σε ιντρονικές περιοχές, όπου μπορεί να αλληλεπιδράσει με το DNA, επηρεάζοντας με άμεσο τρόπο τη διαδικασία της μεταγραφής, προκαλώντας τον τερματισμό της (von Brandenstein et al., 2018). Μπορεί επίσης να αλληλεπιδράσει με μόρια mRNA καθορίζοντας για παράδειγμα το μοτίβο του εναλλακτικού ματίσματος ή με ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια (mRNPs) (π.χ. mRNA με ριβοσώματα) προωθώντας την αποικοδόμηση του mRNA.

Το κυτταροπλασματικό miRISC μπορεί να διαχέεται δια μέσου του κυτταροπλάσματος ή να μεταφέρεται μέσω των μικροσωληνίσκων και να αλληλεπιδρά με πολυσώματα, τα σύμπλοκα των ριβοσωμάτων που μεταφράζουν συγχρόνως ένα μετάγραφο, εμποδίζοντας την έναρξη της μετάφρασης, μεσολαβώντας στην αποικοδόμηση του mRNA ή προάγοντας ακόμη και τη μεταφραστική ενεργοποίηση (O'Brien et al., 2018).

Στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο το miRISC αλληλεπιδρά με mRNA που μεταφράζεται αναστέλλοντας αυτή τη διαδικασία, ενώ από το συγκεκριμένο οργανίδιο τα σύμπλοκα του miRISC με mRNPs μπορούν να μεταφερθούν σε ενδοσώματα, ενδοκυτταρικά κυστίδια, όπου ολοκληρώνεται η απαδενυλίωση και αποικοδόμηση του mRNA. Επίσης, εντοπίζεται σε κυτταροπλασματικά κοκκία, όπως τα P bodies και τα κοκκία στρες, είτε για λόγους αποθήκευσης είτε πάλι για την προώθηση της αποικοδόμησης στόχων (Chan & Slack, 2006).

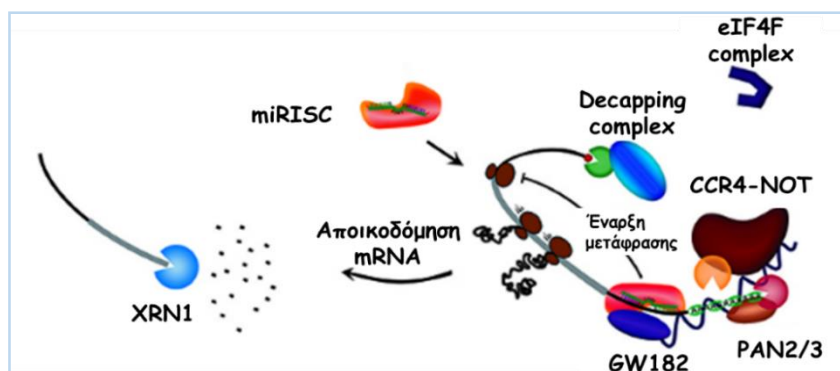
Ενδιαφέρον αποτελεί το ότι miRNAs και πρόδρομα μόριά τους έχουν βρεθεί και σε ανθρώπινα μιτοχόνδρια, όπως επιβεβαιώνουν πειράματα σε σκελετικά μυϊκά κύτταρα που περιλάμβαναν την απομόνωση αυτών των οργανιδίων και περαιτέρω μελέτη τους, χωρίς βέβαια να είναι γνωστή η πραγματική προέλευσή τους, εάν δηλαδή εισάγονται από το κυτταρόπλασμα ή/και επεξεργάζονται μερικώς στα μιτοχόνδρια (Barrey et al., 2011).

Τέλος, είναι αξιοσημείωτη η ικανότητα αυτών των συμπλόκων να εγκλωβίζονται σε κυστίδια και να μεταφέρονται στον εξωκυττάριο χώρο μέσω εξωκύτωσης εξυπηρετώντας την διακυτταρική επικοινωνία (Gümürdüz et al., 2017).

1.1.4 Μηχανισμοί δράσης των miRNAs

Ύστερα από την στρατολόγηση του συμπλόκου RISC, τα miRNAs μπορούν να δράσουν με δύο τρόπους που εξαρτώνται από το εάν η συμπληρωματικότητά τους με το mRNA-στόχο είναι πλήρης ή μερική. Γενικότερα, στα θηλαστικά τα περισσότερα miRNAs δεν υβριδίζουν πλήρως

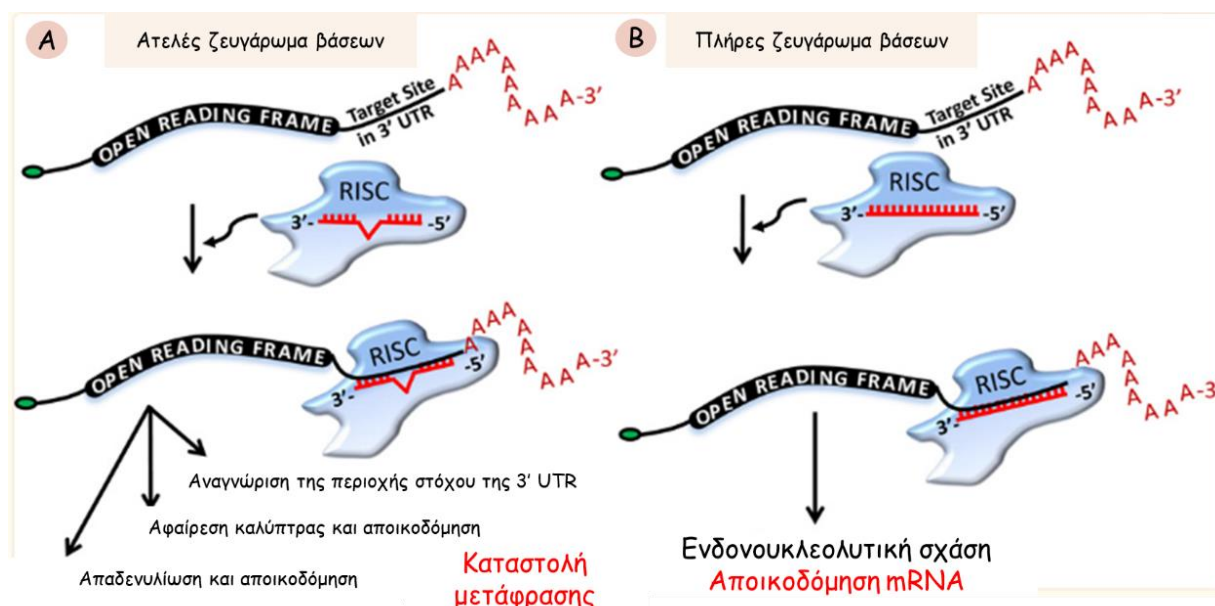
με τους στόχους τους και η καταστολή της μετάφρασης προκαλείται πριν ή κατά την έναρξη της πρωτεϊνσύνθεσης εμποδίζοντας τη συναρμολόγηση του ριβοσώματος με τους υπόλοιπους παράγοντες έναρξης και προωθώντας την απελευθέρωσή τους (Gu & Kay, 2010). Έπειτα, οι πρωτεΐνες σκαλωσιάς μαζί με την πρωτεΐνη Αργοναύτη στρατολογούν το σύμπλοκο CAF-1-CCR4-NOT (CAF-1:Chromatin Assembly Factor 1; CCR4: Carbon Catabolite Repressor 4; NOT: Negative Regulator of Transcription) όπως και τις απαδενυλάσες PAN-2-PAN-3 στα mRNA που στοχεύονται από το miRISC, που δρουν διαδοχικά και προάγουν την απαδενυλίωση του στοχευόμενου από το miRISC mRNA. Τα απαδενυλιωμένα mRNAs, έχοντας ‘κομμένες’ τις πολύ-A-ουρές τους, υφίστανται αποικοδόμηση της καλύπτρας τους από το ένζυμο DCP2 (mRNA Decapping enzyme) και τελικά στοχεύονται για αποικοδόμηση από την Xrn1, μία κυτταροπλασματική 5’-3’ εξοριβονουκλεάση (Εικόνα 3) (Medley et al., 2021).



Εικόνα 3: Ο μηχανισμός μεταφραστικής καταστολής διαμεσολαβούμενης από το miRISC, που πραγματοποιείται κυρίως παρεμβαίνοντας με το σύμπλοκο του eIF4F (Eukaryotic Initiation factor 4F). Ο ευκαρυωτικός παράγοντας εκκίνησης 4F αποτελεί ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο, το οποίο προσδένεται στην 5' καλύπτρα του mRNA για να προωθήσει την έναρξη της μετάφρασης. Η GW182, είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών που συνδέονται με την πρωτεΐνη Αργοναύτη και δρουν ως συνενεργοποιητές των απαδενυλασών. Το PAN2/3 (Poly(A)-Nuclease deadenylation complex) είναι σύμπλοκο απαδενυλίωσης πολυ(A)-νουκλεάσης που εκκινεί την διαδικασία της απαδενυλίωσης του mRNA. Η απαδενυλάση CCR4-NOT (Carbon Catabolite Repression—Negative On TATA-less) ολοκληρώνει τη διαδικασία αφαίρεσης της m⁷G καλύπτρας του mRNA-στόχου. Η εξοριβονουκλεάση XRN1 (5'-3' Exoribonuclease 1) αποικοδομεί το mRNA. Πηγή: O'Brien et al., 2018. (Τροποποιημένο).

Η αποικοδόμηση του mRNA-στόχου δεν φαίνεται να λειτουργεί ως απαραίτητη προϋπόθεση για την εξαρτώμενη από miRNA σίγηση σε μεταφραστικό επίπεδο, όπως υποδεικνύουν τα αμετάβλητα επίπεδα των mRNA σε *in vitro* πειράματα καταστολής της γονιδιακής έκφρασης στον *C. Elegans* (Medley et al., 2021). Έτσι, η διαδικασία της μεταφραστικής σίγησης φαίνεται ότι μπορεί να είναι αναστρέψιμη (Wilczynska & Bushell, 2015). Η σχετική συνεισφορά, όμως, των δύο κατασταλτικών γεγονότων, της αποικοδόμησης σε επίπεδο μεταγραφής ή της σίγησης σε επίπεδο μετάφρασης, παραμένει ακόμη άγνωστη και φαίνεται πως διαφοροποιείται ανάλογα με

τα στοχευόμενα mRNAs (Gu & Kay, 2010). Όταν το ζευγάρωμα των βάσεων είναι πλήρες, προκαλείται η σχάση του μορίου από ενδονουκλεάσες και το mRNA αποικοδομείται (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Οι δύο μηχανισμοί δράσης των miRNAs. Τα miRNAs υβριδίζουν (Α) ατελώς ή (Β) τέλεια την 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR) των μορίων στόχων τους. Με βάση την συμπληρωματικότητα των βάσεων, μπορούν κατόπιν να ρυθμίσουν την μετάφραση και την αποσταθεροποίηση του mRNA (κυρίως στα ζώα) ή να αποικοδομήσουν το μήνυμα-στόχο (κοινό στα φυτά). Πηγή: Shukla et al., 2011 (τροποποιημένο).

Σχετικά πρόσφατες μελέτες έρχονται να καταρρίψουν το δόγμα της στόχευσης των 3' UTRs από τα miRNAs. Σύμφωνα με αυτές, συγκεκριμένα ενδογενή μοτίβα στις 5' UTR ορισμένων mRNAs αποτελούν θέσεις πρόσδεσης του 3' άκρου των miRNAs. Αυτό φανερώνει, αν όχι μία πιθανή αλληλεπίδραση των μορίων με άλλες περιοχές των mRNA, τουλάχιστον μία συνδυαστική αλληλεπίδραση μεταξύ ενός μεμονωμένου miRNA με τα δύο άκρα ενός mRNA (Lee I et al., 2009).

Αν και η βιολογία των miRNAs είναι συνυφασμένη με την καταστολή της γονιδιακής έκφρασης, υπάρχουν και εξαιρέσεις στον κανόνα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, *in vitro* μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες αναφέρουν ενεργοποίηση της μετάφρασης από miRNAs, που προσδένονται σε στοιχεία της 3'UTR ή σε περιοχές της 5'UTR των mRNA-στόχων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες απαραίτητες για τα κύτταρα σε συνθήκες καταπόνησης (π.χ. έλλειψη θρεπτικών), υποδεικνύοντας ότι η αυξορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης από miRNAs μπορεί να συμβεί υπό συγκεκριμένες συνθήκες (O' Brien et al., 2018).

1.2 Απελευθέρωση των microRNAs στον εξωκυττάριο χώρο & βιολογικά υγρά

Παρά το ότι το μεγαλύτερο μέρος των miRNAs εντοπίζεται στο μικροπεριβάλλον του κυττάρου, πολυάριθμες μελέτες επιβεβαιώνουν την παρουσία εξωκυττάρων ή κυκλοφορούντων miRNAs (circulating miRNAs - cimiRNAs) σε εξωκυτταρικούς χώρους. Στους χώρους αυτούς συμπεριλαμβάνονται μια ποικιλία βιολογικών υγρών όπως, το πλάσμα, ο ορός, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, τα δάκρυα, το σάλιο, τα ούρα, το ωοθυλακικό υγρό, το σπέρμα, το αρθρικό υγρό, το μητρικό γάλα, το βρογχικό έκπλυμα κ.α.

Το προφίλ της έκφρασης των cimiRNAs που απομονώνονται σε διάφορα βιολογικά υγρά σε παθολογικές καταστάσεις παρουσιάζει ένα συγκεκριμένο μοτίβο σε παθολογικές καταστάσεις, κάτι το οποίο υποδεικνύει πιθανώς την ενεργητική απελευθέρωση αυτών των μορίων πέρα από την τυπική διάχυσή τους από κύτταρα που υφίστανται κάποια μορφή βλάβης ή κυτταρικού θανάτου (π.χ. νεκρωτικά κύτταρα) (Noferesti et al., 2015; Sohel et al., 2016).

Τα microRNAs που απελευθερώνονται από τα κύτταρα και παρουσιάζονται σε βιολογικά υγρά εμφανίζουν κάτι παράδοξο. Σε αντίθεση με τα ενδοκυτταρικά miRNAs και άλλα είδη RNA, τα οποία αποικοδομούνται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα, τα cimiRNAs παρουσιάζουν ιδιαίτερη σταθερότητα και ανθεκτικότητα στην αποικοδόμηση όντας ικανά να επιβιώσουν ακόμη και υπό δυσμενείς συνθήκες για αρκετό χρόνο (Glinge et al., 2017). Όταν συνθετικά miRNAs χορηγούνται σε ανθρώπινο πλάσμα αποικοδομούνται ταχύτατα σε σύντομο χρονικό διάστημα (Mitchell et al., 2008). Η προσθήκη αποδιατακτικού διαλύματος με την επερχόμενη απενεργοποίηση των RNAσών των κλασμάτων του αίματος έχει ως αποτέλεσμα την επιβίωση αυτών των εξωγενών μορίων. Επομένως, είναι σαφές ότι τα συνθετικά είδη των miRNAs είναι επιρρεπή στη δράση των νουκλεασών σε αντίθεση με τα cimiRNAs που αντέχουν σε υψηλή ενδογενή δραστικότητα RNAσης.

Διάφορες μελέτες αναφέρουν ότι τα cimiRNAs διατηρούνται ακέραια ακόμη και εάν εκτίθενται σε μη ευνοϊκές συνθήκες όπως το βράσιμο, οι ακραίες αυξομειώσεις θερμοκρασίας και pH, όπως και σε παρατεταμένους χρόνους αποθήκευσης (Sohel et al., 2016). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι τα ενδογενή miRNAs διαθέτουν ορισμένους προστατευτικούς μηχανισμούς.

1.2.1 Μηχανισμοί απελευθέρωσης των microRNAs στο εξωκυττάριο περιβάλλον

Οι μηχανισμοί που ευθύνονται για την απελευθέρωσή των microRNAs στο εξωκυττάριο περιβάλλον παρέμεναν ένα ανεξερεύνητο κομμάτι του παζλ για μία μακρά περίοδο. Μία από τις παλαιότερες υποθέσεις της απελευθέρωσης των miRNAs από τα κύτταρα αφορούσε το

πακετάρισμά τους σε κυστίδια που περιβάλλονται από μεμβράνη (εξωσώματα, μικροκυστίδια). Αυτή η θεωρία προέκυψε όταν δύο ερευνητικές ομάδες, των Valadi et al. και Hunter et al., έδειξαν ότι τα εξωσώματα μπορούν να μεταφέρουν λειτουργικούς πληθυσμούς miRNAs και ότι τα miRNAs ανιχνεύονται σε μικροκυστίδια του περιφερικού αίματος (Valadi et al., 2007; Hunter et al., 2008). Αργότερα, μελέτες έδειξαν ότι η μεταφορά πρωτεϊνών, miRNA και mRNA στα διαφορετικά βιολογικά υγρά μπορεί να μεσολαβείται από εξωσώματα, μικροκυστίδια και αποπτωτικά σωμάτια που απελευθερώνονται από μία ποικιλία κυτταρικών τύπων για να ρυθμίσουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό/απόπτωση, την αγγειογένεση, την εισβολή των καρκινικών κυττάρων και την επικοινωνία κυττάρου-κυττάρου (Kosaka et al., 2010).

Το 2011 η θεωρία της “ύπαρξης και μεταφοράς miRNAs εγκλωβισμένων σε κυστίδια” αντιμετώπισε προκλήσεις, κι αυτό γιατί δύο ανεξάρτητες μελέτες έδειξαν ότι το 90% των κυκλοφορούντων miRNAs (cimiRNAs) ήταν συνδεδεμένο με πρωτεΐνες της οικογένειας Αργοναύτη τόσο στο πλάσμα όσο και σε μέσο κυτταροκαλλιέργειας (Turchinovich et al., 2011). Εντούτοις, η σύνδεση αυτή των miRNAs με τις πρωτεΐνες Αργοναύτη φάνηκε αργότερα να αποτελεί μη-ειδικό προϊόν της φυσιολογικής δράσης και θανάτου των κυττάρων (Sohel et al., 2016).

Η σταθερότητα των cimiRNAs στην κυκλοφορία επιτυγχάνεται είτε μέσω της ενδοκυστιδιακής μεταφοράς τους, δηλαδή του εγκλεισμού τους σε μία ποικιλία κυστιδίων (μικροκυστίδια, εξωσώματα, αποπτωτικά σωμάτια) που προέρχονται από εγκολώσεις κυτταρικών μεμβρανών (πλασματική και ενδοσωμική) ή μέσω της εξωκυστιδιακής μεταφοράς, που περιλαμβάνει την σύζευξή τους με πρωτεΐνες (π.χ. Argonaute RISC Catalytic Component 2 - AGO2, Nucleophosmin 1 -NPM1) ή λιποπρωτεϊνικά σύμπλοκα (π.χ. με high-density lipoprotein - HDL) (Iftikhar et al., 2016). Τα microRNAs απελευθερώνονται στα βιολογικά υγρά με δύο τρόπους: α) διαχέονται παθητικά από νεκρωτικά κύτταρα ή κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβες και/ή β) απελευθερώνονται ενεργητικά μετά από κάποιο ερέθισμα (Zhao C et al., 2019). Τη δεύτερη περίπτωση επιβεβαιώνουν *in vitro* πειράματα σε ανθρώπινα ωοθηκικά κύτταρα, όταν μετά την υπερδιέγερσή τους το προφίλ της έκφρασης των cimiRNAs στο πλάσμα και το ωοθυλακικό υγρό μεταβλήθηκε (Noforesti et al., 2015).

Διάφοροι τύποι κυττάρων μπορούν να εκκρίνουν miRNAs σε εξωκυτταρικά κυστίδια. Στον εγκέφαλο, τα νευρικά κύτταρα μπορούν τόσο να απελευθερώσουν τέτοια μόρια όσο και να αλληλεπιδράσουν με εξωκυτταρικά miRNAs. Για παράδειγμα, μελέτες έδειξαν ότι τα miRNAs του εξωκυττάριου χώρου μπορούν να συνδεθούν σε υποδοχείς ενός υποπληθυσμού νευρώνων στα γάγγλια της ραχιαίας ρίζας, οι οποίοι συνεκφράζουν τους υποδοχείς τύπου Toll 7 (Toll-like

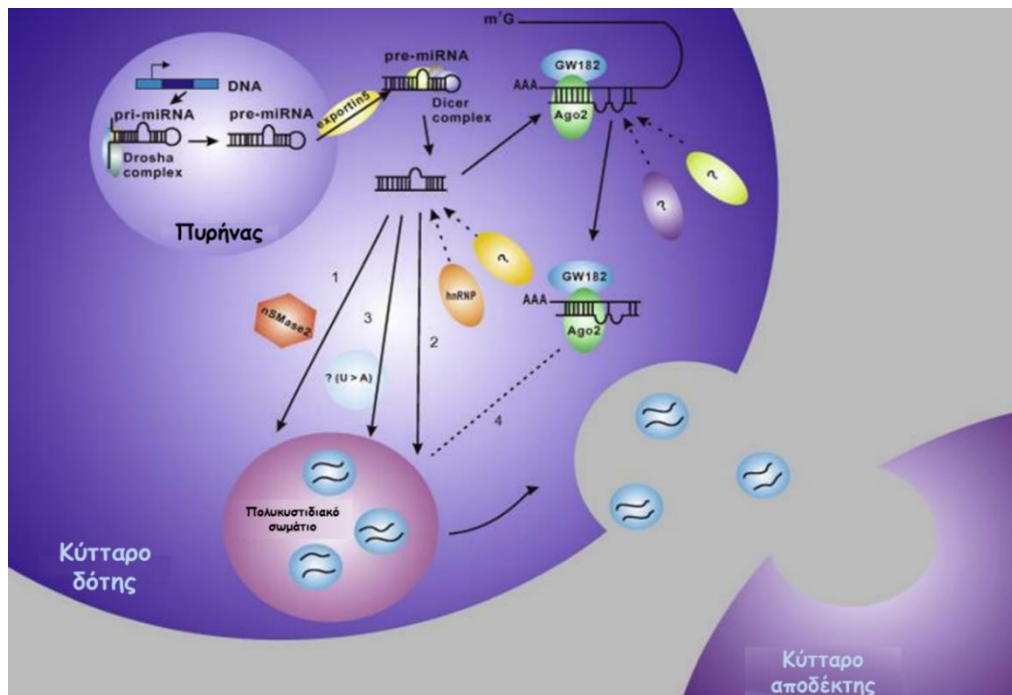
Receptor 7 - TLR7). Στους νευρώνες αυτούς, οι TLR7 είναι συζευγμένοι με ιοντικούς διαύλους κατιόντων (τους Transient receptor potential cation channel subfamily A member 1 - TRPA1) και μέσω μοτίβων GUUGUGU τα εξωκυττάρια miRNAs μπορούν να προσδεθούν σε αυτούς και να προκαλέσουν ρεύματα κατιόντων και την ενεργοποίηση των αλγοϋποδοχέων (Park et al., 2017). Επίσης, miRNAs μπορούν να απελευθερωθούν στον εξωκυττάριο χώρο από αστροκύτταρα ή/και κύτταρα μικρογλοίας μεσολαβώντας πιθανώς την αλληλεπίδραση και επικοινωνία νευρώνων-γλοιακών κυττάρων τόσο σε φυσιολογικές όσο και παθολογικές καταστάσεις (Li & Wang, 2019).

Δεν είναι ακόμη σαφές εάν η απελευθέρωση κυστιδίων από τα κύτταρα, που περιέχουν miRNAs είναι μία παθητική, συνεχής διαδικασία ή είναι μια ενεργητική διαδικασία, που εξαρτάται από κάποιο ερέθισμα. Είναι πιθανό, ανάλογα με τις συνθήκες η απελευθέρωση των miRNAs να είναι μη ελεγχόμενη ή ελεγχόμενη, καθιστώντας τα miRNAs ικανά να λειτουργούν ως χημικοί αγγελιαφόροι και να ρυθμίζουν τη διακυτταρική επικοινωνία (Iftikhar et al., 2016).

1.2.2 Τρόποι απελευθέρωσης και μεταφοράς των cimiRNAs στα βιολογικά υγρά

I. Μεταφορά των cimiRNAs με εξωσώματα

Τα εξωσώματα αποτελούν μικρά κυστίδια μεγέθους 30-90 nm ενδοσωμικής προέλευσης και είναι παρόντα σε όλα σχεδόν τα βιολογικά υγρά (Veremeyko et al., 2019). Τα εξωσώματα σχηματίζονται μέσω της εσωτερίκευσης της πλασματικής μεμβράνης, που οδηγεί στην παραγωγή των ενδοσωμάτων. Διεγερτικά σήματα (π.χ. εισροή Ca^{2+} , αναδιοργάνωση κυτταροσκελετού) μπορούν να προκαλέσουν την αναδίπλωση και εγκόλπωση της μεμβράνης των ενδοσωμάτων με αποτέλεσμα τη δημιουργία των πολυκυστιδιακών σωμάτων (Multivesicular Bodies, MVBs), οργανιδίων από τα οποία προκύπτουν τα εξωσώματα (Xu M et al., 2022). Τα εξωσώματα μπορεί να περιέχουν πρωτεΐνες, λιπίδια, DNA, mRNA καθώς και miRNAs. Περιλαμβάνουν μεγαλύτερες ποσότητες miRNAs συγκριτικά με τα κύτταρα από τα οποία προέρχονται, καθώς τα επίπεδα των miRNAs στα εξωσώματα μπορεί να μεταβάλλονται ανάλογα με τις συνθήκες. Μελέτες δείχνουν ότι τα κύτταρα που απελευθερώνουν εξωσώματα διαθέτουν μηχανισμούς που κατευθύνουν συγκεκριμένους υποπληθυσμούς ενδογενών miRNAs να εσωκλείονται σε αυτά τα κυστίδια (Εικόνα 5) χωρίς να πρόκειται για μια τυχαιοποιημένη διαδικασία. Ειδικότερα, κάποια miRNAs διαθέτουν ειδικές αλληλουχίες που κατευθύνουν την ενσωμάτωσή τους σε εξωσώματα, ενώ πιθανότατα ενζυμικά σύμπλοκα ή άλλες πρωτεΐνες ελέγχουν αυτήν την ταξινόμηση ανεξαρτήτως των αλληλουχιών (Εικόνα 5). Μέσω της δράσης τους ως «οχήματα» τα εξωσωμικά miRNAs μεταφέρονται σε γειτονικά αλλά και μακρινά κύτταρα αποδέκτες όπου αναγνωρίζουν και καταστέλλουν τους στόχους τους (Zhang J et al., 2015).



Εικόνα 5: Ο μηχανισμός διαλογής των εξωσωμικών microRNAs. Αφού ολοκληρωθεί η βιογένεση των microRNAs, τα ώριμα microRNAs πακετίζονται σε εξωσώματα με τους εξής πιθανούς τρόπους: (1) μονοπάτι εξαρτώμενο από την νευρική σφιγγομυελινάση 2 (nSMase2), (2) μονοπάτι εξαρτώμενο από μοτίβα των miRNAs και σουμοϋλιωμένες ετερογενείς πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες (3) μονοπάτι εξαρτώμενο από την αλληλουχία του 3' άκρου του miRNA και τέλος (4) σχετιζόμενο με το miRISC μονοπάτι, ώστε να κατευθυνθούν μετέπειτα στα κύτταρα αποδέκτες. Πηγή: Zhang J et al., 2015. (Τροποποιημένο).

II. Μεταφορά των cimiRNAs με κυστίδια

Τα μικροκυστίδια ή μικροσωματίδια είναι κυστίδια μεγαλύτερου μεγέθους από τα εξωσώματα, της τάξης των 100-1000 nm και διαφοροποιούνται από τα εξωσώματα στον μηχανισμό απελευθέρωσης, τη βιογένεση και τις βιοφυσικές τους ιδιότητες. Τα εξωσώματα αποτελούν προϊόν του μονοπατιού της ενδοκύττωσης, ενώ τα μικροκυστίδια προκύπτουν απευθείας από την πλασματική μεμβράνη μέσω της δημιουργίας προεκβολών και σχάσης τους από αυτή (Rani et al., 2017). Περιέχουν μία ποικιλία βιομορίων και εκκρίνονται από τα κύτταρα σε κατάσταση ηρεμίας. Επιπλέον, υπό την επίδραση ενός κατάλληλου ερεθίσματος, όπως την αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} που παίζει κύριο ρόλο σε αυτό, ο βαθμός έκκρισής τους αυξάνεται ραγδαία (Shu et al., 2019). Έτσι, η απελευθέρωση των miRNAs από τα μικροκυστίδια αποτελεί μια ενεργητικά ρυθμιζόμενη διαδικασία.

Πολλοί τύποι κυττάρων απελευθερώνουν μικροκυστίδια συμπεριλαμβανομένου μερικών καρκινικών κυττάρων, νευρώνων, ενδοθηλιακών, δενδριτικών αλλά και B κυττάρων με την πλειοψηφία των cimiRNAs (~90%) να μεταφέρεται με μικροκυστίδια (Kumar et al., 2016; Soheli et al., 2016). Ο μηχανισμός, ωστόσο, στον οποίο βασίζεται η επιλεκτική ενσωμάτωση των miRNAs στα μικροκυστίδια δεν έχει διευκρινισθεί ακόμη.

III. Μεταφορά των cimiRNAs με αποπτωτικά σωμάτια

Η απόπτωση αποτελεί μια απαραίτητη κυτταρική διαδικασία που στοχεύει στην απομάκρυνση των κατεστραμμένων κυττάρων. Κύτταρα σε όψιμα στάδια αυτής της διαδικασίας εκκρίνουν κυστιδία που εκθέτουν φωσφατιδυλοσερίνη, ως σήμα κυτταρικού θανάτου, γνωστά ως αποπτωτικά σωμάτια (Apoptotic Bodies, ABs). Η κύρια διαφορά τους με τους άλλους τύπους κυστιδίων αφορά το κατά πολύ μεγαλύτερο μέγεθος τους με διάμετρο 1-5 μm (Kumar et al., 2016).

Από το 1999 είχε γίνει γνωστό ότι αυτά τα σωμάτια μεταφέρουν νουκλεϊκά οξέα, αλλά δέκα χρόνια αργότερα οι Zerneck et al. έδειξαν ότι ενδοθηλιακά κύτταρα μπορούν να απελευθερώσουν αποπτωτικά σωμάτια πλούσια σε miR-126, ένα miRNA το οποίο δρα παρακρινώς και ενεργοποιεί την παραγωγή χημειοκινών σε αγγειακά κύτταρα προσδίδοντας τους αντι-αθηροσκληρωτικές ιδιότητες (Zerneck et al., 2009; Boon & Vickers, 2013).

IV. Μεταφορά των cimiRNAs με πρωτεΐνες/λιποπρωτεΐνες

Είναι αξιοσημείωτο ότι στους μεταφορείς των εξωκυτταρικών RNAs ανήκουν και ορισμένες πρωτεΐνες όπως η HDL, η NPM1 (κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που προσδένει το RNA με ικανότητα μεταφοράς στον πυρήνα) και η AGO2 (που αποτελεί το κύριο λειτουργικό συστατικό του miRISC) (Iftikhar et al., 2016). Ένα μικρό κλάσμα των miRNAs της κυκλοφορίας βρίσκεται εντός κυστιδίων, καθώς έχει βρεθεί ότι τα περισσότερα miRNAs (~90% των cimiRNAs) τόσο στο πλάσμα όσο και στον ορό είναι συζευγμένα με πρωτεΐνες (Arroyo et al., 2011). Πράγματι, τα περισσότερα μη κυστιδιακά cimiRNAs βρίσκονται σε σύμπλοκα με πρωτεΐνες της οικογένειας Αργοναύτη, οι οποίες δρουν προστατευτικά εμποδίζοντας την αποικοδόμησή τους από νουκλεάσες (Iftikhar et al., 2016).

Η HDL, εκτός του βασικού της ρόλου ως μεταφορέας της περίσσειας κυτταρικής χοληστερόλης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως όχημα για τη μεταφορά των miRNAs. Η ιδέα ότι η HDL μπορεί να συνδέεται και να μεταφέρει ενδογενή miRNAs προτάθηκε αρχικά από τον Vickers και τους συνεργάτες του, οι οποίοι προσδιόρισαν την ύπαρξη miRNAs σε απομονωμένες ανθρώπινες λιποπρωτεΐνες χρησιμοποιώντας συστοιχίες real-time PCR (Vickers et al., 2011). Αν και η HDL και η χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (low-density lipoprotein – LDL) μεταφέρουν πολλά κοινά miRNAs, η HDL φαίνεται πως αποτελεί τον κύριο μεταφορέα (Canfrán-Duque et al., 2016; Michel & Vickers, 2016). Μάλιστα, τα προφίλ έκφρασης των HDL-miRNAs σε δείγματα αίματος ασθενών με δυσλιπιδαιμίες διαφέρει από αυτό των υγιών ατόμων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακές υπογραφές σε περιπτώσεις οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας (Vickers et al., 2011).

1.2.3 Πρόσληψη των cimiRNAs

Τα εξωκυττάρια miRNAs μπορούν να προσλαμβάνονται από κύτταρα-αποδέκτες με μηχανισμούς ενδοκύττωσης. Σε συμφωνία με την υπόθεση ότι τα εξωκυτταρικά miRNAs δρουν ως μεσολαβητές της διακυτταρικής επικοινωνίας, βρέθηκε ότι τα miRNAs μέσω εξωσωμάτων ή/και της HDL μπορούν να μεταφερθούν σε κύτταρα αποδέκτες με έναν λειτουργικό τρόπο. Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχουν στοιχεία για την μεταφορά των AGO-miRNA συμπλόκων ή NPM1-συνδεδεμένων miRNAs σε κύτταρα αποδέκτες (Ortiz-Quintero, 2020). Η εκάστοτε μορφολογία και σύσταση των κυστιδίων φαίνεται να διαφοροποιεί την ικανότητα πρόσληψης των miRNAs τόσο σε επίπεδο κυττάρου όσο και ιστού. Έτσι, λοιπόν, τα cimiRNAs μπορούν να δράσουν αυτοκρινώς, παρακρινώς ή/και ενδοκρινώς γι' αυτό και παρομοιάζονται με τις ορμόνες (Gümürdüz et al., 2017).

Όταν τα κυστίδια που περιέχουν miRNAs αλληλεπιδράσουν με την επιφάνεια των κυττάρων-αποδεκτών (recipient cells) μπορούν να εσωτερικευθούν μέσω ενδοκύττωσης, με μηχανισμό που εξαρτάται ή είναι ανεξάρτητος της κλαθρίνης, όπως για παράδειγμα με μικροπινοκύτωση ή φαγοκύτωση. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι τα εξωσώματα μπορεί να εκφράζουν υποτύπους υποδοχέων που οδηγούν στην επιλεκτική στόχευση συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων (Ortiz-Quintero, 2020; He et al., 2022). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η έκφραση της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (β-amyloid precursor protein - APP) σε εξωσώματα που προέρχονται από κύτταρα νευροβλαστώματος, που στοχεύει εξειδικευμένα νευρώνες (Laulagnier et al., 2018).

Ύστερα από την πρόσληψη των κυστιδίων από τα κύτταρα-αποδέκτες, ακολουθούν το ενδοκυτταρικό μονοπάτι και καταλήγουν στα ενδοσωμικά πολυκυστικά σωματίδια, όπου μπορούν να στοχευθούν από το λυσόσωμα. Τα εξωκυτταρικά κυστίδια που καταφέρνουν να διαφύγουν από την πέψη απελευθερώνουν τελικά το φορτίο τους στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-αποδέκτη (Ortiz-Quintero, 2020).

1.3 Ο ρόλος των miRNAs στο ΚΝΣ

Η εξέλιξη του ανθρώπινου εγκεφάλου οδήγησε στην ενορχήστρωση των γεγονότων της νευρογένεσης και τη δημιουργία σύνθετων νευρωνικών δικτύων με αλλαγές στη μορφολογία, την αφθονία και τη λειτουργία των κυτταρικών τύπων (Prodromidou et al., 2019). Η πολυπλοκότητα αυτή, συγκριτικά με κατώτερους εξελικτικά οργανισμούς, προϋπέθετε την ανάπτυξη ενός καλά ελεγχόμενου δικτύου χωροχρονικής ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης που να διασφαλίζει την πραγματοποίηση νευροαναπτυξιακών και άλλων διαδικασιών εμποδίζοντας τη δυσλειτουργία του εγκεφάλου και την παθογένεση νόσων (Prodromidou et al., 2019).

Στον άνθρωπο, το 70% των miRNAs που έχουν αναγνωρισθεί, εκφράζεται στον εγκέφαλο με διαφορετικά ποσοστά έκφρασής τους σε διαφορετικές περιοχές (Πίνακας 1). Αυτά τα microRNAs εμπλέκονται στη νευρογένεση, τη νευρωνική διαφοροποίηση και ανάπτυξη, στο σχηματισμό συνάψεων και τη μορφογένεση του εγκεφάλου (Chen & Qin, 2015).

Πίνακας 1: Ποσοστά έκφρασης των microRNAs στις διάφορες περιοχές του εγκεφάλου.

Περιοχή	Ποσοστό	Λειτουργία που εμπλέκονται
Μετωπιαίος (φλοιός)	27%	Νευρογένεση, Ανάπτυξη (μορφογένεση)
Ιππόκαμπος	28%	Διαφοροποίηση νευρώνων
Παρεγκεφαλίδα	12%	Ανάπτυξη νευρώνων
Μεσεγκέφαλος	33%	Σχηματισμός συνάψεων

Παράλληλα, έχει βρεθεί ότι υπάρχουν διαφορικά πρότυπα έκφρασης σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου και μάλιστα ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο του κάθε ατόμου, προσδίδοντας έτσι στο μεταγράφομα έναν δυναμικό χαρακτήρα. Πολυάριθμες *in vitro* μελέτες σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων και αστροκυττάρων αρουραίων αλλά και ολιγοδενδροκυττάρων ποντικών υποδεικνύουν ότι miRNAs μπορούν να απελευθερωθούν μέσω εξωσωμάτων τόσο από τους νευρώνες όσο και από τα νευρογλοιακά κύτταρα (αστροκύτταρα, μικρογλοιακά, ολιγοδενδροκύτταρα) συνεισφέροντας στη μεταξύ τους επικοινωνία. Επίσης miRNAs απελευθερώνονται και από τα ενδοθηλιακά κύτταρα που συμμετέχουν στον σχηματισμό του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (ΑΕΦ) (Pegtel et al., 2014; Zhao et al., 2017). Τα κυστίδια-μεταφορείς των miRNAs μπορούν να διαπερνούν τον ΑΕΦ και να απελευθερώνονται στην κυκλοφορία συμβάλλοντας στην επικοινωνία εγκεφάλου και αίματος (Cho et al., 2019). Επομένως, μία μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης των miRNAs, δεδομένου ότι στοχεύουν πολλά μόρια που εμπλέκονται στην ομαλή εγκεφαλική λειτουργία, μπορεί να συνεισφέρει στην έναρξη και πρόοδο ασθενειών του ΚΝΣ, η οποία θα αντικατοπτρίζεται σε συστημικό επίπεδο.

Η ανάπτυξη του νευρικού συστήματος των θηλαστικών είναι απόρροια μιας σειράς ενορχηστρωμένων γεγονότων, που περιλαμβάνουν μεταγραφικά ρυθμιστικά δίκτυα, κυτταρική σηματοδότηση και δράση όπως και δομικές αναδιοργανώσεις. Το ρυθμιστικό αυτό κύκλωμα συμβάλλει στη διασύνδεση και επικοινωνία μεταξύ γλοίας και νευρώνων. Κατά μέσο όρο υπάρχουν 86 δισεκατομμύρια νευρώνες στον ανθρώπινο εγκέφαλο, που σχηματίζουν ένα ενδογενές δίκτυο για την μεταξύ τους επικοινωνία μέσω ηλεκτρο-χημικών σημάτων (Cao et al., 2016). Εντός αυτού του πολυεπίπεδου ρυθμιστικού συστήματος, τα miRNAs αναλαμβάνουν τον κρίσιμο ρόλο του συντονισμού διαδικασιών από την εμβρυϊκή ανάπτυξη έως την ενήλικη νευρογένεση. Επιπλέον, υπό την επίδραση περιβαλλοντικών ερεθισμάτων, ως επιγενετικοί

τροποποιητές ευθύνονται για την «αφομοίωση» των μεταβαλλόμενων σημάτων σε μοριακό επίπεδο, ώστε οι εγκεφαλικές λειτουργίες να εναρμονίζονται με τις αλλαγές του περιβάλλοντος (Dwivedi, 2014).

Στον εγκέφαλο υπάρχουν άφθονα miRNAs (~70% του συνόλου) τα οποία παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης με βάση το αναπτυξιακό στάδιο και την περιοχή του εγκεφάλου που μελετάται, οδηγώντας έτσι στην ύπαρξη ενός «δυναμικού μεταγραφώματος» (Chen et al., 2015). Τα miRNAs μπορούν να εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των νευρικών βλαστικών κυττάρων (Neural Stem Cells, NSCs), στη νευρωνική μετανάστευση και διαφοροποίηση, στην αύξηση και πολυπλοκότητα των δενδριτών, στην ανάπτυξη και καθοδήγηση των νευραξόνων, στη συναπτογένεση, τη συναπτική πλαστικότητα και σε διαδικασίες νευροφλεγμονής (Cao et al., 2016) (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Ο ρόλος ορισμένων microRNAs που μπορούν να στοχεύουν μεταγραφικούς παράγοντες, μόρια προσκόλλησης, ενεργοποιητές των G πρωτεϊνών, υποδοχείς νευροδιαβιβαστών και προφλεγμονώδεις διαμεσολαβητές.

microRNA	Είδος	Στόχος - Μονοπάτι	Λειτουργία που επηρεάζεται	Βιβλιογραφία
Πολλαπλασιασμός/Διαφοροποίηση NSCs				
miR-124	Ποντίκι	SOX9	Νευρωνική διαφοροποίηση	Cheng et al., 2009
Νευρωνική μετανάστευση και ενσωμάτωση				
Συστάδα miR-379-410	Ποντίκι	N-καδερίνη	Νευρωνική μετανάστευση και διαφοροποίηση των NSCs	Rago et al., 2013
Δενδριτική αύξηση και πολυπλοκότητα				
miR-132	Ποντίκι	MMP-9	Δομή δενδριτικής άκανθας	Jasińska et al., 2016
Αύξηση και καθοδήγηση νευραξόνων				
miR-132	Αρουραίος	p250GAP	Αύξηση δενδρίτη	Vo et al., 2005
Συναπτογένεση και συναπτική πλαστικότητα				
miR-284	Drosophila	GluRIIA & GluRIIB	Μετασυναπτική ισχύς	Karr et al., 2009
Φλεγμονή του ΚΝΣ				
miR-146a	Ανθρώπος & Ποντίκι	NF-κB	Έκφραση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών	Li et al., 2011

NSCs: Νευρικά Βλαστικά Κύτταρα, **SOX9:** Μεταγραφικός παράγοντας με SRY-box, **MMP-9:** Μεταλλοπρωτεΐναση 9, **p250GAP:** Πρωτεΐνη ενεργοποίησης της δράσης GTPάσης, **GluRIIA:** Υποδοχέας γλουταμικού τύπου ΙΑ, **GluRIIB:** Υποδοχέας γλουταμικού τύπου ΙΒ, **NF-κB:** Πυρηνικός παράγοντας κB.

I. Ο ρόλος των microRNAs στη ρύθμιση της νευρωνικής επιβίωσης

Οι ώριμοι νευρώνες εκφράζουν έναν τεράστιο αριθμό διακριτών miRNAs, τα οποία φαίνεται να είναι απαραίτητα για την επιβίωση των διαφοροποιημένων νευρώνων. Σε *in vivo* πειράματα σε ώριμους νευρώνες ποντικών, η διαγραφή της *dicer*, ενός από τα ένζυμα επεξεργασίας των pre-miRNAs, απαραίτητο για την παραγωγή των ώριμων μορίων, συνοδεύεται από σταδιακή απώλεια των miRNAs και έχει ως αποτέλεσμα την σταδιακή εκφύλιση των νευρώνων και την εμφάνιση αταξίας. Συγκεκριμένα, η απώλεια της *dicer* φάνηκε να προκαλεί τον θάνατο των κυττάρων Purkinje, που χρησιμοποιήθηκαν ως σύστημα μοντέλο για τη μελέτη του ρόλου των miRNAs σε νευρώνες που έχουν υποστεί ήδη μίτωση. Η ταχύτατη απώλεια των miRNAs, που εκφράζουν υπό φυσιολογικές συνθήκες τα συγκεκριμένα κύτταρα, οδήγησε τελικά στον κυτταρικό θάνατο και την αταξία, επιβεβαιώνοντας την σημασία τους στη φυσιολογία των διαφοροποιημένων κυττάρων (Schaefer et al., 2007).

II. Ο ρόλος των microRNAs σε διαδικασίες μάθησης και μνήμης

Είναι γνωστό ότι η εγκαθίδρυση μακροπρόθεσμων μορφών μνήμης απαιτεί διαδικασίες πρωτεϊνοσύνθεσης, ένα χαρακτηριστικό κοινό σε σπονδυλωτά και ασπόνδυλα. Η πρωτεϊνοσύνθεση συνοδεύεται από κυτταρικές αλλαγές που περιλαμβάνουν τροποποιήσεις στις συνάψεις, στη λειτουργία των κυκλωμάτων και κατ'επέκταση στη συμπεριφορά (Ashraf et al., 2006). Ωστόσο, δεν είναι γνωστό πώς η πρωτεϊνοσύνθεση εκτυλίσσεται στο νευρικό σύστημα και πώς αυτή συνεισφέρει στο σχηματισμό μιας συγκεκριμένης μνήμης. Αξιοπρόσεκτο γεγονός αποτελεί η πρωτεϊνοσύνθεση που πραγματοποιείται στην περιοχή των συνάψεων, καθώς αυτό μπορεί να σημαίνει επιλεκτικές αλλαγές σε επίπεδο σύναψης αλλά και μία σταθερή τροποποίηση των κυκλωμάτων. Ενδεικτικά, στον πρόσθιο εγκέφαλο των θηλαστικών, ο έλεγχος της πρωτεϊνοσύνθεσης κοντά στις συνάψεις είναι κρίσιμος για τη φυσιολογική μάθηση και τη μορφογένεση των δενδριτικών ακανθών (Dwivedi et al., 2013). Ενώ, οι ρυθμιστές αυτής της διεργασίας είναι γνωστοί, τα μοριακά γεγονότα που διέπουν την πρωτεϊνοσύνθεση στις συνάψεις κατά την δημιουργία της μνήμης παραμένουν αδιευκρίνιστα.

Ένα καλά χαρακτηρισμένο σύστημα για τη μελέτη αυτών των διαδικασιών αποτελεί το νευρομυϊκό σύστημα της *Drosophila*. Σε πειράματα στα οποία επιστήμονες εστίασαν στο οσφρητικό σύστημα της *Drosophila*, μελετήθηκε η έκφραση της Calcium-calmodulin (CaM)-dependent protein kinase II (CamKII), μιας κινάσης που εντοπίζεται προ- και μετασυναπτικά, ελέγχεται από τη νευρική δραστηριότητα και είναι γνωστό ότι παίζει ρόλο στη νευρομυϊκή συναπτική πλαστικότητα καθώς η έκφρασή της εμπλέκεται στην οσφρητική μνήμη. Στον λοβό της κεραίας στα έντομα που πραγματοποιήθηκε knockout της *Dicer* η έκφραση της CamKII στις

συνάψεις κατά τη δημιουργία της μακροπρόθεσμης μνήμης παρουσίασε μεταβολές συγκριτικά με τα control. Τα μοτίβα έκφρασης πρωτεϊνών σε συναπτικό επίπεδο μπορούν, λοιπόν, να ελέγχονται από συστατικά του μονοπατιού RISC μέσω του οποίου τα miRNAs ασκούν τη δράση τους (Ashraf et al., 2006).

Η Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) αποτελεί μία πρωτεΐνη που περιέχει περιοχές πρόσδεσης RNA και εμπλέκεται στη ρύθμιση της μετάφρασης όπως δείχνουν *in vitro* και *in vivo* μελέτες. Η απώλεια της FMRP είναι γνωστό ότι αποτελεί την κύρια αιτία εμφάνισης του συνδρόμου εύθραυστου X στους ανθρώπους, που σχετίζεται με συμπτώματα νοητικής υστέρησης (Qurashi et al., 2007). Ποντίκια που στερούνται της πρωτεΐνης FMRP παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα συμπεριφορικών και μαθησιακών διαταραχών με ανωμαλίες στις δενδριτικές ακανθες και στη μακροπρόθεσμη ενίσχυση (Long Term Potentiation - LTP). Έχει αποδειχθεί ότι η σύνδεση της FMRP με πολυριβωσώματα συμβαίνει με έναν RNA-εξαρτώμενο τρόπο μέσω ριβονουκλεοπρωτεϊνικών σωματιδίων (mRNP), ενώ συσχετίστηκε και με το μονοπάτι των miRNAs που εμπλέκεται στη μεταφραστική καταστολή, ως συστατικό του συμπλόκου RISC (Caudy et al., 2002). Η FMRP βρίσκεται άφθονα στον εγκέφαλο και στους νευρώνες εντοπίζεται στη βάση των δενδριτικών ακανθών μαζί με πολυριβωσώματα (Huebschman et al., 2020). Υπάρχουν ενδείξεις ότι η συναπτική πλαστικότητα σχετίζεται με αλλαγές στον αριθμό ή/και το μέγεθος των δενδριτικών ακανθών και σε ασθενείς με σύνδρομο εύθραυστου X και στο πειραματικό μοντέλο του συνδρόμου σε ποντίκια *Fmr-1^{-/-}* οι δενδριτικές ακανθες είναι επιμηκυμένες και λεπτές (Terracciano et al., 2005). Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν πιθανό ρόλο της FMRP, της οποίας τα σύμπλοκα FMRP-mRNP που αλληλεπιδρούν με το RISC στους δενδρίτες ελέγχουν την πρωτεϊνοσύνθεση, την ανάπτυξή τους και κατ'επέκταση τη συναπτική πλαστικότητα σε συνεργασία με ορισμένα miRNAs (Qurashi et al., 2007).

III. Ρύθμιση της συναπτικής ανάπτυξης, ωρίμανσης ή/και πλαστικότητας από τα microRNAs

Οι νευροτροφίνες (Neurotrophins - NTs), όπως ο εγκεφαλικός νευροτροφικός παράγοντας (Brain-derived neurotrophic factor - BDNF), αποτελούν παράγοντες που απελευθερώνονται κατά τη νευρωνική δραστηριότητα και εμπλέκονται σε μονοπάτια νευρωνικής επιβίωσης, διαφοροποίησης, συναπτογένεσης και ρύθμισης της πλαστικότητας. Οι φυσιολογικές αποκρίσεις των NTs μεσολαβούνται από την πρόσδεσή τους κυρίως σε υποδοχείς της οικογένειας κινάσης τυροσίνης (tropomyosin-related kinase - TrK). Ο διμερισμός του προσδέτη-υποδοχέα έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη ενός καταρράκτη σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως το μονοπάτι των Ras/ενεργοποιούμενων από μιτογόνα πρωτεϊνικών κινασών (Mitogen-Activated Protein Kinase - MAPK), κινάσης της φωσφατιδυλοϊνσιτόλης 3 (phosphatidylinositol 3-kinase -

PI3K)/πρωτεϊνικής κινάσης B (Akt) και της φωσφολιπάσης Cγ (PLCγ) - Ca^{2+} , που δρουν καθοδικά για να επάγουν τελικά την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη νευροπλαστικότητα, την επιβίωση και την αύξηση (Yang et al., 2020).

Είναι γνωστό ότι η έκφραση του BDNF βρίσκεται είτε υπό τον άμεσο έλεγχο δεκάδων miRNAs σε μεταγραφικό επίπεδο (π.χ. miR-124) είτε σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, τα οποία αλληλεπιδρούν με το mRNA μεταγραφικών παραγόντων όπως η πρωτεΐνη πρόσδεσης στοιχείων απόκρισης στο cAMP (cAMP Response Element-Binding Protein – CREB) που προσδένονται σε περιοχές υποκινητών των NTs και ελέγχουν τη δράση τους (π.χ. miR-134) (Ortega et al., 2021).

Η έκφραση των NTs δεν ρυθμίζεται μόνο από τα miRNAs, αλλά με τη σειρά της ρυθμίζει επίσης την έκφραση των ίδιων των miRNAs (Abdollahi et al., 2022). Σύμφωνα με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί έως σήμερα και αφορούν τη ρύθμιση των miRNAs από NTs, ο BDNF μπορεί να τροποποιήσει την έκφραση των miRNAs με τουλάχιστον τρεις τρόπους:

- 1) *Αυξορρύθμιση της βιογένεσης των miRNAs.* Όταν ο BDNF προσδεθεί στον υποδοχέα TrKB, η κινάση ERK (Extracellular signal-regulated kinase), που ανήκει στην οικογένεια των MAP κινασών, ενεργοποιείται καθοδικά του σηματοδοτικού μονοπατιού, φωσφορυλιώνει τον TRBP (HIV-1 TAR RNA-binding protein) και επάγει την έκφραση της Dicer που αποτελούν το εναρκτήριο σύμπλοκο παραγωγής miRNA,
- 2) *Καταστολή της βιογένεσης των miRNAs.* Η ERK αυξορρυθμίζει τις πρωτεΐνες Lin28a που συνδέονται σε RNA (RNA-binding proteins) και οδηγούν σε ουριδιλίωση των pre-miRNAs, με αποτέλεσμα να μην επεξεργάζονται από την dicer και να αποικοδομούνται,
- 3) *Μεταγραφική ρύθμιση των miRNAs.* Οι NTs μπορούν να ενεργοποιήσουν μεταγραφικούς παράγοντες, όπως τον CREB και τον πυρηνικό παράγοντα κB (NF-κB) που με τη σειρά τους ρυθμίζουν την μεταγραφή των miRNAs (Shi 2015).

Επομένως, οι NTs και τα miRNAs ρυθμίζονται αμοιβαία και αυτές οι αλληλεπιδράσεις ρυθμίζουν τελικά την έκφραση πολυάριθμων κωδικών περιοχών του γονιδιώματος (Abdollahi et al., 2022). Για παράδειγμα, το miR-134 μπορεί να αναστείλλει την μετάφραση της LIMK1, μιας κινάσης ρυθμίζει τη δυναμική των ινιδίων ακτίνης του κυτταροσκελετού και κατ'επέκταση την αύξηση των δενδριτικών ακανθών. Η στόχευση αυτή της LIMK1 μπορεί να ανασταλλεί από τον BDNF (Fan et al., 2018; Schratt et al., 2006). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι καταθλιπτικοί ασθενείς παρουσιάζουν αλλαγές στην έκφραση του BDNF τόσο σε κύτταρα του αίματος όσο και σε ιστό εγκεφάλου και κλινικές μελέτες δείχνουν ότι ο BDNF και συστατικά των μονοπατιών Ras–MAPK και PI3K–Akt μειώνονται από το στρες και την κατάθλιψη, ενώ αυξάνονται από αντικαταθλιπτικές θεραπείες (Duman et al., 2016; Dwivedi, 2013). Τα στοιχεία αυτά δείχνουν ότι

τόσο σε φυσιολογικές όσο και παθολογικές καταστάσεις οι αμφίδρομες αλληλεπιδράσεις μεταξύ νευροτροφικών παραγόντων και miRNAs είναι πολύ σημαντικές στη ρύθμιση της συναπτικής πλαστικότητας.

Εκτός αυτών, ο CREB1 ένας κύριος μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει μακροπρόθεσμες αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση, είναι σημαντικός για τη μάθηση και την LTP. Σε ινοβλάστες και σε εγκεφαλικό ιστό καταθλιπτικών ασθενών έχει παρατηρηθεί η μείωση (downregulation) της έκφρασής του (Sulser et al., 2002). Περιέχει θέσεις αναγνώρισης για >40 miRNAs και πολλά γονίδια των miRNAs διαθέτουν περιοχές σύνδεσης του CREB μερικά εκ των οποίων επάγονται από τον ίδιο τον CREB, όπως το miR-132 επηρεάζοντας έτσι τη νευροπλαστικότητα (Qian et al., 2017). Επομένως, ο CREB και ο BDNF συμμετέχουν σε μία ποικιλία δικτύων θετικής ανατροφοδότησης στα οποία εμπλέκονται miRNAs. Τα miRNAs λοιπόν δεν αναστέλλουν απλώς την έκφραση μεμονωμένων στόχων όπως για παράδειγμα της LIMK1, αλλά συμμετέχουν και στη ρύθμιση της ομοιοστάσης των βιοχημικών μονοπατιών που εμπλέκονται σε διαδικασίες μάθησης και μνήμης.

Τα miRNAs φαίνεται πως στοχεύουν ιδιαίτερα mRNAs που βρίσκονται υπό πολύπλοκη ρύθμιση (π.χ. με μακριές 5'-UTRs και 3'-UTRs) και που υφίστανται εναλλακτικό μάτισμα (Ding et al., 2023). Οι στόχοι τους αποτελούν πρωτεΐνες που δρουν σε στάδια που έπονται της σύνδεσης του προσδέτη στον υποδοχέα κατά τη κυτταρική σηματοδότηση (υποδοχείς, πρωτεΐνες – προσαρμογείς, μεταγραφικοί παράγοντες) και επισημαίνουν τη σημασία των miRNAs στον έλεγχο μονοπατιών που επηρεάζονται στην κατάθλιψη (Ding et al., 2023).

1.3.1 Τα miRNAs ως βιοδείκτες και συσχέτιση με ασθένειες του ΚΝΣ

Οι βιοδείκτες αποτελούν βιολογικά χαρακτηριστικά που μετρώνται αντικειμενικά και μπορούν να θεωρηθούν ως ένδειξη μιας φυσιολογικής ή παθολογικής βιολογικής διαδικασίας ή μιας τυπικής ανταπόκρισης σε ένα φάρμακο (Biomarkers Definitions Working Group, 2001). Για αυτόν τον λόγο χρησιμοποιούνται ως εργαλείο για την πρόωπη ανίχνευση ασθενειών, την παρακολούθηση της εξέλιξης μιας νόσου ή την κλινική απόκριση σε μια θεραπευτική παρέμβαση. Οι νευρολογικές διαταραχές συνιστούν την δεύτερη κυριότερη αιτία θανάτου σε παγκόσμιο επίπεδο, με 9.4 εκατομμύρια θανάτους να έχουν σημειωθεί το 2015 (16.5% των συνολικών θανάτων) (Carroll et al., 2019). Το 2019 περίπου 1 δισεκατομμύριο άτομα - συμπεριλαμβανομένου και το 14% του συνόλου των εφήβων παγκοσμίως - έπασχαν από κάποια ψυχική διαταραχή, ενώ το ποσοστό κατάθλιψης και άγχους αυξήθηκε σε μεγάλο βαθμό (>25%) τον πρώτο χρόνο της πανδημίας

(WHO, 2022). Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ακόμη περισσότερο την σημασία της έγκαιρης διάγνωσης διαταραχών τέτοιας φύσεως.

Η ανάγκη για πρόωπη διάγνωση πριν την έναρξη των κύριων συμπτωμάτων των νόσων, η δυσκολία πρόσβασης στον ιστό που εμφανίζει βλάβη, σε αντίθεση με την ευκολία λήψης βιολογικών υγρών π.χ. αίμα, κάνουν τα cimiRNAs κατάλληλα ως βιοδείκτες. Έως τώρα, η μελέτη της έκφρασης των cimiRNAs σε μία πληθώρα ασθενειών του ΚΝΣ έδειξε την απορρύθμιση εκατοντάδων cimiRNAs (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Ο αριθμός των cimiRNAs που παρουσιάζουν μεταβολή στην έκφρασή τους σε μία ποικιλία νόσων του ΚΝΣ (Gill et al., 2022; Van den Berg et al., 2020; Murphy et al., 2019; Rao et al., 2013).

Ασθένεια	Αριθμός απορρυθμισμένων cimiRNAs	Αριθμός αυξορρυθμιζόμενων cimiRNAs (↑)	Αριθμός μειορρυθμιζόμενων cimiRNAs (↓)
Νόσος Alzheimer	253	100	115
Νόσος Parkinson	89	27	54
Επιληψία	378		
Αυτισμός	29	18	11
Σχιζοφρένεια	27	17	9
Λιπολική διαταραχή	16	11	5
Μείζων καταθλιπτική διαταραχή	98	50	45
Αγχώδης διαταραχή	>30		

Ειδικότερα στην κατάθλιψη, ο ακριβής ρόλος των miRNAs στην παθοφυσιολογία της νόσου παραμένει ακόμη άγνωστος. Μέχρι σήμερα έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι βιοδείκτες της κατάθλιψης (νευροτροφικοί παράγοντες, ορμόνες του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων, φλεγμονώδεις παράγοντες και μεταβολικοί δείκτες) αλλά στην κλινική πράξη δεν έχουν αποδειχθεί χρήσιμοι, λόγω της περιορισμένης ευαισθησίας και εξειδίκευσης τους (Xu YY et al., 2019). Η απελευθέρωση των miRNAs ως αγγελιοφόροι, ο συντονισμός αναπτυξιακών διαδικασιών και διαδικασιών διαφοροποίησης, η σταθερότητα αυτών των μορίων, ο εμπλουτισμός τους σε διάφορες περιοχές και η εύκολη ποσοτικοποίησή τους με μη επεμβατικές μεθόδους, καθιστούν τα miRNAs υποσχόμενα μόρια ως βιοδείκτες σε συναισθηματικές διαταραχές, όπως η κατάθλιψη.

1.4 Συναισθηματικές διαταραχές

Οι συναισθηματικές διαταραχές αποτελούν μία ομάδα από νευροψυχιατρικές νόσους, συνήθως υποτροπιάζουσες, με σύνθετη συμπτωματολογία που περιλαμβάνει διαταραχές της διάθεσης, του

ύπνου, της προσοχής, γνωστικές διαταραχές, ενώ μπορεί να συνοδεύονται από ιδέες αυτοκτονίας (Martins & Schratt, 2021).

Σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης DSM-IV οι διαταραχές της διάθεσης συμπεριλαμβάνουν:

- α) *Τις καταθλιπτικές διαταραχές* (διακρίνεται σε: δυσθυμική διαταραχή, μείζονα καταθλιπτική διαταραχή, καταθλιπτική διαταραχή μη προσδιοριζόμενη αλλιώς)
- β) *Τις διπολικές διαταραχές*
- γ) *Τη διαταραχή της διάθεσης οφειλόμενη σε ουσίες*
- δ) *Τη διαταραχή της διάθεσης οφειλόμενη σε γενική ιατρική κατάσταση και*
- ε) *Τη διαταραχή της διάθεσης, μη προσδιοριζόμενη αλλιώς*

Οι δύο πιο συχνές μορφές είναι η μείζων καταθλιπτική διαταραχή (Major Depressive Disorder - MDD) με χαρακτηριστικό την χρόνια καταθλιπτική διάθεση και η διπολική διαταραχή (Bipolar Disorder - BD) που περιλαμβάνει περιόδους κατάθλιψης, μανίας, υπομανίας και μεικτά επεισόδια (Martins & Schratt, 2021). Ο επιπολασμός των διαταραχών του διπολικού φάσματος είναι ~ 2.4%, με μέση ηλικία έναρξης (για τη διπολική διαταραχή) τα 20 έτη (Dadouli et al., 2022). Αυτές οι παθολογικές καταστάσεις είναι δύο από τις βασικότερες αιτίες αναπηρίας, με τους ασθενείς να παρουσιάζουν αυξημένη θνησιμότητα λόγω των υψηλών ποσοστών αυτοκτονιών αλλά και υψηλά ποσοστά συννοσηρότητας που σχετίζονται με καρδιαγγειακά νοσήματα, σακχαρώδη διαβήτη και χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (Dadouli et al., 2022; Martins & Schratt, 2021).

Αν και τα τελευταία 50 χρόνια έχουν γίνει αξιοσημείωτες προσπάθειες για την «αποκρυπτογράφηση» της νευροβιολογίας των διαταραχών της συναισθηματικής διάθεσης, οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί δεν έχουν διαλευκανθεί πλήρως. Τόσο κληρονομικοί όσο και περιβαλλοντικοί παράγοντες (όπως οι επιγενετικοί μηχανισμοί) φαίνεται να εμπλέκονται στην εμφάνιση αυτών των ασθενειών όπως και η πιθανή χρόνια φλεγμονή του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (neuroinflammation) (Issler & Chen, 2015).

Ειδικότερα, η κατάθλιψη αποτελεί τον «εκπρόσωπο» των συναισθηματικών διαταραχών και είναι μια από τις κυριότερες αιτίες πρόωρου θανάτου παγκοσμίως. Η διάγνωση της νόσου πραγματοποιείται σε μικρές ηλικίες και η ηλικία του 25% των ατόμων που διαγιγνώσκονται με κατάθλιψη δεν ξεπερνά τα 19 έτη (Dwivedi, 2014). Αν και η έρευνα για τον χαρακτηρισμό της νόσου είναι εκτενής, ~40% των ασθενών δεν ανταποκρίνονται στις διαθέσιμες θεραπείες και αυτό μερικώς οφείλεται στην ανεπαρκή κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την παθογένεση της νόσου (Dwivedi, 2014). Ανάμεσα στους παράγοντες κινδύνου εμφάνισής της συγκεταλέγονται περιβαλλοντικοί (έκθεση σε συνθήκες στρες κατά την εμβρυϊκή ή παιδική

ηλικία, τραυματικές εμπειρίες), επιγενετικοί (αλλαγές στη μεθυλίωση DNA, τροποποίηση των ιστονών, απορρύθμιση των miRNAs) και γενετικοί παράγοντες (μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί, μεταλλάξεις). Η αλληλεπίδραση αυτών καθορίζει τελικά τον φαινότυπο της νόσου (Czarny et al., 2021).

1.4.1 Μεταβολές της έκφρασης των ci-miRNAs στις συναισθηματικές διαταραχές

Πολλαπλές μελέτες επιβεβαιώνουν την απορρύθμιση της έκφρασης των miRNAs τόσο στον ιστό που εμφανίζει την παθολογία όσο και σε επίπεδο ci-miRNAs και αφορούν miRNAs που φαίνεται πως εμπλέκονται στην παθογένεση των συναισθηματικών διαταραχών (Πίνακας 4) (Kichukova et al., 2015).

Πίνακας 4: Μεταβολή της έκφρασης διαφόρων microRNAs σε βιολογικά υγρά ασθενών με συναισθηματικές διαταραχές όπως επιλόχεια ψύχωση, κατάθλιψη μετά από αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και διπολική διαταραχή.

microRNA	Μεταβολή της έκφρασης (↑ ή ↓)	Στόχοι/Σηματοδοτικά μονοπάτια	Βιβλιογραφία (doi)
Επιλόχεια Ψύχωση (προσδιορισμός των microRNAs στα μονοκύτταρα του αίματος)			
miR-146a	↓	Δισιντεγκρίνη και μεταλλοπρωτεϊνάση (ADAM17), μεταγραφικός ρυθμιστής (EGR3), κινάση σχετιζόμενη με τον υποδοχέα ιντερλευκίνης I (IRAK2) συνθάση προσταγλανδίνης-ενδοϋπεροξειδίου, κυκλοοξυγενάση (PTGS2) (ρύθμιση της έκφρασης των 34 γονιδίων σχετιζόμενων με φλεγμονή της γονιδιακής σφραγίδας των μονοκυττάρων σε ασθενείς με διαταραχές της διάθεσης και αυτοάνοσων νοσημάτων)	https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.12.018
miR-212	↓	Χημειοκίνη (CXCL2) και συνθάση προσταγλανδίνης-ενδοϋπεροξειδίου, κυκλοοξυγενάση (PTGS2) (ρύθμιση της έκφρασης των 34 γονιδίων σχετιζόμενων με φλεγμονή της γονιδιακής σφραγίδας των μονοκυττάρων σε ασθενείς με διαταραχές της διάθεσης και αυτοάνοσων νοσημάτων)	https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.12.018
Κατάθλιψη μετά από αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (προσδιορισμός των microRNAs στο πλάσμα)			
miR-1185-1-3p	↓	Σηματοδοτικό μονοπάτι MAP κινασών, ρύθμιση κυτταροσκελετού ακτίνης, εστιακή προσκόλληση, ενδοκύττωση, γλουταμινεργικές συνάψεις	https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.12.061
miR-1234-5p	↓		https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.12.061
miR-1247-3p	↓		https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.12.061
miR-133a	↓		https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.12.061
miR-183-3p	↓		https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.12.061
miR-187-5p	↓		https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.12.061
miR-22-3p	↑		https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.12.061
miR-3184-3p	↓		https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.12.061
miR-3202	↓		https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.12.061
miR-3615	↓		https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.12.061
miR-3667-5p	↓		https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.12.061
miR-4310	↓		https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.12.061

Πίνακας 4 (συνέχεια)

microRNA	Μεταβολή της έκφρασης (↑ ή ↓)	Στόχοι/Σηματοδοτικά μονοπάτια	Βιβλιογραφία (doi)
Κατάθλιψη μετά από αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (προσδιορισμός των microRNAs στο πλάσμα)			
miR-4476	↑		https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.12.061
miR-4714-5p	↓		https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.12.061
miR-4716-3p	↓		https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.12.061
miR-4738-3p	↓		https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.12.061
miR-4769-5p	↓		https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.12.061
miR-486-5p	↑		https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.12.061
miR-548a	↓	Σηματοδοτικό μονοπάτι MAP κινασών, ρύθμιση κυτταροσκελετού ακτίνης, εστιακή προσκόλληση, ενδοκυττάρωση, γλουταμινεργικές συνά	https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.12.061
miR-5571-5p	↓		https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.12.061
miR-629-3p	↓		https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.12.061
miR-636	↓		https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.12.061
miR-665	↓		https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.12.061
miR-887	↓		https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.12.061
miR-92a-3p	↑		https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.12.061
Διπολική Διαταραχή (BD) (προσδιορισμός των microRNAs στα εξωσώματα από πλάσμα αίματος)			
miR-652-3p	↓		https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.10.038
miR-142-3p	↓	Σηματοδότηση PI3K/Akt, βιοσύνθεση/μεταβολισμός λιπαρών οξέων, εξωκυττάρια μήτρα και μονοπάτια προσκόλλησης	https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.10.038
mir-185-5p	↑		https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.10.038
miR-484	↓		https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.10.038
Διπολική Διαταραχή (BD) (προσδιορισμός των microRNAs σε λεμφοβλαστοειδή κυτταρική σειρά (LCLs))			
miR-221	↑	Υποδοχέας GABA (GABRA1), πρωτεΐνη που ρυθμίζει την εξωκύτωση στη συναπτική μεμβράνη (RIMS3), αναστολέας κυκλιν-εξαρτώμενης κινάσης (CDKN1B)	https://doi.org/10.1017/s1461145709000029
miR-34a	↑	Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGFA), ρυθμιστής απόπτωσης (BCL2)	https://doi.org/10.1017/s1461145709000029
Διπολική Διαταραχή (BD) (προσδιορισμός των microRNAs σε ιστό προμετωπιαίου φλοιού)			
mir-132	↓	Γονίδια σχετιζόμενα με την ανάπτυξη όπως μεθυλοτρανσφεράση του DNA (DNMT3A), μεταγραφικός παράγοντας (GATA2) και διυδροπυριμιδινάση (DPYSL3)	https://doi.org/10.1073/pnas.1113793109
mir-132*	↓		https://doi.org/10.1073/pnas.1113793109
Διπολική Διαταραχή (ασθενείς με επεισόδιο μανίας) (προσδιορισμός των microRNAs στο πλάσμα)			
miR-107	↑	Υποδοχέας γλουταμικού NMDA (Grin2a), κυστιδιακός μεταφορέας γλουταμικού (SLC1A4) Κινάση της κινάσης ενεργοποιούμενης από μιτογόνα (MAP2K7), ρυθμιστικός παράγοντας ιντερφερόνης (IRF1), εξοκινάση (HK2), κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνα (MAPK14), απακετυλάση ιστονών (HDAC4), κινάση τυροσίνης νευροτροφικών υποδοχέων (NTRK3)	https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.09.060
miR-125a-3p	↑	Μεταλλοπρωτεΐνάση (MMP2), απακετυλάση ιστονών (HDAC9), Δισιντεγκρίνη και μεταλλοπρωτεΐνάση (ADAM), E3 λιγάση ουβικιτίνης (MDM), κασπάση (CASP8), κινάση συνθάσης γλυκογόνου (GSK3B)	https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.09.060
miR-29a-3p	↑		https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.09.060
miR-106b-5p	↑	Αντιφλεγμονώδης κυτταροκίνη (IL-10)	https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.09.060
mir-125b-5p	↑	Πρωτεΐνη επαγόμενη από τον TNFα (TNFAIP3), μεταγραφικός παράγοντας (SMAD4), γλυκοπρωτεΐνη τύπου III (SCARB2)	https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.09.060
miR-9-5p	↑	Γλυοξυλάση I (GLO1), Παράγοντας προώθησης αύξησης νευρίτη (MDK), Κινάση που αλληλεπιδρά με τη σταθμίνη (UHMK1)	https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.09.060

Πίνακας 4 (συνέχεια)

microRNA	Μεταβολή της έκφρασης (↑ ή ↓)	Στόχοι/Σηματοδοτικά μονοπάτια	Βιβλιογραφία (doi)
Διπολική Διαταραχή – Μανία (προσδιορισμός των microRNAs στο πλάσμα)			
mir-134	↓	Κινάση με επικράτεια LIM – Ρυθμιστής δυναμικής του κυτταροσκελετού (Limk1)	https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2010.04.028
Μείζονα καταθλιπτική διαταραχή (προσδιορισμός των microRNAs στο πλάσμα)			
miR-451a	↑	Κυστιδιακός μεταφορέας γλουταμικού (SLC17A7)	https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2015.07.023
miR-17-5p	↑	Κυστιδιακός μεταφορέας γλουταμικού (SLC17A7)	https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2015.07.023
miR-223-3p	↑	Κυστιδιακός μεταφορέας γλουταμικού (SLC17A1)	https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2015.07.023
miR-320a	↓	Υποδοχέας γλουταμικού NMDA (GRIN2A) και διαταραγμένη-σε-σχίζοφρένεια πρωτεΐνη 1 (DISC1)	https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2015.07.023
miR-423-5p	↑	Κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνα (MAPK3), μεταγραφικός παράγοντας (CREB1), συνθάση λιπαρών οξέων (FASN), συνθετάση γλουταμίνης (GLUL), αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF)	https://doi.org/10.1016/j.jad.2013.12.035
miR-320d	↑	Παράγοντας προώθησης αύξησης νευρίτη (MDK)	https://doi.org/10.1016/j.jad.2013.12.035
miR-101-3p	↑	Αναστολέας απόπτωσης (BIRC5), ρυθμιστής απόπτωσης (MCL1), σταθμίνη (STMN1), κινάση Ser/Thr (PIM1), κυκλίνη D1 (CCND1), απομεθυλάση ιστονών (ARID5B), μεταγραφικός παράγοντας (RUNX), πρωτεΐνη polycomb (SUZ12), E3 λιγάση ουβικιτίνης (FBXW7)	https://doi.org/10.1016/j.jad.2013.12.035
miR-34b-5p	↑	Υποδοχέας Notch (Notch1)	https://doi.org/10.1016/j.jad.2016.01.017
miR-34c-5P	↑	Υποδοχέας Notch (Notch1)	https://doi.org/10.1016/j.jad.2016.01.017
miR-144-5p	↓	Αταξίνη-1 (ATXN1), Πρωτεϊνική κινάση C (PKC), Ρυθμιστές αναπτυξιακών διαδικασιών (Wnt/β-catenin, PTEN)	https://doi.org/10.1186/s13148-015-0099-8
mir106a-5p	↑	Αντι-φλεγμονώδης κυτταροκίνη (IL-10)	https://doi.org/10.1016/j.jad.2013.12.035
miR-101-3p	↑	Κινάση Ser/Thr (PIM1), μεταγραφικός παράγοντας (RUNX1), E3 λιγάση ουβικιτίνης (FBXW1), σταθμίνη (STMN1), ρυθμιστής απόπτωσης (MCL1), αναστολέας απόπτωσης (BIRC5), κυκλίνη D1 (CCND1), πρωτεΐνη polycomb (SUZ12), απομεθυλάση ιστονών (ARID5B)	https://doi.org/10.1016/j.jad.2013.12.035
miR-93-5p	↑	Υποδοχέας GABA (GABBR1), ομόλογο φωσφατάσης τενσίνης (PTEN), αναστολέας απόπτωσης (XIAP), μεταγραφικοί παράγοντες (HIF1A, MTF1)	https://doi.org/10.1016/j.jad.2013.12.035
Μείζονα καταθλιπτική διαταραχή (προσδιορισμός των microRNAs στον ορό)			
miR-124-3p	↑	Μοριακό τσαπερόνιο (Hsp90ab1), υπομονάδα του συμπλόκου mTor (Akt1s1), υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών (Nr3c1, Nr3c2), υποδοχείς γλουταμικού AMPA (Gria3, Gria4), υποδοχείς γλουταμικού NMDA (Grin2a, Grin2b)	https://doi.org/10.1038/npp.2016.175
miR-132	↑	Εγκεφαλικός νευροτροφικός παράγοντας (BDNF)	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063648
miR-182	↑	Εγκεφαλικός νευροτροφικός παράγοντας (BDNF)	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063648
miR-34a-5p	↑	Εγκεφαλικός νευροτροφικός παράγοντας (BDNF), απακετυλάση (SIRT1), κινάση Ser/Thr (AKT), υποδοχέας σεροτονίνης (HTR2C), υποδοχέας εκλυτικής ορμόνης κορτικοτροπίνης (CRHR1), μεταφορέας διεγερτικών αμινοξέων (SCL1A2)	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121975
miR-221-3p	↑	Κινάση Ser/Thr (AKT), υποδοχέας σεροτονίνης (HTR2C), υποδοχέας εκλυτικής ορμόνης κορτικοτροπίνης (CRHR1), μεταφορέας διεγερτικών αμινοξέων (SCL1A2)	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121975
miR-451a	↓	Κινάση Ser/Thr (AKT), υποδοχέας σεροτονίνης (HTR2C), υποδοχέας εκλυτικής ορμόνης κορτικοτροπίνης (CRHR1), μεταφορέας διεγερτικών αμινοξέων (SCL1A3)	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121975
let-7d-3p	↑	Εγκεφαλικός νευροτροφικός παράγοντας (BDNF)	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121975
mir-155-5p	↑	Εγκεφαλικός νευροτροφικός παράγοντας (BDNF)	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121975

Πίνακας 4 (συνέχεια)

microRNA	Μεταβολή της έκφρασης (↑ ή ↓)	Στόχοι/Σηματοδοτικά μονοπάτια	Βιβλιογραφία (doi)
Μείζονα καταθλιπτική διαταραχή (προσδιορισμός των microRNAs σε εξωκυτταρικά κυστίδια ορού)			
miR-1207	↑	Υποδοχέας καϊνικού (GRIK30), συνθετάση γλουταμίνης (GLUL), ουδέτερος στο νάτριο μεταφορέας αμινοξέων (SLC38A3), G πρωτεΐνη (GNAI2), μεταβοτροπικοί υποδοχείς γλουταμικού (GRM4), φωσφολιπάση A2 (PLA2G4F), υποδοχείς γλουταμικού NMDA (Grin2a), πρωτεΐνη μετασυναπτικής πυκνότητας (DLG4)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049
miR-219b-5p	↑	Πρωτεϊνική κινάση εξαρτώμενη από Ca^{2+} /καλμοδουλίνη (CaMKIIγ)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049
miR-7152-5p	↑	Υποδοχείς γλουταμικού NMDA (Grin2a), Υποδοχείς γλουταμικού AMPA (Gria4)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049
miR-615-5p	↑	Πρωτεΐνη σχετιζόμενη με τον κυτταροσκελετό (CLIP3), Γλυκοπρωτεΐνη (STC1)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049
miR-1587	↑	Πρωτεΐνη σχετιζόμενη με στενοσυνδέσμους (TJAP1), Πρωτεΐνη αλληλεπίδρασης με το DNA (ZSWIM5), Παράγοντας εκκίνησης μετάφρασης (EIF5)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049
miR-1471	↑	Πεπτιδάση (KLK9), Διαμεμβρανική πρωτεΐνη (TMEM94), Συστατικό εξωκύστης (EXOC3)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049
miR-6887-3p	↑	Σπεκτρίνη (SPTBN4), β-1,4-γαλακτόζυλοτρανσφεράση (B4GALT2)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049
miR-4433a-3p	↑	Ανοσοτροποποιητικός παράγοντας (PIBF1)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049
miR-4433b-5p	↑	Κινάσης της κινάσης εξαρτώμενη από Ca^{2+} /καλμοδουλίνη (CaMKK2), Παλμιτοϋλο-υδρολάση (ABHD13), μεταγραφικός παράγοντας (SOX6)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049
miR-5192	↑	Απομεθυλάση (KDM3B), Τροποποιητής ουβικουτινιλίσωσης (ABRAXAS2)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049
miR-3667-5p	↑	Πρωτεΐνη σύνδεσης του c-myc (MYCBP), πρωτεΐνη που συνδέεται με την αταξίνη (RBFox1), Μεταγραφικός παράγοντας (HOXD10)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049
miR-4776-3p	↑	Μεταγραφικός παράγοντας (ZNF99, ZNF493, ZNF138), προφλεγμονώδης κυτταροκίνη (CXCL5)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049
miR-205-5p	↑	Ρυθμιστής νευρωνικής διαφοροποίησης (MOSMO), πρωτεΐνη που συνδέεται με RNA (BICC1), φωσφατάση (PPP2R2D), ενεργοποιητής GTPάσης (CHN1), Κυκλινεξαρτώμενη κινάση (CDK19), πρωτεΐνη αλληλεπίδρασης με Rab11 (RAB11FIP1)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049
miR-1236-5p	↑	Μεταφορέας πρωτεϊνών στον πυρήνα – Σηματοδότηση Wnt (TMCO6)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049
miR-769-5p	↑	Ρυθμιστής μετασυναπτικής πυκνότητας (LRRTM2), πρωτεΐνη αλληλεπίδρασης με λιγάσες ουβικτινίνης (BEAN1), πρωτεΐνη τύπου συναπτοταγμίνη (SYTL2), φωσφομονοεστεράση (BPNT1)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049
miR-760	↑	Υποδοχέας εφρίνης – Σηματοδότηση NMDA (EPHB2), ρυθμιστής συναπτικής πλαστικότητας (ARC), αταξίνη (ATXN7), ρυθμιστής χρωματίνης (ANKRD11), πρωτεΐνη αλληλεπίδρασης με το DNA (ZSWIM6)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049
miR-557	↑	Κινάση εξαρτώμενη από Ca^{2+} /καλμοδουλίνη (CAMK4), ρυθμιστής μεταγραφής (BACH2), πρωτεΐνη προσαρμογέας (ZER1), πρωτεΐνη πρόσδεσης RNA (RBMS3), τασεο-εξαρτώμενος διάλυος Na^{+} (SCN3A), πρωτεΐνη αργοναύτης (AGO3), Ενεργοποιητής καταρράκτη MAP κινασών (TAOK1)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049
miR-6735-3p	↓	Μικρή GTPάση (RHOBTB1), Νουκλεοπορίνη (NDC1)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049
miR-6833-5p	↓	Κυστιδιακός μεταφορέας γλουταμικού (SLC2A13), πρωτεΐνη σχετιζόμενη με μικροσωληνίσκους (MAP1B), πρωτεΐνη που συνδέεται με μικροσωληνίσκους (CEP41), κινάση διακυλογλυκερόλης (DGKH)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049
miR-615-3p	↓	Συστατικό πρωτεασώματος (PSMD11)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049
miR-8052	↓	Μεταγραφικός καταστολέας (PRDM6), πρωτεΐνη αγκυροβόλησης (GAB2)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049

Πίνακας 4 (συνέχεια)

microRNA	Μεταβολή της έκφρασης (↑ ή ↓)	Στόχοι/Σηματοδοτικά μονοπάτια	Βιβλιογραφία (doi)
Μείζονα καταθλιπτική διαταραχή (προσδιορισμός των microRNAs σε εξωκυτταρικά κυστίδια ορού)			
miR-34c-3p	↓	Πρωτεΐνη σκαλωσιάς (MAGI3), συστατικό συμπλόκου σχηματισμού ελασματοποδίων (NCKAP1), Ρυθμιστής λυσοσωμικής μεταφοράς (LYST)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049
miR-4433a-5p	↓	Φωσφατάση τυροσίνης (PTPN12), πρωτεΐνη πρόσδεσης RNA (ZFP36L1)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049
miR-134-5p	↓	Συστατικό του σωματίου ματίσματος (ZMAT5), ρυθμιστική υπομονάδα φωσφατάσης (PPP1R7), συστατικό της μεμβράνης (KIAA0040)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049
miR-6798-5p	↓	Ρυθμιστική υπομονάδα φωσφατάσης (PPP2R2D), κινάση φρουκτοζαμινών (FN3K), α1-αντιθρυψίνη (SerpinA1), τροποποιητής χρωματίνης (TADA1)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049
miR-4448	↓	Ριβονουκλεάση (PAN3), γονίδιο άγνωστης λειτουργίας (FAM177A1), απομεθυλάση ιστονών (ARID2), παράγοντας αναδιאμόρφωσης νουκλεοσώματος (BPTF)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049
miR-5589-5p	↓	Μεταγραφικός παράγοντας (HEYL), Αδενυλοτρανσφεράση (NMNAT2)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049
miR-3677-5p	↓	Ουριδυλο-τρανσφεράση (TUT7), πουρινεργικός υποδοχέας (P2RY13), κυτόχρωμα P450 (CYP27B1)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049
miR-6744-3p	↓	Πρωτεϊνική κινάση C (PRKCA), πρωτεΐνη προσαρμογέας (SH3KBP1), διαμεμβρανική πρωτεΐνη (TMEM178B)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049
miR-6086	↓	Συστατικό φιλπάσης (TMEM30B), πρωτεΐνη αργοναύτης (AGO1), μεταγραφικός παράγοντας (ZFP82)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049
miR-196a-3p	↓	Μαννοζυλοτρανσφεράση (DPY19L3), ρυθμιστής μεταγραφής (ASXL3), μεταγραφικός παράγοντας (SRF), γονίδιο άγνωστης λειτουργίας (CCDC28A), παράγοντας ADP-ριβοζυλίωσης (ARF4)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049
miR-23a-5p	↓	Πρωτεΐνη σκαλωσιάς (GIPC3), Φωσφατάση (MTMR4), μεταφορέας ABC (ABCA1), μόριο προσκόλλησης (VSIG1)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049
miR-128-2-5p	↓	G πρωτεΐνη (GNG13), μεταγραφικός συγκαταστολέας (CBFA2T3)	https://doi.org/10.1016/j.bionps.2022.100049

Το προφίλ έκφρασης των cimiRNAs που προέρχονται από διαφορετικά βιολογικά υγρά έχει συσχετισθεί με διαφορετικές παθολογικές (ψυχιατρικές ή νευρολογικές) καταστάσεις, υποδεικνύοντας ότι αυτό το μοτίβο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοριακή ταυτότητα για τον χαρακτηρισμό της εκάστοτε νόσου (Sohel et al., 2016). Υπάρχουν πολυάριθμες βιβλιογραφικές αναφορές που επιβεβαιώνουν τη μεταβολή της έκφρασης (↑ ή/και ↓) miRNAs σε ασθενείς με συναισθηματικές διαταραχές, όπως η κατάθλιψη ή η διπολική διαταραχή, σε διάφορα βιολογικά υγρά συγκριτικά με υγιή άτομα όπως και την επίδραση της χορήγησης αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στα επίπεδα έκφρασής τους στους πάσχοντες (Kichukova et al., 2016) (Πίνακας 4).

1.4.2 Ο πιθανός ρόλος των microRNAs στην παθοφυσιολογία των συναισθηματικών διαταραχών

Αν και η έρευνα για την παθοφυσιολογία των συναισθηματικών διαταραχών και ιδιαίτερα της κατάθλιψης έχει εμπλουτισθεί σημαντικά, κανένας μεμονωμένος μηχανισμός δεν μπορεί να εξηγήσει επαρκώς όλες τις εκφάνσεις αυτών των διαταραχών. Για παράδειγμα στην κατάθλιψη

υπάρχουν διάφορες υποθέσεις σχετικά με τους μοριακούς μηχανισμούς που εμπλέκονται οι κυριότερες εκ των οποίων περιλαμβάνουν την υπόθεση των μονοαμινών, τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (YYE) που σχετίζεται με αποκρίσεις στρες, τη νευροπλαστικότητα, τόσο σε δομικό επίπεδο στις συνάψεις όσο και σε λειτουργικό και τη νευροφλεγμονή (Ding et al., 2023). Παράγοντες όπως η εντερική δυσβίωση, που αφορά αλλαγές στη σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος, το οξειδωτικό στρες και αλλαγές στο κερκάδιο ρολόι φαίνεται επίσης να εμπλέκονται στην παθογένεση της νόσου (Ortega et al., 2021). Σε αυτό το πλαίσιο τα miRNAs είναι ικανά να ρυθμίσουν πολλούς στόχους και παράγοντες που μπορεί να εμπλέκονται των συναισθηματικών διαταραχών.

I. Ο ρόλος των microRNAs στη νευροδιαβίβαση

Για τουλάχιστον έξι δεκαετίες η απορρύθμιση των μονοαμινεργικών νευροδιαβιβαστών (σεροτονίνη, νοραδρεναλίνη, ντοπαμίνη) θεωρούνταν η κυριότερη αιτία εμφάνισης της κατάθλιψης και τα περισσότερα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν στην κλινική πράξη βασίστηκαν σε αυτή την αρχή (Ding et al., 2023). Πράγματι, διάφοροι νευροδιαβιβαστές όπως οι μονοαμίνες (↓ στην κατάθλιψη), το GABA, το γλουταμικό και νευροπεπτίδια όπως η ουσία P (↑ στην κατάθλιψη) εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία συναισθηματικών διαταραχών (Ding et al., 2023). Οι νευροδιαβιβαστές αυτοί προκειμένου να απελευθερωθούν στη συναπτική σχισμή και να ασκήσουν τη δράση τους, ακολουθούν μία συγκεκριμένη πορεία από τη στιγμή της παραγωγής τους έως την απελευθέρωσή τους στη συναπτική σχισμή. Από τους νευροδιαβιβαστές αυτούς οι μονοαμίνες απομακρύνονται από την συναπτική σχισμή προς τον προσυναπτικό νευρώνα μέσω ειδικών μεταφορέων (Xu et al., 2019).

Πολλά αντικαταθλιπτικά φάρμακα όπως τα SSRIs (Selective serotonin reuptake inhibitors) στοχεύουν σε αυτούς τους μεταφορείς επαναπρόσληψης (Ding et al., 2023). Τα miRNAs μπορεί να στοχεύουν επίσης φαρμακολογικούς στόχους των SSRIs. Για παράδειγμα, μελέτες δείχνουν ότι η προσαρμοστική απόκριση στη φλουοξετίνη οφείλεται στη δράση του miR-16 που στοχεύει τον μεταφορέα σεροτονίνης (Serotonin reuptake transporter - SERT) (Baudry et al., 2019). Στους πυρήνες της ραφής, η φλουοξετίνη, που στοχεύει επίσης τον SERT, φαίνεται ότι προωθεί την ωρίμανση του miR-16, το οποίο με τη σειρά του ενισχύει το θεραπευτικό αποτέλεσμα, εγκαθιδρύοντας έναν βρόχο θετικής ανάδρασης. Λόγω της δράσης αυτής των miRNAs σε φαρμακολογικούς στόχους, θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν ως βιοδείκτες της απόκρισης των ασθενών στη θεραπεία με αντικαταθλιπτικά φάρμακα (Baudry et al., 2019).

Εκτός από αυτό, σε ασθενείς με μείζονα καταθλιπτική διαταραχή (Major Depression Disorder – MDD) έχει παρατηρηθεί η αλλαγή της έκφρασης ορισμένων ήδη απορρυθμισμένων cimiRNAs

ύστερα από θεραπεία με SSRI. Τα επίπεδα του miR135a, για παράδειγμα, που είναι μειωμένα στον εγκέφαλο και στην κυκλοφορία των ασθενών με MDD, μετά από θεραπεία με SSRI παρουσιάζουν σημαντική αύξηση στον ραχιαίο πυρήνα της ραφής (Zhou et al., 2021). Η υπερέκφραση του miR-135a αναστέλλει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το σεροτονινεργικό σύστημα (serotonergic-linked genes), με αποτέλεσμα την αύξηση της σεροτονίνης στη συναπτική σχισμή, που σχετίζεται με μείωση των συμπτωμάτων κατάθλιψης (Zhou et al., 2021). Η εμβάθυνση σε τέτοιου είδους έρευνες θα βοηθούσε περαιτέρω στην κατανόηση του τρόπου δράσης και παρενεργειών των αντικαταθλιπτικών θεραπειών (Zhou et al., 2021).

II. Ο ρόλος των microRNAs στη συναπτική πλαστικότητα

Η συναπτική πλαστικότητα αφορά την ικανότητα της σύνδεσης μεταξύ δύο νευρώνων να αλλάζει ως απόκριση στη νευρική δραστηριότητα ώστε να συντονίζεται στο σύνολό της η εγκεφαλική λειτουργία. Σε άτομα με συναισθηματικές διαταραχές έχουν παρατηρηθεί, με απεικονιστικές μεθόδους, ανωμαλίες στη λειτουργική συνδεσιμότητα μεταξύ μικροκυκλωμάτων σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου (Crabtree & Gogos, 2014). Έτσι, αλλαγές στη συναπτική πλαστικότητα έχουν συσχετισθεί με την παθογένεση αυτών των ασθενειών (Duman et al., 2016).

Ο ρόλος των miRNAs στη συναπτική πλαστικότητα είναι αρκετά κατανοητός χάρη σε *in vitro* και *in vivo* πειράματα κυρίως σε νευρώνες ποντικών. Τα κυριότερα miRNAs που συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια ρύθμισης αυτής της διαδικασίας είναι τα miR-9, miR-124, miR-132, miR-134. Το miR-134 είναι ένα ειδικό για τον εγκέφαλο microRNA και βρίσκεται στις συνάψεις νευρώνων του ιπποκάμπου. Πειράματα σε καλλιέργειες ιπποκάμπου ποντικού έδειξαν ότι το miR-134 ρυθμίζει αρνητικά το μέγεθος των δενδριτικών ακανθών επηρεάζοντας έτσι την ισχύ των διεγερτικών συνάψεων καθώς αναστέλλει τη μετάφραση του mRNA της *Limk1*, μιας κινάσης η που φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον CREB στον πυρήνα κατά την LTP (Schratt et al., 2006). Η ενεργοποίηση του CREB έχει ως αποτέλεσμα τη μεταγραφή και μετάφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την πλαστικότητα (plasticity-related proteins - PRPs) που βοηθούν στη διατήρηση των συναπτικών αλλαγών, όπως είναι η αύξηση των δενδριτικών ακανθών και η κατανομή των υποδοχέων γλουταμικού τύπου AMPA (AMPA-type glutamate receptors – AMPARs) (Schratt et al., 2006). Έτσι, το miR-134 φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες της συναπτικής ανάπτυξης και πλαστικότητας.

Το 2020, οι Zhang et al. δεδομένου αυτού αλλά και της συσχέτισης των συναισθηματικών διαταραχών με ανωμαλίες στη συναπτική λειτουργία, εξέτασαν τα επίπεδα έκφρασης του miR-134 στο αίμα σε ασθενείς με κατάθλιψη, με διπολική διαταραχή, με σχιζοφρένεια και σε υγιή

άτομα για χρήση του ως πιθανό βιοδείκτη (Zhang HP et al., 2020). Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την υπόθεση και η έκφραση του συγκεκριμένου miRNA βρέθηκε απορρυθμισμένη και στις τρεις ομάδες των ασθενών με την ομάδα των καταθλιπτικών να εμφανίζει τα χαμηλότερα επίπεδα.

III. Ο ρόλος των microRNAs σε αποκρίσεις στρες

Οι γενετικοί πολυμορφισμοί, που αποτελούν μια μορφή «γενετικής επιρρέπειας» μαζί με την επιρροή περιβαλλοντικών παραγόντων στην παιδική ηλικία, την κακοποίηση και το χρόνιο στρες καθορίζουν ένα συγκεκριμένο φαινότυπο στο ΚΝΣ σε μοριακό επίπεδο, που χαρακτηρίζεται από αύξηση της δραστηριότητας του άξονα υποθαλάμου υπόφυσης επινεφριδίων (YYE) και των επιπέδων κορτιζόλης, της ορμόνης του στρες. Παράλληλα, η γνωστική και συναισθηματική ευαισθησία που προέρχεται από όλους αυτούς τους παράγοντες μπορεί τελικά να οδηγήσει στην εμφάνιση κατάθλιψης (Ortega et al., 2021). Τα τραυματικά γεγονότα κατά την παιδική ηλικία μπορούν να επιφέρουν μόνιμες δομικές και λειτουργικές αλλαγές στο νευρικό σύστημα. Αυτές οι αλλαγές μπορούν να επάγουν και βιολογικές αλλαγές, όπως είναι η αύξηση του εκλυτικού παράγοντα κορτικοτροπίνης (Corticotropin releasing factor - CRF) (Tafet & Nemeroff, 2016). Έτσι, οι μοριακές αλλαγές σε διαφορετικά κυκλωμάτα (μοριακή επιρρέπεια), οι γνωστικές και συναισθηματικές αλλαγές μπορούν τελικά να αυξήσουν την ευαισθησία του ατόμου για την ανάπτυξη συμπτωμάτων άγχους και κατάθλιψης (Tafet & Nemeroff, 2016).

Είναι γνωστό ότι το στρες προκαλεί αλλαγές στη νευρωνική συνδεσιμότητα, τη σηματοδότηση και τη δενδριτική αναδιοργάνωση (Tafet & Nemeroff, 2016). Για την πρόκληση αυτών των αλλαγών, το περιβάλλον «αλληλεπιδρά» με τη γονιδιακή λειτουργία μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων (Pierouli et al., 2022). Τα miRNAs μπορούν να μεσολαβούν κυτταρικές αποκρίσεις σε συνθήκες στρες οδηγώντας στην αποκατάσταση ή τον επαναπρογραμματισμό των ίδιων τους γονιδίων, τροποποιώντας την έκφραση ορισμένων άλλων miRNAs ή επηρεάζοντας τον τρόπο δράσης ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων (Pierouli et al., 2022). Συγχρόνως, τα miRNAs δρουν ως άμεσοι ρυθμιστές των υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών (GRs) μέσω υβριδισμού τους με την 3'UTR των μεταγράφων των GR, εμποδίζοντας την πρωτεϊνοσύνθεση (Pierouli et al., 2022).

Σε μια μελέτη οι Allen και Dwivedi εξέτασαν πιθανά miRNAs σχετιζόμενα με ELS (Early Life Stress) και τη σχέση τους με την κατάθλιψη και την αυτοκτονική συμπεριφορά. Μελέτες σε δείγματα εγκεφαλικού ιστού τρωκτικών που αποχωρίστηκαν τη μητέρα τους (Bai et al., 2012; Bahi et al., 2016; Morrison et al., 2016; Uchida et al., 2010) όπως και κλινικές μελέτες στο αίμα ατόμων με ιστορικό τραύματος σε παιδική ηλικία (Cattane et al., 2019), έδειξαν ότι το miR-16,

miR-29, miR-124, miR-125 και miR-200 ήταν τα συχνότερα miRNAs που μετέβαλλαν την έκφρασή τους. Αυτή η απορρύθμιση των miRNAs που σχετίζεται με μετα-εμβρυϊκό στρες πιθανώς να αποτελεί έναν συνδετικό κρίκο με την εμφάνιση κατάθλιψης και αυτοκτονικής συμπεριφοράς αργότερα στη ζωή (Allen & Dwivedi, 2020).

Ο ιππόκαμπος είναι η καλύτερα μελετημένη περιοχή του εγκεφάλου στην έρευνα για την κατάθλιψη. Το γεγονός ότι περιέχει υψηλά επίπεδα υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών και ρυθμίζει τον άξονα ΥΥΕ, καθιστά την περιοχή αυτή πιο επιρρεπή στο στρες και την κατάθλιψη. Η πλαστικότητα του ιπποκάμπου στην κατάθλιψη περιλαμβάνει αλλαγές στο μέγεθος (όγκο), στη νευρογένεση και απόπτωση νευρώνων (Xu YY et al., 2019). Μελέτες έδειξαν ότι η υπερέκφραση του miR-16 στον ιππόκαμπο είχε αρνητική επίδραση σε αρουραίους σε ένα μοντέλο στρες παιδικής ηλικίας πιθανόν μέσω ελάττωσης της έκφρασης του BDNF (Bai et al., 2012).

IV. Ο ρόλος των microRNAs στη νευροφλεγμονή

Πρόσφατα, η κατάθλιψη έχει χαρακτηριστεί ως μία διαταραχή σχετιζόμενη με τη μικρογλοία (Wang et al., 2022). Διάφορα χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τη φλεγμονή παρατηρούνται στην κατάθλιψη:

- Συστημική φλεγμονή με αυξημένα επίπεδα προ-φλεγμονωδών και μειωμένα επίπεδα αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών στην κυκλοφορία
- Μείωση σε μέγεθος και πυκνότητα νευρικών και γλοιακών κυττάρων (κυρίως ολιγοδενδροκυττάρων)
- Αύξηση του αριθμού και ανώμαλη ενεργοποίηση μικρογλοίας

Η μικρογλοία παίζει σημαντικό ρόλο, εκτός από την παραγωγή κυτταροκινών κατά τις ανοσιακές απαντήσεις, στον έλεγχο του θανάτου των νευρώνων, τη νευρογένεση και τις συναπτικές αλληλεπιδράσεις (Brites & Fernandes, 2015). Απαραίτητη προϋπόθεση ώστε να συντονίζονται οι κυτταρικές λειτουργίες είναι η επικοινωνία μεταξύ νευρώνων – γλοιακών κυττάρων, κάτι το οποίο επιτυγχάνεται μέσω της απελευθέρωσης εξωσωμάτων και εκτοσωμάτων που περιέχουν mRNAs, miRNAs και πρωτεΐνες. Είναι λογικό να υποθέσει κανείς ότι τα miRNAs μεσολαβούν τη διασταυρούμενη επικοινωνία μεταξύ νευρώνων, νευρογλοιακών κυττάρων και ανοσοποιητικών κυττάρων και παίζουν κεντρικό ρόλο στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις που παρατηρούνται στην MDD (Brites & Fernandes, 2015).

Ερεθίσματα σχετιζόμενα με κατάθλιψη: μία περιφερική ή κεντρική φλεγμονή (όπου εξωσώματα από μονοκύτταρα της περιφέρειας μεταφέρουν το φορτίο τους στο ΚΝΣ), καταστάσεις σχετιζόμενες με στρες (όπως η αύξηση των γλυκοκορτικοειδών μέσω του άξονα ΥΥΕ, αλλαγές στο εντερικό μικροβίωμα ή ψυχολογικό στρες συνοδευόμενο από απελευθέρωση

αλαρμινών στον εγκέφαλο) ή μια έντονη νευρωνική δραστηριότητα μπορούν να οδηγήσουν στην μετατροπή ενός μικρογλοιακού κυττάρου – επόπτη σε δραστική μικρογλοία με υπερτροφικά χαρακτηριστικά (Brites & Fernandes, 2015; Ding et al., 2023). Η δραστική μικρογλοία εκτός από την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1β, IL-6, TNFα) έχει την ικανότητα να απελευθερώσει εξωκυτταρικά κυστίδια εξυπηρετώντας την επικοινωνία κυττάρου - κυττάρου. Τα εξωσώματα μπορούν να δράσουν ως φορείς ανώμαλα εκφρασμένων κυτταρικών microRNAs, που επιλεκτικά πακετάρονται και μεταφέρονται, οδηγώντας τελικά σε απορρυθμισμένη γονιδιακή έκφραση στο κύτταρο – αποδέκτη (Gupta and Pulliam, 2014).

Οι Sun et al. μελέτησαν τον ρόλο του miR-155 στη νευρογλοία και σε νευρώνες ιπποκάμπου. Το miR-155 στον ορό καταθλιπτικών ασθενών παρουσιάζει αυξημένη έκφραση (Wan et al., 2015) και έχει βρεθεί ότι *in vitro* μειώνει τη βιωσιμότητα των μικρογλοιακών κυττάρων και των νευρώνων του ιπποκάμπου ποντικών, απορρυθμίζοντας την έκφραση πρωτεϊνών ρυθμιστών της απόπτωσης (Sun et al., 2019). Επίσης, το miR-155 μπορεί να ρυθμίσει τη σηματοδότηση που μεσολαβείται από υποδοχείς τύπου Toll (Toll-like receptors - TLRs), από τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης 1 (Interleukin-1 receptor - IL-1R), από την οικογένεια των υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης όγκων (Tumor necrosis factor receptors - TNFRs), από τον υποδοχέα ιντερφερόνης τύπου I (Interferon-α/β receptor – IFNAR), κρίσιμα μόρια της στρατολόγησης του φλεγμονοσώματος (Sun et al., 2019).

Πειραματικά δεδομένα από μελέτες σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου από ποντίκια (Fan Z et al., 2016) όπως και ορό από ανθρώπους (Zhou Y et al., 2016) δείχνουν ότι τα miRNAs μπορεί να επηρεάζουν άμεσα τον ανοσολογικό μηχανισμό στοχεύοντας συστατικά του φλεγμονοσώματος, ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου που μεσολαβεί τη διάσπαση των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών και ενορχηστρώνει τα γεγονότα ανοσοπαθογένεσης της κατάθλιψης (Boxberger et al., 2019).

V. microRNAs και επιγενετικοί μηχανισμοί

Το στρες και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν τη νευρωνική λειτουργία και συμπεριφορά, παροδικά ή μόνιμα μέσω μονοπατιών μεταγωγής σήματος που ρυθμίζουν την κυτταρική λειτουργία. Οι αλλαγές αυτές μπορεί να είναι μόνιμες και να συνεισφέρουν σε ευαισθησία του στρες δια βίου ύστερα από κάποιο τραύμα σε παιδική ηλικία (Duman et al., 2016).

Ένας από τους καλύτερα μελετημένους μηχανισμούς για μόνιμες αλλαγές στην έκφραση γονιδίων είναι μέσω επιγενετικών μεταβολών. Οι επιγενετικοί μηχανισμοί αλλάζουν τη συγγένεια του DNA με διάφορες ρυθμιστικές πρωτεΐνες ή/και τη σύνδεση με πρωτεΐνες που διατηρούν την υψηλής-τάξης αρχιτεκτονική των χρωμοσωμάτων (π.χ. αναδιάταξη χρωματίνης) (Menke &

Binder, 2014). Στους μηχανισμούς αυτούς ανήκουν η μεθυλίωση του DNA, η μεθυλίωση ιστονών και η ακετυλίωση ιστονών (Pal et al., 2015). Έτσι, το γονιδίωμα διαχωρίζεται σε περιοχές ευχρωματίνης, που χαρακτηρίζονται από υψηλή ακετυλίωση ιστονών και χαμηλή μεθυλίωση DNA, καθιστώντας το προσβάσιμο στον μεταγραφικό μηχανισμό και σε περιοχές ετεροχρωματίνης, που χαρακτηρίζονται από υψηλή μεθυλίωση DNA, χαμηλή ακετυλίωση ιστονών και είναι μεταγραφικά ανενεργές (Pal et al., 2015). Μελέτες EWAS (Epigenome-wide association studies) σε μοντέλα τρωκτικών και σε καταθλιπτικούς ασθενείς, τόσο σε δείγματα εγκεφαλικού ιστού όσο και αίματος, αναφέρουν επιγενετικές αλλαγές προκαλούμενες από στρες και συμπεριφορές σχετιζόμενες με κατάθλιψη (Menke & Binder, 2014).

Ορισμένα miRNAs (epi-miRs) μπορούν να ελέγχουν την έκφραση επιγενετικών τροποποιητών όπως γονίδια των μεθυλοτρανσφερασών του DNA (DNA methyltransferases - DNMTs) και απακετυλασών των ιστονών (Histone deacetylases - HDACs) (Sharrouf & Suchkova, 2021). Από την άλλη, επιγενετικά ένζυμα μπορούν να ρυθμίζουν την προσβασιμότητα των γονιδίων που κωδικοποιούν miRNAs (Weber et al., 2005). Ταυτόχρονα, και άλλα μη κωδικοποιητικά RNAs, τα circRNAs, μπορούν να δεσμεύουν περισσότερα από ένα miRNAs σε μία δεδομένη στιγμή ('spongeing') ελέγχοντας με αυτόν τον τρόπο τη βιοδιαθεσιμότητά τους (Allen & Dwivedi, 2020). Δεδομένου αυτού, η αλληλεπίδραση μεταξύ miRNAs και μονοπατιών επιγενετικής σχηματίζει ένα σύνθετο κύκλωμα ρύθμισης του συνόλου της γονιδιακής έκφρασης, με συνέπεια η κατανόηση των μοριακών γεγονότων της κατάθλιψης να καθίσταται ακόμη πιο πολύπλοκη (Pal et al., 2015).

1.4.3 Ο ρόλος του miR-16 και του miR-511 στις συναισθηματικές διαταραχές

I. miR-16

Πρόσφατες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη δράση συγκεκριμένων miRNAs στο σεροτονινεργικό σύστημα, που ως γνωστό εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία της κατάθλιψης (Gheysarzadeh et al., 2018). Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι το miR-16 ρυθμίζει ισχυρά την έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί για τον μεταφορέα σεροτονίνης (SERT) (Gheysarzadeh et al., 2018). *In vitro* πειράματα σε μία νευροεξωδερμικής προέλευσης κυτταρική σειρά, την 1C11, έδειξαν ότι η υπερέκφραση του miR-16 προκαλεί τη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του μεταφορέα SERT (Baudry et al., 2010). Μάλιστα, η στόχευση του ενδογενούς miR-16 από ένα εξωγενές μόριο-ανταγωνιστή, anti-miR-16, έδειξε ότι το συγκεκριμένο miRNA μπορεί να επιδράσει στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των συγκεκριμένων κυττάρων, καθορίζοντας αν θα αποκτήσουν σεροτονεργικές ή νοραδρενεργικές ιδιότητες, που αφορούν για παράδειγμα τον μεταβολισμό των

κυττάρων (όπως την ικανότητα να συνθέτουν, να αποθηκεύουν και να αποικοδομούν τη σεροτονίνη) (Baudry et al., 2010). Η μείωση του miR-16 σε νοραδρενεργικούς νευρώνες προκαλεί τη *de novo* έκφραση του SERT.

Παράλληλα, οι ίδιοι ερευνητές εξέτασαν την ύπαρξη ή όχι μιας συσχέτισης αυτών των ευρημάτων *in vivo*. Σε ποντίκια, η χρόνια θεραπεία με φλουοξετίνη, το βασικότερο αντικαταθλιπτικό φάρμακο πρώτης γενιάς, αυξάνει τα επίπεδα του miR-16 στους σεροτονεργικούς πυρήνες της ραφής, μειώνοντας την έκφραση του SERT (Moya et al., 2013). Εκτός αυτών, η έκθεση της συγκεκριμένης περιοχής του στελέχους στη φλουοξετίνη οδηγεί στην απελευθέρωση του νευροτροφικού παράγοντα S100β που δρα στα νοραδρενεργικά κύτταρα του υπομέλανα τόπου. Η παρακρινής δράση του S100β έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων του miR-16 και τελικά την έκφραση σεροτονεργικών λειτουργιών στους νοραδρενεργικούς νευρώνες (Baudry et al., 2010). Επομένως, το miR-16 δρα ως κεντρικός ρυθμιστής της έκφρασης του SERT και ρυθμίζει την προσαρμοστική απόκριση των σεροτονεργικών και νοραδρενεργικών νευρώνων στα αντικαταθλιπτικά, όπως η φλουοξετίνη.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ευρήματα που αφορούν την απορρυθμισμένη έκφραση του miR-16 τόσο στον εγκέφαλο τρωκτικών όσο και στο αίμα ατόμων που έχουν υποστεί κάποια μορφή στρες σε πρώιμη ηλικία, όπως αναφέρεται και παραπάνω (Allen & Dwivedi, 2020). Επίσης, σε μία μελέτη ασθενών – μαρτύρων τα επίπεδα του miR-16 βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικά ελαττωμένα στον ορό ασθενών με καταθλιπτική διαταραχή συγκριτικά με τα υγιή άτομα που συμμετείχαν (Gheysarzadeh et al., 2018). Επομένως, το miR-16, όντας ένα καλά μελετημένο μόριο, ανοίγει ένα νέο παράθυρο στην εύρεση βιοδεικτών για ασθένειες όπως οι συναισθηματικές διαταραχές.

II. miR-511

Παρά το ότι υπάρχουν όλο και περισσότερα στοιχεία που φανερώνουν διαταραχές της πλαστικότητας σε επίπεδο κυττάρου στις περιοχές του μεταιχμιακού συστήματος του εγκεφάλου σε περιπτώσεις κατάθλιψης, οι ακριβείς μηχανισμοί που διαμορφώνουν αυτές τις δυσλειτουργίες δεν έχουν διευκρινιστεί σαφώς. Εντός του βασηοπλευρικού τμήματος της αμυγδαλής, το στρες οδηγεί σε σημαντικές νευροπλαστικές προσαρμογές (Maheu et al., 2015). Κύριοι μεσολαβητές αυτής της διαδικασίας αποτελούν οι νευροτροφίνες – ο ρόλος των οποίων έχει μελετηθεί αρκετά στην κατάθλιψη και θεωρούνται υποψήφιοι φαρμακολογικοί στόχοι (Maheu et al., 2015). Με εξαίρεση τον BDNF, υπάρχει ελάχιστη βιβλιογραφία για την εμπλοκή των υπόλοιπων παραγόντων σε αυτές τις παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Ο GDNF (Glial Derived Neurotrophic Factor), που έχει μελετηθεί κυρίως στα πλαίσια της νόσου Πάρκινσον, παίζει ρόλο στην

ομοιόσταση της ντοπαμίνης, επιδρώντας στα ένζυμα που μεσολαβούν την σύνθεση, την επαναπρόσληψη και την αποικοδόμησή της με διάφορους τρόπους π.χ. διέγερση φωσφορυλίωσης της υδροξυλάσης τυροσίνης (Tenenbaum et al., 2017).

Πρόσφατα, μελέτες δείχνουν τη μείωση των επιπέδων του GDNF στην κυκλοφορία σε καταθλιπτικούς ασθενείς, αναδεικνύοντας τον ως ένα μόριο – κλειδί στη ρύθμιση των διαταραχών της διάθεσης (Maheu et al., 2015). Μελετώντας καθοδικούς και ανοδικούς τελεστές της σηματοδότησης του GDNF, το miR-511 φαίνεται να εμπλέκεται και αυτό ενεργά στο συγκεκριμένο μονοπάτι. Σε post-mortem δείγματα αμυγδαλής ασθενών με κατάθλιψη που αυτοκτόνησαν κατά τη διάρκεια ενός καταθλιπτικού επεισοδίου, μία συγκεκριμένη ισομορφή του mRNA του υποδοχέα του GDNF (GDNF Family Receptor Alpha 1- GFRA1) εντοπίστηκε σε χαμηλότερα επίπεδα, οδηγώντας σε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GFRA1. Αξιοποιώντας βάσεις δεδομένων πρόβλεψης στόχων, βρέθηκε *in silico* ότι το miR-511 αποτελεί υποψήφιο μόριο καθώς μπορεί να συνδεθεί στη μεγάλη 3' αμετάφραστη περιοχή των μεταγράφων που κωδικοποιούν για τον GFRA1a (GFRA1-L) (Maheu et al., 2015). Για να επιβεβαιωθεί ότι τα υποψήφια miRNAs που στοχεύουν την GFRA1-L εκφράζονται στον ιστό του εγκεφάλου πραγματοποιήθηκε qRT-PCR. Το miR-511 βρέθηκε σε σημαντικά αυξημένα επίπεδα στα δείγματα των ασθενών συγκριτικά με τους υγιείς και τελικά η έκφρασή του συσχετίστηκε αρνητικά με τα επίπεδα του GFRA1 (Maheu et al., 2015).

Επιπλέον, το miR-511 φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο σε αποκρίσεις στρες σε ζώα. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι μπορεί να προσδένεται στο mRNA του FKBP5, που κωδικοποιεί ένα τσαπερόνιο του συμπλόκου του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid Receptor, GR) (Xu J et al., 2019). Το συγκεκριμένο γονίδιο εμπλέκεται σημαντικά σε αποκρίσεις στρες και ρυθμίζει τη σηματοδότηση γλυκοκορτικοειδών στον εγκέφαλο. Όταν ο FKBP5 υπάρχει σε αυξημένα επίπεδα, καθυστερεί η αρνητική ανατροφοδότηση του μονοπατιού του GR. Ο GR δεν μπορεί να εισέλθει στον πυρήνα και να δράσει όταν είναι δεσμευμένος με την πρωτεΐνη FKBP5. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να συσσωρεύονται κυκλοφορούντα γλυκοκορτικοειδή, όπως η κορτιζόλη, η «ορμόνη του στρες». Σε ένα μοντέλο χρόνιου στρες τρωκτικών (Chronic Unpredictable Mild Stress, CUMS) είτε ύστερα από τη χορήγηση δεξαμεθαζόνης, η έκφραση του miR-511 παρατηρήθηκε απορρυθμισμένη στον εμπρόσθιο φλοιό των αρουραίων και συνοδεύτηκε από αλλαγές στην συμπεριφορά των ζώων που υιοθέτησαν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά κατάθλιψης (Xu J et al., 2019). Επιπλέον, σε ένα μοντέλο σήψης σε ποντίκια βρέθηκε ότι τα γλυκοκορτικοειδή επάγουν την έκφραση του miR-511, που φάνηκε να ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor Receptor, TNFR1) (Cavillon, 2015). Ο

υποδοχέας αυτός εμπλέκεται στην παραγωγή φλεγμονωδών διαμεσολαβητών και πιθανώς το miR-511 στοχεύοντας τον να έχει ένα προστατευτικό και αντιφλεγμονώδη ρόλο (Cavaillon, 2015). Αν και δεν υπάρχουν αναφορές για μελέτη της έκφρασης του miR-511 στο αίμα ασθενών με συναισθηματικές διαταραχές, τα πειράματα αυτά σε συνδυασμό με την αλλοιωμένη έκφρασή του σε post-mortem εγκεφαλικό ιστό ασθενών με κατάθλιψη καθιστούν το miR-511 ως ένα ακόμη υποψήφιο βιοδείκτη για αυτές τις ασθένειες.

Σκοπός

Σε παγκόσμιο επίπεδο εκατομμύρια άνθρωποι υποφέρουν από συναισθηματικές διαταραχές και παρά τις εξελίξεις στην φαρμακολογική αντιμετώπιση, πολλοί ασθενείς δεν ανταποκρίνονται αποτελεσματικά στις υπάρχουσες θεραπευτικές αγωγές. Επομένως, υπάρχει επείγουσα ανάγκη εύρεσης βιοδεικτών που μπορούν όχι μόνο να προβλέψουν την ανταπόκριση στη θεραπεία αλλά και να επιτρέψουν μια ορθολογική επιλογή της βέλτιστης θεραπευτικής προσέγγισης για κάθε ασθενή.

Σε άτομα που πάσχουν από ψυχιατρικές και νευροεκφυλιστικές νόσους έχουν βρεθεί διαφορετικά προφίλ έκφρασης των *cimiRNAs* συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες. Ειδικότερα, σε συναισθηματικές διαταραχές, όπως η διπολική διαταραχή, τα επίπεδα αρκετών *cimiRNAs* στον ορό των ασθενών παρουσιάζουν έντονες διαφοροποιήσεις σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό. Η αυξορρύθμιση (*upregulation*) ή μειορρύθμιση (*downregulation*) των *miRNAs* που σχετίζονται με μονοπάτια παθογένεσης των συναισθηματικών διαταραχών μπορεί να αντικατοπτρίζεται σε συστημικό επίπεδο και καθιστά αυτά τα μόρια ικανά για χρήση τους ως βιοδείκτες σε συνδυασμό με την προσβασιμότητα και τον μη-επεμβατικό χαρακτήρα της χρήσης δειγμάτων αίματος.

Τα *miRNAs* *miR-16* και *miR-511* ρυθμίζουν την έκφραση ποικίλων γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη τέτοιων ασθενειών. Πρόσφατες μελέτες φανερώνουν την απορρύθμιση της έκφρασης του *miR-16* στο αίμα ασθενών με διπολική διαταραχή, ενώ το *miR-511* έχει προταθεί ως πιθανός βιοδείκτης παρά το ότι η έκφρασή του έχει μελετηθεί και παρουσιάζει μεταβολές μόνο σε δείγματα από εγκεφαλικό ιστό των ασθενών. Στόχος της συγκεκριμένης μελέτης είναι η διερεύνηση της σχέσης των επιπέδων των *cimiRNAs*, *miR-16* και *miR-511*, στον ορό ασθενών με διπολική διαταραχή συγκριτικά με υγιή άτομα για τη δημιουργία ενός εξατομικευμένου μοριακού “fingerprint” με εφαρμογή στον γενικό πληθυσμό που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διαγνωστικούς και προγνωστικούς σκοπούς στην ιατρική ακριβείας.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΟ

Η μελέτη διεξήχθη σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι. Το πρωτόκολλο της μελέτης εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (αριθμ. πρωτ. 447, αριθμός απόφασης 10^η/10-07-2023). Όλοι οι συμμετέχοντες παρείχαν γραπτή συγκατάθεσή πριν συμπεριληφθούν στη μελέτη.

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 24 ασθενείς, ηλικίας >18 ετών, με διάγνωση διπολικής διαταραχής, που νοσηλεύτηκαν ή επισκέπτονταν τα Εξωτερικά Ιατρεία της Ψυχιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Η διάγνωση της διπολικής διαταραχής έγινε σύμφωνα με το Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, τέταρτη έκδοση (DSM-IV) (Wium-Andersen et al., 2016). Οι ασθενείς που συμμετείχαν στην μελέτη ήταν άτομα με διπολική διαταραχή, που βρίσκονταν σε φάση νορμοθυμίας (δεν εμφάνιζαν καταθλιπτικό ή μανιακό επεισόδιο) και δεν είχαν ιστορικό νευρολογικής νόσου. Κατά τη νοσηλεία τους, συλλέχθηκαν δεδομένα που αφορούσαν κοινωνικοδημογραφικά καθώς και κλινικά χαρακτηριστικά. Οι ασθενείς που έπασχαν από κάποια χρόνια καρδιολογική, αναπνευστική, νευροεκφυλιστική ασθένεια, αυτοάνοσα ή λοιμώδη νοσήματα, λάμβαναν αντιφλεγμονώδη ή/και αντιμικροβιακά φάρμακα αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

Πραγματοποιήθηκαν αιμοληψίες σε 21 υγιείς εθελοντές (control), που σταθμίστηκαν κατά ηλικία και φύλο με την ομάδα των ασθενών. Τα κριτήρια ένταξης των υγιών μαρτύρων ήταν η απουσία νευρολογικής ασθένειας και ατομικού ιστορικού ψυχιατρικής διαταραχής. Επίσης, οι υγιείς μάρτυρες δεν έπρεπε να πάσχουν από κάποια χρόνια καρδιολογική, αναπνευστική, νευροεκφυλιστική ασθένεια, συστηματική φλεγμονώδη νόσο, αυτοάνοσα και λοιμώδη νοσήματα και να μην λαμβάνουν αντιφλεγμονώδη ή/και αντιμικροβιακή αγωγή.

Από τους υγιείς μάρτυρες και τους ασθενείς ελήφθησαν τα δημογραφικά και κοινωνικοοικονομικά δεδομένα (Πίνακας 5), και συμπλήρωσαν το ερωτηματολόγιο διαταραχής του θυμικού (Mood Disorder Questionnaire, MDQ) (Πίνακας 6) και Major Depression Inventory (MDI, Πίνακας 7). Από τη μελέτη αποκλείστηκαν επίσης ασθενείς ή υγιείς μάρτυρες σε εγκυμοσύνη.

Πίνακας 5: Ερωτηματολόγιο για τη συλλογή δημογραφικών και κοινωνικοοικονομικών δεδομένων των υγιεινών μαρτύρων και των ασθενών.

Δημογραφικά στοιχεία

1. Ποιο είναι το φύλο σας; Άνδρας ☐ Γυναίκα ☐
2. Ποια είναι η ηλικία σας; _____
3. Ποιο είναι το βάρος σας σε κιλά; _____
4. Ποιο είναι το ύψος σας; _____
5. Τι περιοχή είναι ο μόνιμος τόπος κατοικίας σας;
☐ Αγροτική ☐ Αστική
6. Πόσα τσιγάρα την ημέρα καπνίζεις;
☐ Κανένα ☐ Μισό πακέτο ☐ Ένα πακέτο ☐ Περισσότερο από ένα πακέτο την ημέρα
7. Ποια είναι η οικογενειακή σας κατάσταση και πόσο καιρό βρίσκεστε σε αυτή;
☐ Άγαμος(η) ☐ Έγγαμος(η)/ σε συμβίωση ☐ Διαζευγμένος(η) ☐ Χήρος(α)

Χρόνος που βρίσκεστε στην παραπάνω κατάσταση _____
8. Πόσα παιδιά έχετε; _____
9. Ποιο είναι το μορφωτικό σας επίπεδο:
☐ Απουσία εκπαίδευσης ☐ Απόφοιτος(η) Δημοτικού ☐ Απόφοιτος(η) Γυμνασίου
☐ Απόφοιτος(η) Λυκείου ☐ Απόφοιτος(η) Τεχνικής Σχολής ☐ Απόφοιτος(η) ΤΕΙ
☐ Απόφοιτος(η) ΑΕΙ ☐ Κάτοχος Μεταπτυχιακού τίτλου ☐ Κάτοχος Διδακτορικού
10. Ποιο είναι το είδος απασχόλησης σας;
☐ Άνεργος(η) ☐ Ιδιωτικός υπάλληλος ☐ Δημόσιος Υπάλληλος

☐ Συνταξιούχος ☐ Οικιακά ☐ Άλλο
11. Μέσα σε ένα μήνα πόσο συχνά επικοινωνείς/βρίσκεσαι με τους φίλους σου;
☐ Καμία ☐ Μία φορά ☐ Δύο φορές ☐ Περισσότερο από τρεις φορές
12. Ποια είναι η ηλικία έναρξης της ασθένειας σας; _____
13. Πάσχετε από κάποια άλλη ασθένεια;
☐ Ναι ☐ Όχι Αν ναι, από ποια ασθένεια πάσχετε; _____
14. Παίρνετε κάποια φαρμακευτική αγωγή;
☐ Ναι ☐ Όχι Αν ναι, τι φαρμακευτική αγωγή; _____
15. Παίρνετε κάποια άλλη ουσία;
☐ Ναι ☐ Όχι Αν ναι, ποια; _____
16. Έπασχε κάποιος στην οικογένειά σας από κάποια ψυχική διαταραχή (γονέας/αδέρφια/παππούς/γιαγιά);
☐ Ναι ☐ Όχι Αν ναι, από τι έπασχε; _____

Πίνακας 6: Ερωτηματολόγιο Mood Disorder Questionnaire (MDQ) (Τσόπελας et al., 2010).

ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ ΔΙΑΤΑΡΑΧΗΣ ΤΟΥ ΘΥΜΙΚΟΥ (MDQ)		
Οδηγίες: Παρακαλούμε απαντήστε την κάθε ερώτηση με τον καλύτερο τρόπο που μπορείτε.		
	Ναι	Όχι
1. Υπήρξε ποτέ περίοδος που δεν υπήρξες ο συνηθισμένος σου εαυτός και...		
Ένωσες τόσο καλά ή τόσο ανεβασμένος/η που οι άλλοι πίστευαν πως δεν ήσουν ο κανονικός σου εαυτός ή που ήσουν τόσο ανεβασμένος/η και εξαιτίας αυτού είχες προβλήματα;	☐	☐
Ήσουν τόσο ευερέθιστος/η που φώναξες σε άλλους ή ξεκίνησες καβγάδες ή διαφωνίες;	☐	☐
Ένωθες περισσότερη αυτοπεποίθηση από ό,τι συνήθως;	☐	☐
Που κοιμόσουν λιγότερο από ό,τι συνήθως και ανακάλυπτες πως δε σου έλειπε ύπνος;	☐	☐
Ήσουν πιο ομιλητικός/ή ή μιλούσες πιο γρήγορα από ό,τι συνήθως;	☐	☐
Είχες σκέψεις που έτρεχαν στο κεφάλι σου ή να μη μπορούσες να επιβραδύνεις το μυαλό σου;	☐	☐
Είχες εύκολα διάσπαση προσοχής λόγω γεγονότων τριγύρω σου έτσι ώστε να έχεις πρόβλημα να συγκεντρωθείς ή να συνεχίσεις να παρακολουθείς αυτά που συνέβαιναν;	☐	☐
Είχες περισσότερη ενέργεια από ό,τι συνήθως;	☐	☐
Ήσουν πιο ενεργητικός/ή ή να έκανες πιο πολλά πράγματα από ό,τι συνήθως;	☐	☐
Ήσουν περισσότερο κοινωνικός/ή ή εξωστρεφής από ό,τι συνήθως, όπως για παράδειγμα, να τηλεφωνείς σε φίλους στη διάρκεια της νύχτας;	☐	☐
Ενδιαφερόσουν για το σεξ περισσότερο από ό,τι συνήθως;	☐	☐
Έκανες πράγματα που δε τα συνηθίζεις ή οι άλλοι να νόμιζαν πως ήσουν υπερβολικός/ή, ανόητος/ή ή ριψοκίνδυνος/η;	☐	☐
Ξόδευες χρήματα και προκαλούσες προβλήματα σε σένα και την οικογένειά σου;	☐	☐
2. Αν απάντησες ΝΑΙ σε περισσότερες από μία από τις παραπάνω ερωτήσεις, έχουν αρκετά από αυτά συμβεί ταυτόχρονα την ίδια περίοδο;	☐	☐
3. Πόσο μεγάλο πρόβλημα σου προκάλεσαν όλα αυτά, όπως να μη μπορείς να δουλέψεις, να κάνεις οικογένεια, να έχεις οικονομικές ή νομικές υποθέσεις ή να μπλέκεις σε διαφωνίες ή καυγάδες; (Παρακαλώ σημειώστε μόνο μια απάντηση)		
☐ Κανένα πρόβλημα ☐ Ασήμαντο πρόβλημα ☐ Μέτριο πρόβλημα ☐ Σοβαρό πρόβλημα		
4. Έχει κάποιος από τους εξ αίματος συγγενείς (για παράδειγμα παιδιά, αδέρφια, γονείς, παππούς και γιαγιά, θείες, θείοι) μανιοκαταθλιπτική νόσο ή διπολική διαταραχή;	☐	☐
5. Σας έχει, οποιαδήποτε στιγμή στη ζωή σας, κάποιος επαγγελματίας υγείας πει ότι έχετε μανιοκαταθλιπτική νόσο ή διπολική διαταραχή;	☐	☐

Major Depression Inventory (MDI)

Παρακαλώ απαντήστε στις παρακάτω ερωτήσεις σημειώνοντας το τετράγωνο στα δεξιά που αντιστοιχεί καλύτερα σ' αυτό που ισχύει για εσάς την τελευταία εβδομάδα.

1. Αισθανόσαστε να έχετε πεσμένη διάθεση ή λυπημένος/η;
Σπάνια 0 1 2 3 4 5 **Πολύ συχνά**
2. Είχατε χάσει το ενδιαφέρον σας για τις καθημερινές σας δραστηριότητες;
Σπάνια 0 1 2 3 4 5 **Πολύ συχνά**
3. Αισθανόσαστε να σας λείπουν η δύναμη και η ενέργεια;
Σπάνια 0 1 2 3 4 5 **Πολύ συχνά**
4. Αισθανόσαστε λιγότερη αυτοπεποίθηση;
Σπάνια 0 1 2 3 4 5 **Πολύ συχνά**
5. Αισθανόσαστε τύψεις συνειδήσεως ή ενοχές;
Σπάνια 0 1 2 3 4 5 **Πολύ συχνά**
6. Αισθανόσαστε ότι δεν αξίζει η ζωή να ζει κανείς;
Σπάνια 0 1 2 3 4 5 **Πολύ συχνά**
7. Είχατε δυσκολία να συγκεντρωθείτε πχ όταν διαβάζατε μια εφημερίδα ή βλέπατε τηλεόραση;
Σπάνια 0 1 2 3 4 5 **Πολύ συχνά**
8. A. Αισθανόσαστε μεγάλη ανησυχία;
Σπάνια 0 1 2 3 4 5 **Πολύ συχνά**
B. Αισθανόσαστε υποτονικά;
Σπάνια 0 1 2 3 4 5 **Πολύ συχνά**
9. Είχατε προβλήματα στον ύπνο σας κατά τη διάρκεια της νύχτας;
Σπάνια 0 1 2 3 4 5 **Πολύ συχνά**
10. A. Είχατε μειωμένη όρεξη για φαγητό;
Σπάνια 0 1 2 3 4 5 **Πολύ συχνά**
B. Είχατε αυξημένη όρεξη για φαγητό;
Σπάνια 0 1 2 3 4 5 **Πολύ συχνά**

2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Συλλογή δειγμάτων

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων συλλέχθηκαν 5 mL φλεβικού αίματος από τους συμμετέχοντες σε κατάλληλους σωλήνες συλλογής ορού, που δεν περιέχουν αντιπηκτικά όπως EDTA ή κιτρικό. Τα δείγματα αίματος φυγοκεντρήθηκαν σε 3000 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, το υπερκείμενο, που περιλαμβάνει τον ορό, μεταφέρθηκε σε σωλήνες ελεύθερους από RNase/DNase σε aliquots των 500 µl. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν άμεσα στους -80°C έως την έναρξη των πειραμάτων.

2.2 Απομόνωση μικρών μορίων RNA από δείγματα ορού

Το αρχικό βήμα της πειραματικής διαδικασίας περιλαμβάνει την απομόνωση του συνολικού cell-free RNA – κυρίως miRNA και άλλων μικρών μορίων RNA– από ένα μικρό όγκο δείγματος. Ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του πρωτοκόλλου miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit® (Qiagen). Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο δεν απαιτεί τη χρήση φαινόλης, παραλείποντας το στάδιο του διαχωρισμού φάσεων και στηρίζεται στην τεχνολογία στηλών φυγοκέντρωσης UCP (Ultra-Clean Production), επιτρέποντας την απομόνωση καθαρού RNA χωρίς επιμολύνσεις. Τα υλικά και τα αντιδραστήρια για την απομόνωση των μικρών μορίων RNA από δείγματα ορού αναγράφονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8: Υλικά και αντιδραστήρια για την απομόνωση μικρών μορίων RNA από δείγματα ορού.

Υλικά	Αντιδραστήρια περιλαμβάνονται στο miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit®
100% Ισοπροπανόλη 80% Αιθανόλη	<i>Buffer RPL</i> Περιέχει άλας γουανιδίνης (θειοκυανικό γουανιδίνιο) και άλλα απορρυπαντικά για τη λύση των κυττάρων, την αποδιάταξη των πρωτεϊνικών συμπλόκων και την απενεργοποίηση των RNασών. Καθιστά το RNA των δειγμάτων σταθερό και το προστατεύει από αποικοδόμηση.
Πιπέτες (1000µL, 200µL, 100µL, 20µL, 10µL) RNase-free τιπάκια Σωλήνες - Tubes (1.5 ml, 2 ml) Κατάλληλες στήλες συλλογής (RNeasy UCP MinElute spin column, Qiagen) Φυγόκεντρος	<i>Buffer RPP</i> Χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση αναστολέων (κυρίως πρωτεϊνών που βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε ορό και πλάσμα) μέσω φυγοκέντρωσης. <i>Buffer RWT</i> Περιέχει επίσης άλας γουανιδίνης (θειοκυανικό γουανιδίνιο). <i>Buffer RPE</i> Χρησιμοποιείται για την έκλυση του δεσμευμένου στις μεμβράνες των στηλών RNA
Γάντια	

Πειραματική διαδικασία

Δείγματα βιολογικού υλικού, όπως ο ορός και το πλάσμα περιέχουν στην πλειοψηφία τους κυρίως μικρά μόρια RNA, όπως miRNAs και κατά την πειραματική διαδικασία δεν χρειάστηκε η πραγματοποίηση κάποιου επιπλέον βήματος για την απομόνωσή τους.



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση - Σύνοψη των βημάτων που ακολουθήθηκαν για την απομόνωση RNA από δείγματα ορού.

Στο συγκεκριμένο πείραμα ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα για την απομόνωση του συνολικού RNA από δείγματα ορού (Εικόνα 6).

1. Τα δείγματα αφέθηκαν να ξεπαγώσουν από τους -80°C σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Κατά τη διάρκεια αυτής της αναμονής, δημιουργήθηκαν τα τελικά διαλύματα των Buffer RWT και RPE, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια, με την προσθήκη 30 ml και 44 ml αντίστοιχα αιθανόλης 100% σύμφωνα με το πρωτόκολλο του kit.
3. Όταν τα δείγματα έφτασαν σε θερμοκρασία δωματίου, 200 μl ορού μεταφέρθηκαν σε σωλήνες μικροφυγοκέντρωσης των 1,5 ml, στους οποίους προστέθηκαν 60 μl Buffer RPL, οι σωλήνες σφραγίστηκαν και αναδεύτηκαν στο vortex για >5 δευτερόλεπτα και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου ($15-25^{\circ}\text{C}$) για 3 λεπτά.
4. Στη συνέχεια προστέθηκαν 20 μl Buffer RPP, οι σωλήνες σφραγίστηκαν και πραγματοποιήθηκε έντονη ανάδευση του μείγματος με χρήση vortex για >20 δευτερόλεπτα. Τα δείγματα αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά.
5. Ακολούθησε φυγοκέντρωση σε $12000 \times g$ για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να συλλεχθεί το υπερκείμενο, που χρειάζεται να είναι διαυγές.
6. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε ($\sim 230 \mu\text{l}$) σε νέο σωλήνα και προστέθηκαν 230 μl ισοπροπανόλης. Το μείγμα αναδεύτηκε καλά με χρήση vortex.
7. Ολόκληρα τα δείγματα μεταφέρθηκαν στις κατάλληλες στήλες του kit (RNeasy UCP MinElute column), σφραγίστηκαν και φυγοκεντρήθηκαν για 15 δευτερόλεπτα σε $\geq 8000 \times g$. Το flow-

through (το περιεχόμενο των σωλήνων) απορρίφθηκε, διατηρώντας τους ίδιους σωλήνες συλλογής.

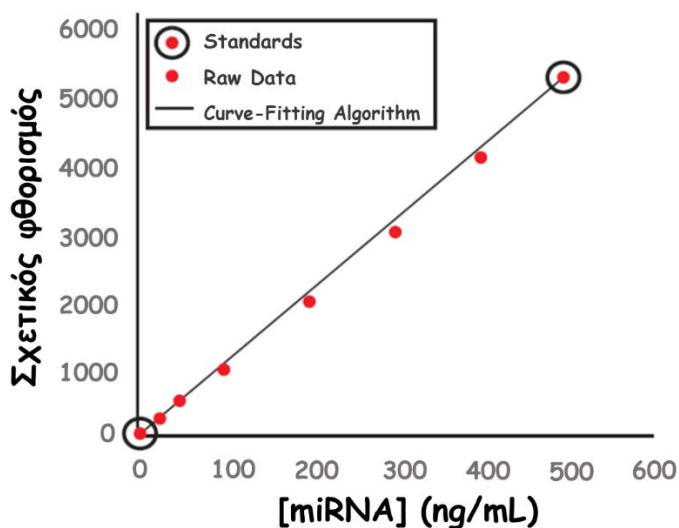
8. Έπειτα, προστέθηκαν 700 μ l Buffer RWT στις στήλες συλλογής, σφραγίστηκαν και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα σε $\geq 8000 \times g$. Το flow-through απορρίφθηκε και οι σωλήνες συλλογής επαναχρησιμοποιήθηκαν.
9. Προστέθηκαν 500 μ l Buffer RPE στις στήλες συλλογής, σφραγίστηκαν και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα σε $\geq 8000 \times g$. Το flow-through απορρίφθηκε και οι σωλήνες συλλογής επαναχρησιμοποιήθηκαν.
10. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 500 μ l αιθανόλης 80% στις στήλες συλλογής, σφραγίστηκαν και φυγοκεντρήθηκαν για 2 λεπτά σε $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) για την έκπλυση των μεμβρανών των στηλών. Το flow-through απορρίφθηκε και οι στήλες, με το πέρας της φυγοκέντρωσης, απομακρύνθηκαν προσεκτικά από τους σωλήνες, ώστε να μην έρθουν σε επαφή με την αιθανόλη.
11. Οι στήλες συλλογής μεταφέρθηκαν σε καινούριους σωλήνες συλλογής των 2 mL. Με ανοιχτό καπάκι φυγοκεντρήθηκαν σε μέγιστο αριθμό στροφών για 5 λεπτά, προκειμένου να στεγνώσουν οι μεμβράνες, ένα βήμα σημαντικό ώστε να αποφευχθεί η παρέμβαση της αιθανόλης που έχει απομείνει σε καθοδικές αντιδράσεις.
12. Τέλος, οι στήλες μεταφέρθηκαν σε καινούριους σωλήνες συλλογής των 1,5 mL, προστέθηκαν 20 μ l RNase-free νερού ακριβώς στο κέντρο της μεμβράνης των στηλών και έγινε επώαση για 1 λεπτό. Σφραγίστηκαν και φυγοκεντρήθηκαν για 1 λεπτό σε μέγιστη ταχύτητα για την έκλυση του RNA. Το εναπομείνον διάλυμα όγκου 18 μ l (νεκρός όγκος των στηλών: 2 μ l) περιείχε το απομονωμένο RNA, το οποίο φυλάχθηκε στους -80°C έως την πραγματοποίηση των επόμενων βημάτων.

2.3 Προσδιορισμός των επιπέδων (συγκέντρωσης) των μικρών μορίων RNA στα δείγματα

Μετά την απομόνωση του RNA, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του RNA σε κάθε δείγμα με τη χρήση ειδικού kit (Qubit™ microRNA assay kit, Invitrogen) και φθοροσκοπίου (Qubit 4, Invitrogen). Η συγκεκριμένη συσκευή επιτρέπει την εύκολη και ακριβή ποσοτικοποίηση των μικρών RNA (~20 νουκλεοτίδια ή ζεύγη βάσεων) σε μία ελάχιστη ποσότητα υλικού (2 μ l), με εύρος ανίχνευσης που κυμαίνεται από 0,025 ng/ μ l έως 150 ng/ μ l. Βασίζεται στην ανίχνευση φθορισμού με τη χρήση φθορίζοντων χρωστικών που συνδέονται επιλεκτικά στο μόριο – στόχο και στη συγκεκριμένη δοκιμασία περιλαμβάνονταν στο αντιδραστήριο του kit. Η δοκιμασία είναι επιλεκτική για μικρά RNA έναντι των rRNA ή μεγάλων RNA (μεγέθους >1000 νουκλεοτίδια) και

δίνει αποτελέσματα ακόμη κι εάν υπάρχουν επιμολύνσεις όπως η ύπαρξη αλάτων, ελεύθερων νουκλεοτιδίων, διαλυτών, απορρυπαντικών ή πρωτεϊνών.

Για κάθε δείγμα υπολογίστηκε η ένταση του φθορισμού και, με βάση πρότυπης καμπύλης, η συγκέντρωση RNA στα δείγματα (Εικόνα 7) σε ng/μl. Για τον σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν δύο δείγματα γνωστής συγκέντρωσης RNA τα calibration standards #1 και #2 που περιλαμβάνονται στο kit. Τα calibration standards #1 και #2 αποτελούν υψηλής ποιότητας siRNA μεγέθους 21 νουκλεοτιδίων και συγκέντρωσης 0 ng/μl και 10 ng/μl.



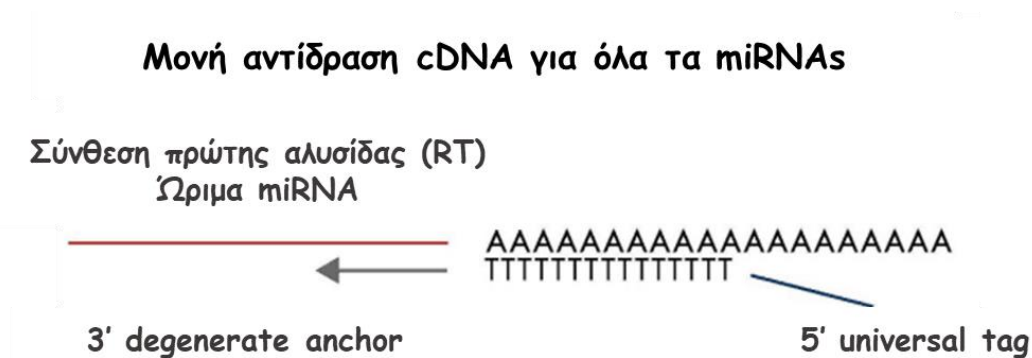
Εικόνα 7: Η καμπύλη βαθμονόμησης των δειγμάτων χρησιμοποιώντας τη συσκευή Qubit (Τροποποιημένο από: Qubit™ microRNA Assay Kit Manual, Invitrogen).

Προετοιμασία και Έλεγχος των δειγμάτων

1. Αρχικά, προετοιμάστηκε το πρότυπο διάλυμα Qubit™ αραιώνοντας το αντιδραστήριο Qubit™ microRNA reagent στο ρυθμιστικό διάλυμα Qubit™ microRNA buffer (1:200).
2. Σε κατάλληλους σωλήνες προστέθηκε ποσότητα από το πρότυπο διάλυμα ώστε ο τελικός όγκος να είναι 200 μl.
3. Έπειτα, προστέθηκαν σε αυτούς 10 μl από κάθε Qubit™ standard (#1 και #2). Στους υπόλοιπους σωλήνες προστέθηκαν 2 μl από τα δείγματα απομονωμένου RNA.
4. Ακολούθησε έντονη ανάδευση με χρήση vortex για 3-5 sec.
5. Οι σωλήνες αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά και τοποθετήθηκαν στο μηχάνημα για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσής τους.
6. Η συσκευή αυτόματα έδωσε τις τιμές των συγκεντρώσεων RNA σε ng/μl.

2.4 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription - RT)

Απαραίτητο βήμα για την ποσοτικοποίηση των miRNAs είναι η σύνθεση του cDNA (Εικόνα 8). Το cDNA που δημιουργήθηκε κατά την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής με το kit miRCURY LNA RT Kit® (Qiagen) χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την ανάλυση digital PCR που ακολούθησε χρησιμοποιώντας τις πλάκες miRCURY LNA miRNA PCR Panels (Qiagen) και το κατάλληλο kit, miRCURY LNA EvaGreen® PCR Kit (Qiagen).



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης του cDNA. Κατά τη διαδικασία αυτή μία poly(A) ουρά προστίθεται στο ώριμο miRNA – μήτρα και το cDNA συντίθεται με τη χρήση ενός εκφυλισμένου poly(T) εκκινητή που περιλαμβάνει μία 3' εκφυλισμένη άγκυρα (3' degenerate anchor) και μία 5' παγκόσμια ετικέτα (5' universal tag). Οι εκφυλισμένοι εκκινητές αποτελούν μείγματα παρόμοιων εκκινητών που μία ή περισσότερες θέσεις μπορούν να έχουν εναλλακτικές βάσεις, ώστε να καλύπτουν μία ποικιλία μοναδικών συνδυασμών miRNA σε κάθε δείγμα.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής αναγράφονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9: Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής.

Υλικά

Nuclease-free πλαστικά tubes (για 10 µl αντιδράσεις)
Nuclease-free πλάκες PCR (για 10 µl αντιδράσεις) (Qiagen)
Πιπέτες (1000µL, 200µL, 100µL, 20µL, 10µL)
Nuclease-free, aerosol-barrier τιπάκια
Θερμοκυκλοποιητής (Applied Biosystems)
Μικροφυγόκεντρος και ειδική φυγόκεντρος για πλάκες (Qiagen)
Vortex
Γάντια
Συσκευή dPCR (Qiagen)
kit miRCURY LNA RT Kit® (Qiagen)

Πρωτού ξεκινήσει η σύνθεση του cDNA πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- Το RNA – μήτρα και το 5x miRCURY RT Reaction Buffer (Qiagen), που περιέχει τον universal reverse transcription primer ή RT primer, Mg^{2+} και dNTPs, φυλάχθηκαν σε πάγο. Το RNase-free water αποψύχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Οι σωλήνες φυγοκεντρήθηκαν για τη συλλογή του εναπομείναντος υγρού από τις πλευρικές επιφάνειες και τοποθετήθηκαν στον πάγο.
- Ο σωλήνας που περιέχει το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση που καταλύει την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής, 10x miRCURY RT Enzyme, φυγοκεντρήθηκε και τοποθετήθηκε επίσης στον πάγο.
- Δεν προστέθηκαν επιπλέον δεοξυριβονουκλεοτίδια ή dNTPs (dATP, dCTP, dGTP και dTTP) για χρήση τους ως υπόστρωμα από το ένζυμο καθώς περιέχονται στα συστατικά του kit.

Επειτα, σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου του kit ακολούθησαν τα εξής βήματα:

- Η αντίδραση της dPCR πραγματοποιήθηκε σε όγκο δείγματος 10 μ l με την παρακάτω σύσταση:
 - 2 μ l 5x miRCURY RT Reaction Buffer
 - 4,5 μ l RNase-free water
 - 1 μ l 10x miRCURY RT Enzyme Mix
 - 0,5 μ l RNA Spike-in
 - 2 μ l RNA – μήτρα. Ακολούθησε ανάδευση.

Οι συνθήκες της αντίδρασης περιλάμβαναν:

1. Επώαση για 60 λεπτά στους 42°C.
2. Επώαση για 5 λεπτά στους 95°C για την απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης
3. Άμεση ψύξη στους 4°C.

Οι σωλήνες τοποθετήθηκαν στον πάγο για να πραγματοποιηθεί στη συνέχεια η αντίδραση dPCR.

2.5 Ψηφιακή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης– Digital Polymerase Chain Reaction (dPCR)

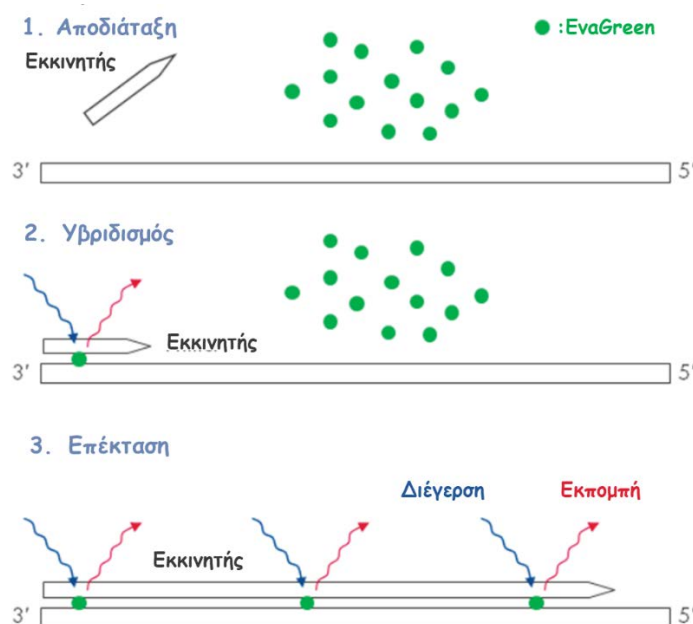
Η ψηφιακή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Digital PCR, dPCR) αποτελεί μία σύγχρονη μέθοδο που χρησιμοποιείται για την ακριβή ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων σε ένα δείγμα και βασίζεται στις αρχές της limiting dilution (Ο όγκος της αντίδρασης “περιορίζεται” ώστε σε κάθε πηγαδάκι μιας ειδικής πλάκας να υπάρχει διακριτός αριθμός βιολογικών οντοτήτων), end-point (παραγωγή του μέγιστου δυνατού αριθμού αντιγράφων του DNA ή RNA – στόχου και ανίχνευση στο τέλος των κύκλων) PCR και στην κατανομή Poisson

(λαμβάνεται υπόψιν η πιθανότητα να υπάρχουν >1 μόρια – στόχοι σε ένα διαμέρισμα). Ένα μηχανήμα digital PCR διαχωρίζει κάθε αντίδραση PCR σε χιλιάδες μικρο-αντιδράσεις ή διαμερίσματα (partitions). Κάθε διαμέρισμα περιλαμβάνει κανένα, ένα ή >1 μόρια – στόχους και με βάση τον νόμο του Poisson επιτυγχάνεται η ακριβής ποσοτικοποίησή τους στο σύνολο του δείγματος (Baltrušis & Höglund, 2023). Μόλις ολοκληρωθεί το στάδιο της διαμερισματοποίησης, οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται με τη χρήση των τυπικών συνθηκών μιας απλής PCR. Χρησιμοποιούνται φθορίζουσες ουσίες για την ανίχνευση της παρουσίας ή απουσίας προϊόντων σε κάθε διαμέρισμα (partition). Έτσι, οι θετικές αντιδράσεις εκπέμπουν σήμα, ενώ οι αρνητικές αντιδράσεις παραμένουν σκοτεινές (Baltrušis & Höglund, 2023).

Η dPCR συνδυάζει τις αρχές της αντίστροφης μεταγραφής, της ενίσχυσης της PCR, και του ψηφιακού διαχωρισμού (δυαδικό αποτέλεσμα – θετική/αρνητική αντίδραση) παρέχοντας την ακριβή ποσοτικοποίηση των μορίων microRNA σε ένα δείγμα. Προσφέρει υψηλή ευαισθησία, ακρίβεια και την ικανότητα ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης miRNAs ακόμη και σε ποσότητες της τάξης των pg, συνιστώντας ένα αξιόπιστο εργαλείο στην έρευνα για τα miRNAs.

Βασίζεται στην χρήση ειδικών φθορίζοντων χρωστικών και στην ανίχνευση του φθορισμού που εκπέμπεται κατά την ενσωμάτωση τους στο δίκλωνο DNA του δείγματος. Όταν η αντίδραση φτάσει σε ένα επαρκές επίπεδο πολλαπλασιασμού του αρχικού κλώνου, αναλύεται για να καθοριστούν ποια πηγαδάκια της ειδικής πλάκας δίνουν θετικό σήμα (παρουσία miRNA) και ποια αρνητικό σήμα (απουσία miRNA). Η δυαδική αυτή μορφή παρέχει ένα ψηφιακό αποτέλεσμα, γι' αυτό και η διαδικασία αποκαλείται 'digital PCR'.

Στην παρούσα μελέτη, η dPCR που πραγματοποιήθηκε στηρίζεται στη χρήση νανοπλάκων, μία πολύ πρόσφατη μέθοδο που ξεκίνησε να εφαρμόζεται από το 2020. Οι νανοπλάκες (nanoplates) βασίζονται στον φυσικό διαχωρισμό των δειγμάτων, δηλαδή στην ύπαρξη ενός φυσικού φραγμού που οδηγεί στη διαμερισματοποίηση του κάθε δείγματος στα πηγαδάκια. Η φθορίζουσα χρωστική, EvaGreen (Qiagen), που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία, προσδένεται σε δίκλιωνα μόρια DNA, και κατά την σύνδεσή της με τα προϊόντα της PCR υπόκειται στερεοδιαμορφωτική αλλαγή με αποτέλεσμα να εκπέμπει φθορισμό συγκεκριμένου μήκους κύματος (Εικόνα 9). Οι κορυφές διέγερσης και εκπομπής της EvaGreen, βρίσκονται στα 495 και 530 nm, αντίστοιχα, επιτρέποντας την ανίχνευση της χρωστικής στο «πράσινο κανάλι» του μηχανήματος QIAcuity (Qiagen). Η ένταση του σήματος αυξάνεται με την αύξηση του αριθμού των κύκλων, καθώς τα προϊόντα ενίσχυσης συσσωρεύονται όλο και περισσότερο.



Εικόνα 9: Βασική αρχή της ανίχνευσης της EvaGreen. Οι εκκινητές υβριδίζουν με την αλληλουχία στόχο κατά το στάδιο 2. Κατά τη φάση 3 της επέκτασης, η Taq DNA πολυμεράση επιμηκώνει τους εκκινητές και η χρωστική EvaGreen προσδένεται στο νέο-σχηματισμένο δίκλωνο DNA, επάγεται η αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσής της και ξεκινάει να φθορίζει με σήμα ανάλογο των προϊόντων της αντίδρασης. Στη συνέχεια γίνεται η ανίχνευση του φθορισμού αφού ολοκληρωθεί η PCR.

Η πειραματική διαδικασία της ενίσχυσης των επιθυμητών miRNA-στόχων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των miRCURY LNA miRNA PCR Assays (Qiagen) (μείγμα δύο λυοφιλιωμένων εκκινητών ειδικών για τα miRNA με υψηλή ευαισθησία για την ποσοτικοποίηση των στόχων) και QIAcuity EG PCR kit (Qiagen) (master mix απευθείας για χρήση) στη συσκευή QIAcuity dPCR (QIAcuity One) (Qiagen). Το στάδιο του πολλαπλασιασμού της dPCR ενισχύθηκε με τη χρήση ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών με LNAs (Locked Nucleic Acid). Τα LNAs ενσωματώνονται στους εκκινητές, τροποποιώντας τη στερεοδιαμόρφωσή τους, ώστε να προκαλέσουν μία ισχυρότερη δέσμευση με το cDNA εκμαγείο (αύξηση συγγένειας) και στοχεύοντας μόνο τα επιθυμητά μόρια έναντι άλλων παρόμοιων αλληλουχιών miRNA.

Για τα δύο επιθυμητά miRNA-στόχους:

miR-16 (με αλληλουχία UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG) και

miR-511 (με αλληλουχία GUGUCUUUUGCUCUGCAGUCA)

χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα miRCURY LNA PCR Assays: hsa-miR-16-5p miRCURY LNA miRNA PCR Assay (YP00205702) (Qiagen) και hsa-miR-511-5p miRCURY LNA miRNA PCR Assay (YP00204046) (Qiagen), που περιλαμβάνουν το σετ του εμπρόσθιου (forward) και ανάστροφου (reverse) εκκινητή, για κάθε δείγμα.

Εκτός από τα ζευγάρια των εκκινητών για τα miR-16-5p και miR-511-5p χρησιμοποιήθηκε και ένα ζευγάρι εκκινητών για ένα γονίδιο αναφοράς (miR-30e-5p, με

αλληλουχία UGUAAACAUCUUGACUGGAAG) (Qiagen), που επιτρέπει την κανονικοποίηση των τιμών των επιπέδων έκφρασης των miRNAs και την παραγωγή αξιόπιστων δεδομένων, καλύπτοντας ένα εύρος από τιμές Cq (ο αριθμός των κύκλων αντίδρασης που η καμπύλη του εκάστοτε δείγματος ξεπερνάει τον ουδό ανίχνευσης).

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στοχεύουν ενδογενή, μικρά μη κωδικοποιητικά RNAs που εκφράζονται συνεχώς και σχετικά σταθερά στα δείγματα διαφόρων ανθρώπινων ιστών. Παράλληλα, έγινε μία επιπλέον αντίδραση με το εξωγενές συνθετικό UniSp6 RNA spike-in (Qiagen) που προσομοιάζει τα miRNAs στη δομή, αλλά δεν έχει την ίδια αλληλουχία με γνωστά miRNAs. Το UniSp6 αποτελεί έναν δείκτη αποτελεσματικότητας της αντίστροφης μεταγραφής (cDNA efficiency marker). Η χρήση αυτού διασφαλίζει τον ποιοτικό έλεγχο των δειγμάτων – εάν δηλαδή η διαδικασία της σύνθεσης του cDNA πραγματοποιείται με αποτελεσματικό τρόπο, απουσία πιθανών αναστολέων (όπως π.χ. RNAses), ώστε να επιτυγχάνεται στη συνέχεια η ενίσχυση των επιθυμητών προϊόντων. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα αυτής της αντίδρασης qPCR με τα ενδογενή γονίδια αναφοράς, λαμβάνονται σημαντικές πληροφορίες για τα δείγματα.

Πριν ξεκινήσει το πείραμα ετοιμάστηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- Στα διαλύματα των miRCURY LNA miRNA PCR Assays (Qiagen) προστέθηκαν 220 µl nuclease-free H₂O αφού έγινε πρώτα spin down και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Έπειτα, αναδεύτηκαν με vortex.
- Τα περιεχόμενα του kit: 3x QIAcuity EG PCR Master Mix, LNA PCR assays, RNase-free H₂O και το cDNA - μήτρα αποψύχθηκαν. Ακολούθησε ανάδευση και σύντομο spin down.

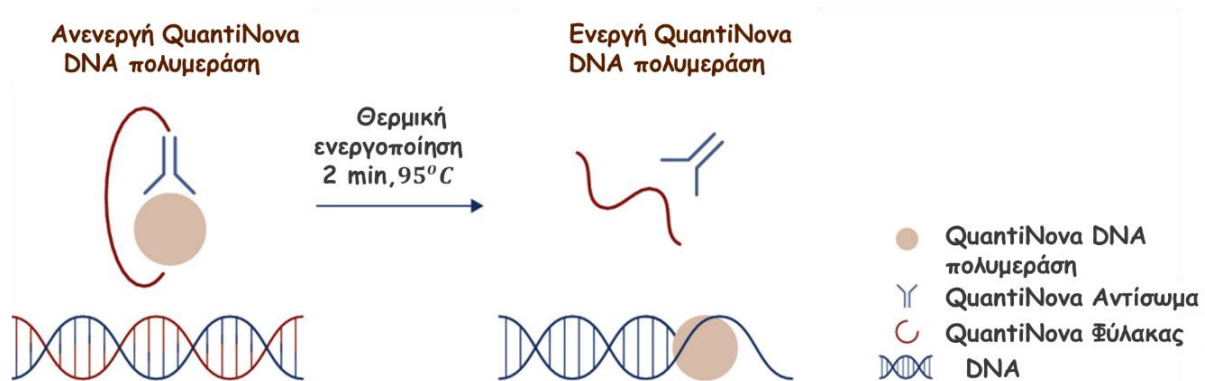
Κατόπιν, ακολούθησε η εξής διαδικασία:

1. Έγινε αραιώση του cDNA (1:30) προσθέτοντας 60 µl RNase-free H₂O σε 2 µl της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής (συνολικός όγκος 10 µl) και τα υπόλοιπα φυλάχθηκαν για μελλοντική χρήση.
2. Προετοιμάστηκε το mix της αντίδρασης (Πίνακας 10).

Πίνακας 10: Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της dPCR σε μία νανοπλάκα 24 θέσεων (Nanoplate 26k 24-well, Qiagen).

Συστατικά – Reaction Mix	Nanoplate 26k (24-well) (µl)
3x EvaGreen PCR Master Mix (green channel)	13.3
miRCURY LNA PCR Assay (10x)	4
cDNA - μήτρα	10
RNase-free H ₂ O	12.7
Συνολικός όγκος αντίδρασης	40

Κατά την προετοιμασία αυτή, τα δείγματα δεν χρειάστηκε να διατηρούνται στον πάγο διότι οι αντιδράσεις της dPCR ήταν hot-start, μία τροποποίηση της συμβατικής μεθόδου που ελαχιστοποιεί τη δημιουργία παραπροϊόντων και τον διμερισμό των εκκινητών λόγω μη εξειδικευμένης ενίσχυσης του DNA σε θερμοκρασία δωματίου. Αυτό επιτεύχθηκε με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων στο mix που περιείχε την DNA πολυμεράση, διατηρώντας την ανενεργή σε θερμοκρασία δωματίου (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Η αρχή του καινοτόμου μηχανισμού hot-start της PCR. Η QuantiTova DNA πολυμεράση είναι μια τροποποιημένη μορφή μιας ανασυνδυασμένης DNA πολυμεράσης μεγέθους 94 kDa, που προέρχεται από το βακτήριο *Thermus aquaticus*. Η QuantiTova DNA πολυμεράση βρίσκεται σε ανενεργή κατάσταση σε θερμοκρασία δωματίου και ενεργοποιείται ύστερα από το στάδιο έκθεσής της στους 95°C για 2 λεπτά.

3. Ακολούθησε ανάδευση με vortex του reaction mix που περιείχε το cDNA – μήτρα, το ζευγάρι των εκκινητών (miRCURY LNA PCR Assay) και το ειδικό 3x EvaGreen PCR Master Mix που περιείχε την DNA Taq πολυμεράση, ιόντα Mg^{2+} ως συμπαραγοντες του ενζύμου, τα dNTPs και τη φθορίζουσα χρωστική EvaGreen (Πίνακας 10).
4. Προστέθηκαν 30 μ l του reaction master mix σε κάθε πηγαδάκι μιας τυπικής πλάκας PCR και 10 μ l του αραιωμένου cDNA και έγινε σύντομη φυγοκέντρηση – spin down.
5. Το περιεχόμενο κάθε πηγαδιού μεταφέρθηκε στα πηγάδια μίας πλάκας QIAcuity Nanoplate 26k (24-well) (μ l).
6. Η πλάκα σφραγίστηκε κατάλληλα με τη χρήση των QIAcuity Nanoplate Seal και φορτώθηκε στο μηχάνημα QIAcuity.
7. Ρυθμίστηκαν οι παράμετροι απεικόνισης (ενεργοποίηση μόνο του πράσινου καναλιού), το layout της πλάκας και ορίστηκαν οι συνθήκες της dPCR (Πίνακας 11):

Πίνακας 11: Συνθήκες *dPCR*

Βήμα	Χρόνος	Θερμοκρασία (°C)
Αρχική ενεργοποίηση	2 min	95
Κύκλος δύο σταδίων (45 κύκλοι)		
Αποδιάταξη	15 s	95
Υβριδισμός/Επιμήκυνση	1 min	60
Ψύξη	5 min	40

8. Αφού ολοκληρώθηκε το run, για την ανάλυση των δεδομένων, πατήθηκε άνοιγμα στο QIAcuity Software Suite και επιλέχθηκε η επιθυμητή νανοπλάκα κάνοντας κλικ στο Plate Overview.

2.6 Στατιστική ανάλυση δεδομένων

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Όλα τα δεδομένα παρουσιάζονται στην μορφή: μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση (standard deviation, SD). Η κανονική κατανομή των τιμών ελέγχθηκε με την ανάλυση Kolmogorov-Smirnov. Οι διαφορές στις συγκεντρώσεις των μικρών μορίων RNA συγκρίθηκαν με τη δοκιμασία Mann-Whitney και η διερεύνηση της ύπαρξης συσχέτισης των τιμών μεταξύ των ομάδων πραγματοποιήθηκε με το συντελεστή Pearson. Κάθε αποτέλεσμα θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό για τιμή $P < 0.05$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Δημογραφικά, κοινωνικο-οικονομικά και ιατρικά στοιχεία υγιών και ασθενών

Στη συγκεκριμένη μεταπτυχιακή διατριβή μελετήθηκε η έκφραση των κυκλοφορούντων microRNAs, miR-16 και miR-511 στον ορό 21 ασθενών με διπολική διαταραχή (11 άνδρες και 13 γυναίκες) με ηλικία 46.17 ± 10.37 έτη και 24 υγιών ατόμων (10 άνδρες και 13 γυναίκες) με ηλικία 46.28 ± 10.52 έτη (Πίνακας 12). Τα άτομα των δύο ομάδων αντιστοιχίστηκαν κατά φύλο και ηλικία, ώστε να μην υπάρχουν διαφορές μεταξύ τους.

Όσο αφορά τα δημογραφικά στοιχεία και την οικογενειακή κατάσταση των ασθενών και υγιών μαρτύρων (Πίνακας 12) φαίνεται ότι το ποσοστό των ασθενών που έμεναν σε αστική περιοχή ήταν σημαντικά χαμηλότερο συγκριτικά με τα υγιή άτομα ($p = 0.03$). Οι ασθενείς, σε σύγκριση με τα υγιή άτομα, σε μεγαλύτερο ποσοστό δεν ήταν έγγαμοι (66.7% vs. 29.2%) και είχαν παιδιά σε μικρότερο ποσοστό (37.5% vs. 71.4%).

Σχετικά με το επίπεδο εκπαίδευσης (Πίνακας 12), οι ασθενείς ολοκλήρωσαν την εκπαίδευσή τους μόνο έως το Λύκειο (31.7%) ήταν περισσότεροι από τους υγιείς μάρτυρες (9.5%) ενώ κανένας από αυτούς δεν ήταν κάτοχος διδακτορικού. Αντίθετα, η πλειοψηφία των υγιών ατόμων συνέχισαν τις σπουδές τους στην τριτοβάθμια εκπαίδευση (90.5%). Όπως ήταν αναμενόμενο, το ποσοστό των ασθενών που εργάζονταν ήταν πολύ μικρότερο σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (29.2% vs. 100%).

Αναφορικά με τα ιατρικά στοιχεία των ατόμων, η πλειοψηφία των ασθενών ήταν καπνιστές και το ποσοστό τους ήταν σημαντικά υψηλότερο από την ομάδα των υγιών ατόμων (66.7% vs. 33.3%), ενώ ο αριθμός τσιγάρων που κάπνιζαν ήταν πολύ υψηλότερος και διέφερε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό από τους υγιείς καπνιστές ($p=0.009$) (Πίνακας 13). Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στο BMI ή τη συνύπαρξη κάποιας άλλης παθολογικής κατάστασης μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων. Κανένα άτομο από τις δύο ομάδες δεν έκανε χρήση εθιστικών ουσιών. Το ποσοστό των ατόμων που είχαν κάποιο προηγούμενο οικογενειακό ιστορικό συναισθηματικής διαταραχής δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ ασθενών και υγιών μαρτύρων.

Οι ασθενείς, όπως ήταν αναμενόμενο, σημείωσαν υψηλότερα score τόσο στο ερωτηματολόγιο διαταραχής του θυμικού ή Mood Disorder Questionnaire (MDQ) με μέσο όρο 2.3 ± 1.1 όσο και στο Major Depression Inventory (MDI) με μέσο όρο 18.0 ± 11.8 συγκριτικά με τους υγιείς που εμφάνισαν μέσους όρους 1.0 ± 1.6 και 10.3 ± 7.8 αντίστοιχα (Πίνακας 13). Οι τιμές των σκορ των ασθενών και για τα δύο ερωτηματολόγια παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά με αυτές των υγιών συμμετεχόντων ($p=0.0009$ για το MDQ score και $p=0.007$ για το MDI score).

Πίνακας 12: Κοινωνικά και δημογραφικά στοιχεία υγιών ατόμων και ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη. Οι τιμές για την ηλικία και τα έτη γάμου παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση. Οι υπόλοιπες τιμές αφορούν αριθμό ατόμων (N) και σε παρένθεση το ποσοστό (%). Η σύγκριση έγινε με *t*-test ή χ^2 test μεταξύ των τιμών του συνόλου της ομάδας ελέγχου και των ασθενών. NS: not significant.

		Ομάδα ελέγχου			Ασθενείς			P value
		Σύνολο N=21	Άνδρες N=10 (47.6%)	Γυναίκες N=11 (52.4%)	Σύνολο N=24	Άνδρες N=11 (45.8%)	Γυναίκες N=13(51.2%)	
Ηλικία (Έτη)		46.3 $\pm$ 10.6	46.8 $\pm$ 7.6	45.8 $\pm$ 13.1	46.2 $\pm$ 10.4	48.4 $\pm$ 6.8	44.3 $\pm$ 12.6	NS
Τόπος διαμονής	Αστική περιοχή	20 (95.2%)	9	11	17 (70.8%)	7	10	0.03
	Αγροτική περιοχή	1 (4.8%)	1	0	7 (29.2%)	4	3	NS
	Έγγαμοι	14 (66.7%)	6	8	7 (29.2%)	3	4	0.01
Οικογενειακή κατάσταση	Άγαμοι	6 (28.6 %)	3	3	13 (54.2%)	7	6	NS
	Διαζευγμένοι	1 (4.8%)	1	0	3 (12.5%)	1	2	NS
	Χήροι	0 (0%)	0	0	1 (4.2%)	0	1	NS
Έτη γάμου		19.9 $\pm$ 7.1			20.2 $\pm$ 16.2			NS
Με παιδιά		15 (71.4%)	7	8	9 (37.5%)	3	6	0.02
	Δημοτικό - Γυμνάσιο	0 (0.0%)	0	0	6 (25.0%)	3	3	NS
	Λύκειο	2 (9.5%)	1	1	10 (31.7%)	4	6	0.01
Επίπεδο εκπαίδευσης	IEK - TEI	1 (4.8%)	1	0	4 (16.7%)	1	3	NS
	Πτυχιούχοι	2 (9.5%)	0	2	3 (12.5%)	2	1	NS
	Μεταπτυχιακό δίπλωμα	5 (23.8%)	3	2	1 (4.2%)	1	0	NS
	Διδακτορικό	11 (52.4%)	5	6	0 (0.0%)	0	0	0.0003
	Εργαζόμενοι	21 (100.0%)	10	11	7 (29.2%)	4	3	<0.0001
Επαγγελματική κατάσταση	Άνεργοι	0	0	0	9 (37.5%)	3	6	NS
	Συνταξιούχοι	0	0	0	4 (16.7%)	3	1	NS
	Οικιακά	0	0	0	3 (12.5%)	0	3	NS

Πίνακας 13: Ιατρικά στοιχεία υγιών ατόμων και ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη. Τα δεδομένα παρουσιάζονται με τη μορφή: μέσος όρος± τυπική απόκλιση. Οι τιμές για τους καπνιστές, την συνύπαρξη άλλων νοσημάτων (συννοσηρότητα), τη χρήση φαρμάκων ή εθιστικών ουσιών,αφορούν αριθμό ατόμων (N) και σε παρένθεση το ποσοστό (%). Η σύγκριση έγινε με Student t-test ή χ^2 test μεταξύ των τιμών του συνόλου της ομάδας ελέγχου και των ασθενών. NS: not significant.

	Ομάδα ελέγχου			Ασθενείς			P value
	Σύνολο N=21	Άνδρες N=10	Γυναίκες N=11	Σύνολο N=24	Άνδρες N=11	Γυναίκες N=13	
Καπνιστές	7 (33.3%)	2	5	16 (66.7%)*	9	7	0.03
Αριθμός τσιγάρων	4.29±6.8	4±8.4	4.55±5.2	14.92±15.8**	16.18±16.8	13.85±15.9	0.009
BMI	26.66±5.0	28.85±3.1	24.66±5.6	28.51±5.4	28.36±4.0	28.63±6.6	NS
Εθιστικές ουσίες	0 (0.0%)	0	0	1 (4.17%)	1	0	NS
Οικογενειακό ιστορικό	4 (19.0%)	1	3	6 (25.0%)	3	3	NS
MDQ Score	1.0±1.6	0.9	1.0±1.6	2.3±1.1***	2.6±0.9	2.1±1.2	0.0009
MDI Score	10.3±7.8	8.6	11.8±6.7	18.0±11.8*	19.6±12.0	16.5±11.9	0.007

Δεν υπήρχαν ιδιαίτερα μεγάλες αποκλίσεις στα σκορ των υγιών ατόμων με εξαίρεση δύο control, που σημείωσαν τιμές μεγαλύτερες του 3 (εκτός του φυσιολογικού ορίου) για το πρώτο τμήμα του ερωτηματολογίου της διαταραχής του θυμικού. Τα υγιή άτομα που συμπλήρωσαν σκορ ≥ 3 ήταν 4 από τα 21 (19.05%), ενώ 16 ασθενείς από τους 24 είχαν σκορ ≥ 3 (66.7%). Το ποσοστό μεταξύ των δύο ομάδων διέφερε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($p=0.001$).

Από το σύνολο των ασθενών, 7 από τους 24 (29.17%) έπασχε από κάποιο άλλο νόσημα. Από την ομάδα ελέγχου, 5 άτομα από τα 21 (23.81%) εμφάνιζαν κάποια συννοσηρότητα. Δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο μεταξύ των δύο ομάδων ($p=0.68$) (Πίνακας 14).

Πίνακας 14: Οι τύποι των νοσημάτων που εμφάνιζαν ορισμένοι ασθενείς με διπολική διαταραχή και υγιή άτομα.

Νόσημα	Ασθενείς (N)	Υγιείς (N)
Υποθυρεοειδισμός	-	3
Αρρυθμία	-	1
Ασθμα	-	1
Υπερχοληστερολαιμία	1	1
Γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση	1	1
Σκολίωση	1	-
Υπέρταση	3	-
Διαβήτης	2	-
Ανεύρυσμα ανιούσης αορτής	1	-
Άπνοια	1	-
Θρόμβωση	1	1

Από το σύνολο των ασθενών, 15 από τους 24 λάμβαναν φαρμακευτική αγωγή (62.5 %). Αυτοί οι 15 ασθενείς λάμβαναν αντιψυχωσικά φάρμακα (ολανζαπίνη, κουετιαπίνη, αλοπεριδόλη, αριπιπραζόλη, κουετιαπίνη, αμισουλπρίδη, ζουκλοπενθιζόλη), λίθιο, αντιεπιληπτικά (βαλπροϊκό οξύ, καρβαμαζεπίνη, λαμοτριγίνη) (Πίνακας 15). Σε ορισμένους χορηγούνταν συνδυασμός των παραπάνω φαρμάκων, ενώ σε 7 από τους 24 ασθενείς χορηγούνταν και αγχολυτικά φάρμακα (λοραζεπάμη, υδροξυζίνη). Μόνο ένας από τους 24 ασθενείς λάμβανε και αντικαταθλιπτική θεραπεία με μιρταζαπίνη. Επίσης, 6 από τους 24 ασθενείς (25%) και 5 από τα 21 υγιή άτομα (23.8%) λάμβαναν φαρμακευτική αγωγή για κάποιο άλλο νόσημα και τα ποσοστά αυτά δεν διέφεραν στατιστικά μεταξύ των δύο ομάδων.

Πίνακας 15: Η φαρμακευτική αγωγή των ασθενών με διπολική διαταραχή και τα φάρμακα των υγιών και ασθενών σε περίπτωση που έπασχαν από κάποιο άλλο νόσημα.

Φαρμακευτική ουσία		Ασθενείς (N)	Υγιείς (N)
Φάρμακα που δρουν στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα			
Αντιψυχωσικά	Ολανζαπίνη	6	-
	Αλοπεριδόλη	6	-
	Αριπιπραζόλη	1	-
	Κουετιαπίνη	4	-
	Αμισουλπρίδη	1	-
	Ζουκλοπενθιζόλη	1	-
Σταθεροποιητές διάθεσης	Λίθιο	7	-
Αντικαταθλιπτικά	Μιρταζαπίνη	1	-
Αγχολυτικά	Λοραζεπάμη	6	-
	Υδροξυζίνη	1	-
Αντιχολινεργικά	Βιπεριδένη	2	-
	Καρβαμαζεπίνη	1	-
Αντιεπιληπτικά	Λαμοτριγίνη	1	-
	Βαλπροϊκό οξύ	6	-
Άλλα φάρμακα			
Αντιδιαβητικά	Σιταγλιπτίνη και Μετφορμίνη	2	-
Αντιυπερτασικά	Ιρβεσαρτάνη και Υδροχλωροθειαζίδη	3	-
Ανασταλτικά γαστρικής έκκρισης	Ραμπεπραζόλη - Παντοπραζόλη	1	1
Υδροδιαλυτές βιταμίνες	Βιταμίνη B1	1	-
Ορμόνες	Προγεστερόνη	-	1
Αντιθυρεοειδικά	Θυροξίνη	-	2
Καρδιολογικά	Ιβαμπραδίνη	-	1
Αντιπηκτικά	Ναδροπαρίνη	1	1
Υπολιπιδαιμικοί παράγοντες	Ροσουβαστατίνη	1	1
Βρογχοδιασταλτικά	Βουδεσονίδη - Φορμοτερόλη	-	1
Άλλα	Σίδηρος	1	-

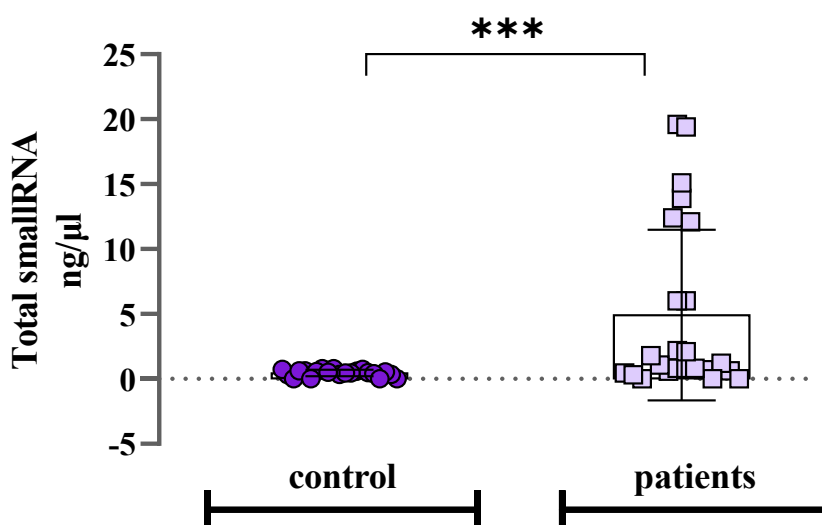
3.2 Επίπεδα ολικού RNA ορού

Αρχικά έγινε απομόνωση του ολικού RNA από 24 δείγματα ορού ασθενών που προήλθαν από την Ψυχιατρική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας και 21 υγιών μαρτύρων. Για να επιβεβαιωθεί ότι η απομόνωση ήταν επιτυχής, το αποτέλεσμα εκτιμήθηκε φωτομετρικά με τη χρήση του ειδικού kit Qubit™ microRNA Assay Kit.

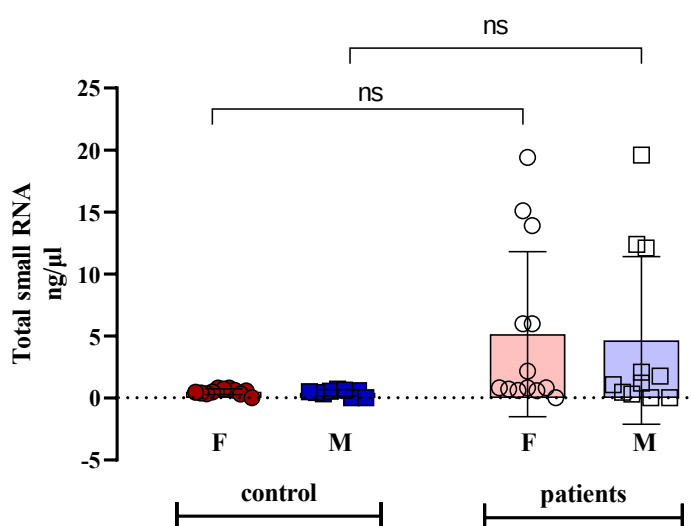
Οι ποσότητες του RNA που απομονώθηκε κυμαίνονται από 0.32-19.6 ng/μl, εντός των ορίων που υποδεικνύει το πρωτόκολλο της δοκιμασίας (Διάγραμμα 1). Η φωτομετρική ανάλυση των δειγμάτων έδειξε ορισμένα δείγματα να βρίσκονται εκτός εύρους ανίχνευσης (Out of Range)

ή σε ‘Πολύ Χαμηλό’ (Too Low) επίπεδο . Η πιθανότερος λόγος για αυτό είναι ότι τα συγκεκριμένα δείγματα μπορεί να μην περιείχαν την ελάχιστη συγκέντρωση RNA που είναι ανιχνεύσιμη από το Qubit™. Κατόπιν, η ποσότητα αυτών ορίστηκε ως το κατώτερο όριο ανίχνευσης της συσκευής που ισούται με 0.025 ng/μl.

Τα επίπεδα του ολικού RNA που απομονώθηκαν ήταν συνολικά σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p=0.004$, Διάγραμμα 1), ενώ δεν αναδείχτηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ανδρών και γυναικών τόσο στους ασθενείς όσο και στα υγιή άτομα (Διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 1: Επίπεδα συνολικού RNA σε υγιείς και ασθενείς. $P<0.001$



Διάγραμμα 2: Επίπεδα συνολικού RNA σε άνδρες και γυναίκες σε υγιείς και ασθενείς.

Επίσης, στους ασθενείς, δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο της συγκέντρωσης του ολικού RNA με την ηλικία, το BMI, τον αριθμό των τσιγάρων,

την ηλικία έναρξης της ασθένειας, τη διάρκειά της και το σκορ των ερωτηματολογίων MDQ και MDI (Πίνακας 16).

Πίνακας 16: Συσχετίσεις της ποσότητας του συνολικού απομονωμένου RNA με ηλικία, BMI, αριθμό τσιγάρων, ηλικία έναρξης ή διάρκεια της ασθένειας, MDQ και MDI σκορ.

	Ηλικία	BMI	Αριθμός τσιγάρων	Ηλικία έναρξης ασθένειας	Διάρκεια της ασθένειας	Σκορ MDQ	Σκορ MDI
r	0.02	0.03	-0.14	0.12	-0.14	0.16	0.40
95% confidence interval	-0.41 to 0.45	-0.41 to 0.45	-0.54 to 0.31	-0.48 to 0.65	-0.66 to 0.47	-0.29 to 0.55	-0.04 to 0.71
P (two-tailed)	0.9	0.9	0.6	0.7	0.7	0.5	0.07

3.3 Ποιοτικός έλεγχος των δειγμάτων

Απαραίτητο στάδιο, πρωτού πραγματοποιηθούν οι αντιδράσεις της dPCR για τα miRNA – στόχους, είναι η προσθήκη του εξωγενούς UniSp6 Spike-in control για τον ποιοτικό έλεγχο των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα οπτικοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Qiacuity Software Suite, που δημιουργεί μία λίστα με τα δεδομένα της απόλυτης ποσοτικοποίησης για κάθε δείγμα του υπό μελέτη στόχου και ειδικά διαγράμματα (scatterplots). Τα αποτελέσματα για την ενίσχυση του UniSp6 στα δείγματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 17).

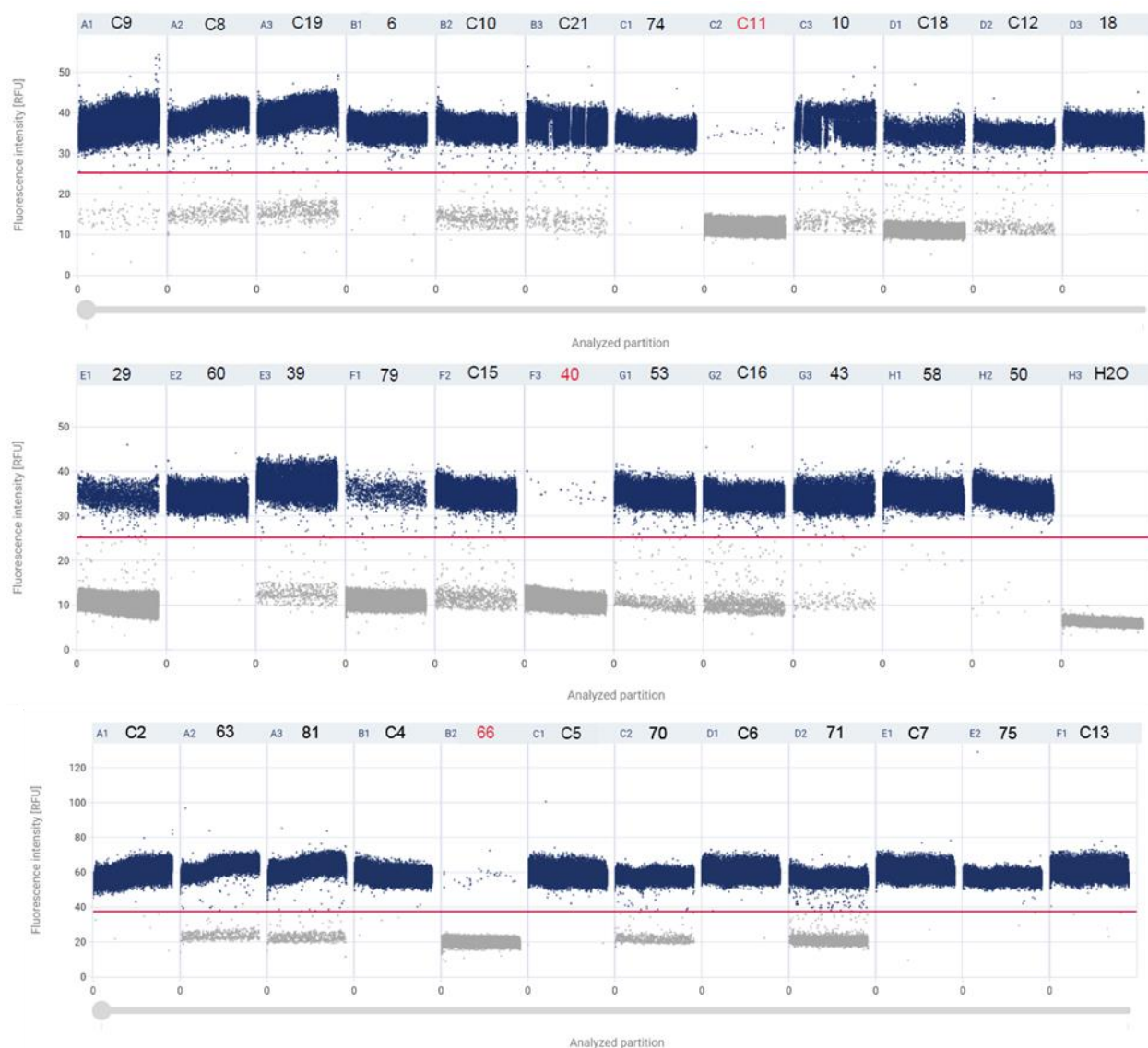
Πίνακας 17: Ποσοτικοποίηση του εξωγενούς spike-in control (UniSp6) στο σύνολο των δειγμάτων. Σε ορισμένα δείγματα, ο προσδιορισμός του UniSp6 έγινε εις διπλούν (1^η, 2^η στήλη) ενώ σε δείγματα που το UniSp6 δεν ανιχνεύτηκε ή δεν είχαν αρκετό cDNA για την αντίδραση πολυμερισμού έγινε εκ νέου σύνθεση του cDNA και η ποσοτικοποίηση του (3^η στήλη). n.a: δείγματα με 0 αρνητικές αντιδράσεις, που δεν μπορεί να υπολογισθεί η συγκέντρωση λόγω υπερκορεσμού.

Συγκέντρωση (copies/μl)				Θετικές αντιδράσεις (Positive Reactions)			Αρνητικές αντιδράσεις (Negative Reactions)		
1 ^η		2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η
Controls									
C1	n.a	n.a		25459	25472		0	0	
C2	10907.2			25467			6		
C3	11436.2	13479.8		25461	25478		4	1	
C4	11741.6			25479			4		
C5	12793.7			25484			2		
C6	13816.7			25480			1		
C7	12840.8			25490			2		
C8	5094.9			16210			358		
C9	0.053	24.41	7386.6	1	459	23971	25343	24977	84
C10	4799.1			16441			513		
C11	1.483			20			18802		
C12	4819,1			10477			355		
C13	11882.4			25482			4		
C14	12738.1			25470			2		
C15	4735			24623			857		
C16	4085.9			24191			1313		
C17	12103.6			25476			3		
C18	4060	3032	285.2	76	55	4432	25393	25424	19023

C19	5219			24165			508		
C20	12399.2	n.a		25238	25485		3	0	
C21	5823,5			20131			288		
Patients									
6	13730.4	n.a	10604	25457	25459	19076	1	0	7
10	5087.1			14130			356		
18	12607.8			19045			2		
29	0.371	0.541	166.2	7	10	2716	25417	25475	20874
39	5480.6			24984			498		
40	1.244			23			25422		
43	6526,2			19266			164		
50	10661.8			25463			10		
53	4904.8			24766			668		
58	10791.2			25466			8		
59	4808.0	4459.5	13456.9	25658	24475	25467	813	996	1
60	11906.2			24250			5		
63	5211.2			24955			504		
66	1.671			31			25444		
70	5041.6			24820			687		
71	3188.8			22833			2655		
73	13162.9	13763.0		25442	25487		2	1	
74	12416.5	n.a	12403	25439	25373	19086	3	0	2
75	13262.1			25502			2		
76	13.22			240			25228		
78	4390.6			24420			1051		
79	1936	1895	67.78	36	36	1242	25403	25404	24242
80	5151.1			24894			576		
81	5090.9			24813			575		

Ο έλεγχος για την ποιότητα των δειγμάτων πραγματοποιείται επίσης με βάση την εικόνα που δίνουν στα διαγράμματα. Ιδανική εικόνα για έναν τέτοιο δείκτη στο 1D-scatterplot (σχηματική αναπαράσταση με μπλε κουκκίδες για τις θετικές αντιδράσεις και γκρι κουκκίδες για το σύνολο των αρνητικών αντιδράσεων) μιας αντίδρασης dPCR αποτελεί ο υπερκορεσμός (hypersaturation), δηλαδή η παρουσία του μέγιστου δυνατού αριθμού θετικών αντιδράσεων. Γενικώς όταν όλες οι κουκκίδες (partitions) είναι μπλε (δεν υπάρχουν γκρι), σημαίνει πως όλα είναι θετικά, οπότε έχουμε oversaturation (Εικόνα 11).

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα στη μορφή του 1D-scatterplot, συνολικά τρία δείγματα δεν έδωσαν αποτελέσματα για το UniSp6: Το C11 (1.483 αντίγραφα/μl), το 40 (1.244 αντίγραφα/μl) και το 66 (1.671 αντίγραφα/μl) (Πίνακας 17, Εικόνα 11) και τα δείγματα αυτά εξαιρέθηκαν από περαιτέρω ανάλυση για τα miR-16 και miR-511. Είναι πιθανό στα τρία αυτά δείγματα η σύνθεση του cDNA να μην πραγματοποιήθηκε αποτελεσματικά ή να υπάρχουν RNAσες που αποικοδομούν το RNA (είτε ενδογενούς είτε εξωγενούς προέλευσης) και παρεμποδίζεται η πραγματοποίηση αυτής της αντίδρασης.



Εικόνα 11: Ενδεικτική εικόνα ενός 1D-scatterplot του Qiagen Software Suite για ορισμένα run του UniSp6. Στον άξονα x βρίσκεται η ένταση του φθορισμού (Fluorescence Intensity, RFU) και στον άξονα y τα διαμερίσματα (partitions) που αναλύθηκαν. Στα δείγματα με κόκκινο χρώμα (C11, 40, 66) οι θετικές αντιδράσεις (μπλε partitions) για το UniSp6 είναι ελάχιστες, υποδεικνύοντας μία αδυναμία σύνθεσης του cDNA για το UniSp6. Τα υπόλοιπα δείγματα εμφανίζουν το φαινόμενο του υπερκορεσμού και είναι αποδεκτά για τη συνέχεια της μελέτης.

3.4 Προσδιορισμός των miR-16 και miR-511 στον ορό υγιών ατόμων και ασθενών με διπολική διαταραχή

3.4.1 Επίπεδα miR-16

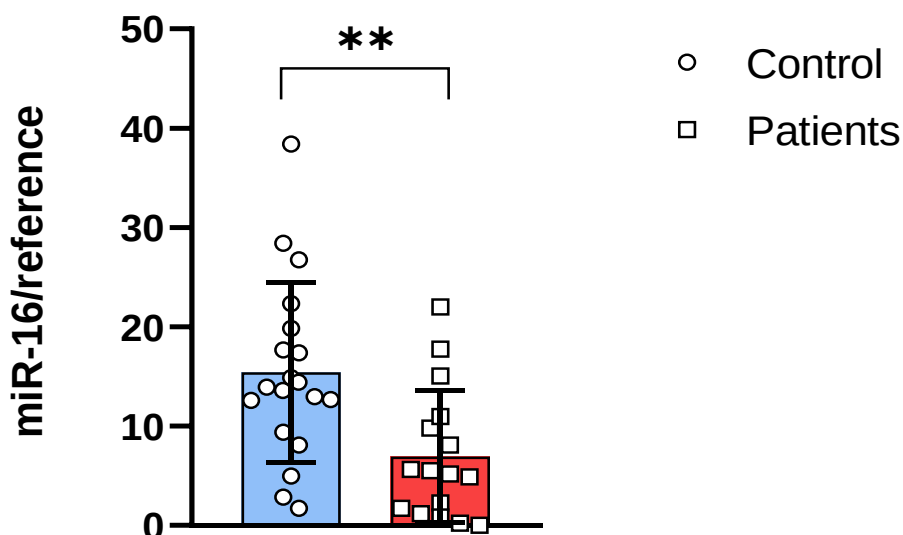
Τα επίπεδα (σε αντίγραφα/μl) του miR-16 στον ορό των υγιών ατόμων και ασθενών παρουσιάζονται στον Πίνακα 18. Οι συγκεντρώσεις του miR-16 στην ομάδα των υγιών ατόμων κυμαίνονται από 0.264 έως 5,466.9 αντίγραφα/μl του αρχικού δείγματος. Οι ασθενείς εμφανίζουν συγκεντρώσεις από 0.209 έως 1.175 αντίγραφα/μl (Πίνακας 18).

Πίνακας 18: Ποσοτικοποίηση του γονιδίου αναφοράς και του miR-16 στο σύνολο των δειγμάτων. Ορισμένα δείγματα τρέχτηκαν σε duplicates (πρωτη και δεύτερη στήλη του concentration), ενώ δείγματα που δεν έδωσαν αποτέλεσμα ή δεν είχαν αρκετό cDNA για την αντίδραση πολυμερισμού έγινε ξανά η σύνθεση του cDNA και η ποσοτικοποίηση του reference και του miR-16 (τρίτη στήλη). Η τελευταία στήλη περιέχει τις κανονικοποιημένες τιμές έκφρασης των δεδομένων απόλυτης ποσοτικοποίησης του miR-16.

	Reference			miR-16			miR-16/ref
	Συγκέντρωση (copies/μl)			Συγκέντρωση (copies/μl)			
	1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η	
Controls							
C1	228,1	74,07		3966,3	347,2		17,38842613
C2	142,4			5466,9			38,39115169
C3	245,6			570,2			2,86
C4	17,01			231,1			13,58612581
C5	17,5			346,8			19,81714286
C6	69,86			1984,3			28,40395076
C7	59,53			1591,6			26,73609945
C8	74,98	0	0,333	1675,6	0	6	22,34729261
C9	0			0			17,67267267
C10	1,457			21,71			14,90048044
C11							
C12	9,418			88,6			9,40751752
C13	8,347			67,59			8,097520067
C14	0,053			0,264			4,981132075
C15	1,957	71,82		24,8	232,6		12,67245784
C16	59,25			747,4			12,61434599
C17	20,04			259,9			12,96906188
C18	0			0			
C19	0,869			12,09			13,91254315
C20	351,4			495,4			1,72
C21	1,499			21,65			14,44296197
Patients							
6	0	0	0,061	0	0	0,298	4,885245902
10	0,071			0,695			9,788732394
18	0,063			1,119			17,76190476
29	0			0			
39	2,681			0,597			0,222678105
40							
43	0,286			0,649			2,269230769
50	0,22	0,38	1,727272727				
53	0,054	0		1,188	0,216		22
58	0			0			
59	0			0,334			
60	0,108			0,597			5,527777778
63	0			0,209			
66				0			
70	0,054			0,438			8,111111111
71	0	0					
73	0,179	0		0,216	0,216		1,206703911
74	0,317			0,328			0,858
75	0,053			0,275			5,188679245
76	0			0			
78	0,054			0,812			15,03703704
79	0,07			0			0
80	0,208			1,1750			5,649038462
81	0,053			0,581			10,96226415

Η συγκέντρωση του miR-16 σε κάθε δείγμα κανονικοποιήθηκε ως προς το γονίδιο αναφοράς (miR-30e-5p), υπολογίζοντας τον λόγο των δύο τιμών (Εικόνα 14). Δύο δείγματα των υγιών ατόμων (C11, C18) και οχτώ δείγματα των ασθενών (29, 40, 58, 63, 66, 71, 76) δεν έδωσαν αποτέλεσμα για το miR-16. Όσον αφορά τα δείγματα 59 και 63, η συγκέντρωση του γονιδίου

αναφοράς ήταν μηδενική, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η κανονικοποίηση. Οι κανονικοποιημένες τιμές (N=19 για την ομάδα ελέγχου και N=16 για τους ασθενείς) ακολουθούν την κανονική κατανομή και συγκρίθηκαν με την δοκιμασία Student t-test. Τα επίπεδα του miR-16 είναι σημαντικά χαμηλότερα στους ασθενείς σε σύγκριση με τους υγιείς ($p=0.0039$, Διάγραμμα 3). Συγκεκριμένα στους ασθενείς οι κανονικοποιημένες τιμές του miR-16 εμφάνιζαν μέσο όρο 6.95 ± 6.62 αντίγραφα/μl, ενώ οι υγιείς είχαν μέσο όρο 15.42 ± 9.05 αντίγραφα/μl του miR-16.



Διάγραμμα 3: Τα επίπεδα έκφρασης του miR-16 στον ορό υγιών ατόμων (μπλε χρώμα, control) και ασθενών με διπολική διαταραχή (κόκκινο χρώμα, patients). Οι τιμές παρουσιάζουν στατιστική σημαντικότητα με $p < 0.01$.

Στη συνέχεια εξετάστηκε η πιθανή συσχέτιση των επιπέδων του miR-16 με την ηλικία, το σκορ των ερωτηματολογίων MDQ και MDI, τον δείκτη μάζας σώματος (BMI), τη διάρκεια της ασθένειας και την ηλικία εμφάνισής της και δεν φάνηκε κάποια σημαντική συσχέτιση (Πίνακας 20).

Πίνακας 20: Συσχετίσεις των επιπέδων του miR-16 των ασθενών με διπολική διαταραχή με την ηλικία, το σκορ των ερωτηματολογίων MDQ και MDI, το BMI, τη διάρκεια της ασθένειας και την ηλικία εμφάνισής της.

	Ηλικία	Σκορ MDQ	Σκορ MDI	BMI	Διάρκεια της ασθένειας	Ηλικία έναρξης της ασθένειας
r	0.03	0.01	0.47	2.360e-005	0.02	0.14
95% confidence interval	-0.47 to 0.52	-0.49 to 0.51	-0.04 to 0.78	-0.50 to 0.50	-0.62 to 0.64	-0.54 to 0.71
P (two-tailed)	0.91	0.96	0.07	>0.99	0.96	0.70

3.4.2 Επίπεδα miR-511

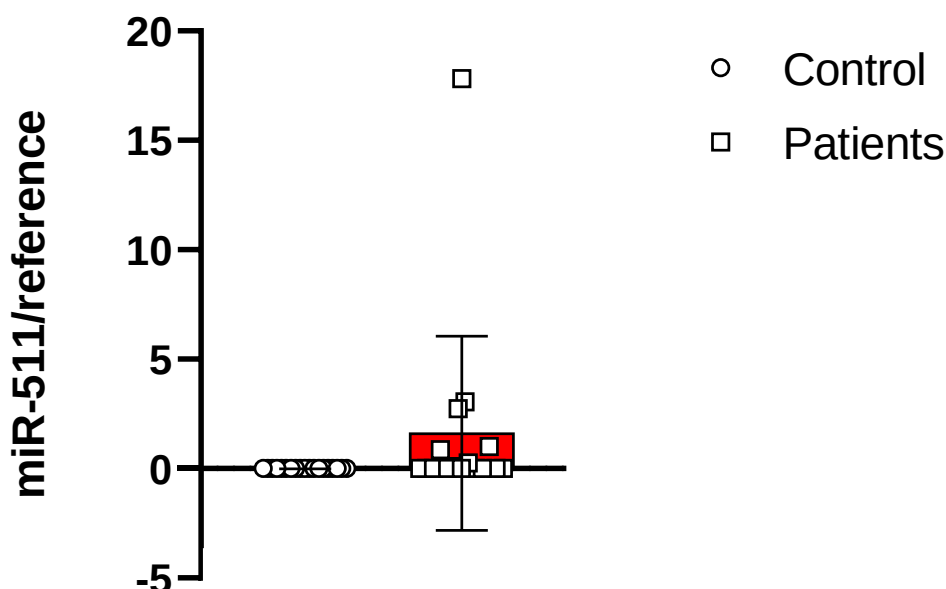
Η συγκέντρωση του miR-511 σε κάθε δείγμα αναγράφεται στον Πίνακα 19. Τα δέκα δείγματα που δεν έδωσαν αποτέλεσμα για το miR-16, δεν έδωσαν επίσης και για το miR-511. Τα C11, 40, 66 εξαιρέθηκαν και η κανονικοποίηση δεν ήταν δυνατή για τα υπόλοιπα επτά δείγματα (C18, 29, 58, 59, 63, 71, 76) (Πίνακας 19). Οι τιμές των επιπέδων του miR-511 στα δείγματα των υγιών ατόμων, πέρα από αυτούς που έδιναν 0 αντίγραφα, κυμαίνονταν από 0.053 έως 0.317 αντίγραφα/μλ. Οι ασθενείς, εκτός από αυτούς με τις μηδενικές τιμές, εμφάνιζαν τιμές από 0.053 έως 0.945 αντίγραφα/μλ.

Πίνακας 19: Ποσοτικοποίηση του γονιδίου αναφοράς και του miR-511 στο σύνολο των δειγμάτων. Ορισμένα δείγματα τρέχτηκαν σε duplicates (πρώτη και δεύτερη στήλη του concentration του reference), ενώ δείγματα που δεν έδωσαν αποτέλεσμα ή δεν είχαν αρκετό cDNA για την αντίδραση πολυμερισμού έγινε ξανά η σύνθεση του cDNA και η ποσοτικοποίηση του reference (τρίτη στήλη). Στην τελευταία στήλη παρουσιάζονται οι κανονικοποιημένες τιμές έκφρασης των δεδομένων απόλυτης ποσοτικοποίησης του miR-511.

Reference				miR-511	miR-511/ref
Συγκέντρωση (copies/μl)			Συγκέντρωση (copies/μl)		
1 ^η	2 ^η	3 ^η			
Control					
C1	228,1	74,07		0,287	0,00125822
C2	142,4			0,107	0,000751404
C3	245,6			0,163	0,0010198
C4	17,01			0,054	0,003174603
C5	17,5			0,054	0,003085714
C6	69,86			0	0
C7	59,53			0,108	0,001814211
C8	74,98	0	0,333	0,114	0,001520405
C9	0			0	0
C10	1,457			0	0
C11	0			0	0
C12	9,418			0	0
C13	8,347			0	0
C14	0,053			0	0
C15	1,957			0	0
C16	59,25			0,317	0,005350211
C17	20,04			0,053	0,002644711
C18	0	71,82		0	0
C19	0,869			0	0
C20	351,4			0	0
C21	1,499			0	0
Patients					
6	0	0	0,061	0	0
10	0,071			0	0
18	0,063			0,054	0,857142857
29	0			0	
39	2,681			0,226	0,084296904
40	0			0	0
43	0,286			0	0
50	0,22			0	0
53	0,054			0	0
58	0			0	
59	0			0,054	
60	0,108			0	0
63	0			0	
66	0				
70	0,054			0,165	3,055555556

71	0			0	
73	0,179			0,49	2,737430168
74	0,317	0		0	0
75	0,053			0,945	17,83018868
76	0			0	
78	0,054			0,054	1
79	0,07			0	0
80	0,208			0,053	0,254807692
81	0,053			0	0

Τα κανονικοποιημένα επίπεδα έκφρασης του miR-511 στις δύο ομάδες (N=19 για την ομάδα ελέγχου και N=16 για τους ασθενείς) δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή και ελέγχθηκαν με τη δοκιμασία Mann-Whitney. Συγκεκριμένα στους ασθενείς οι κανονικοποιημένες τιμές του miR-511 εμφάνιζαν μέσο όρο 1.61 ± 4.43 αντίγραφα/μl, ενώ οι υγιείς είχαν μέσο όρο 0.0011 ± 0.0015 αντίγραφα/μl του miR-511. Παρά το ότι το miR-511 φαίνεται να είναι αυξημένο στην ομάδα των ασθενών, η διαφορά με την ομάδα έλεγχου δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική ($p=0.3610$) (Διάγραμμα 4).

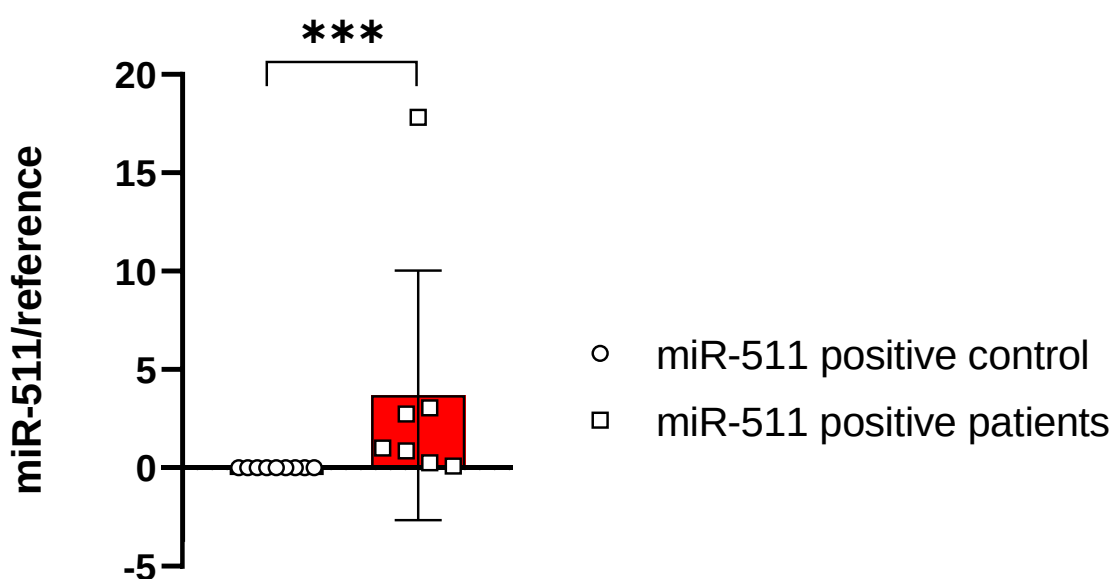


Διάγραμμα 4: Τα επίπεδα έκφρασης του miR-511 στον ορό υγιών ατόμων (μπλε χρώμα, control) και ασθενών με διπολική διαταραχή (κόκκινο χρώμα, patients). Οι τιμές δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά.

Όσον αφορά τα επίπεδα του miR-511, 7 από τους 21 ασθενείς (33%) έδωσαν θετική τιμή (>0) (miR-511 positive patients), 9 από τους 21 ασθενείς έδωσαν μηδενική τιμή (57%) (miR-511 negative patients) και για τους υπόλοιπους δεν ήταν δυνατή η κανονικοποίηση των τιμών. Από την ομάδα ελέγχου, 9 από τους 20 υγιείς (45%) έδωσαν θετική τιμή για το miR-511 (miR-511 positive control), 10 έδωσαν μηδενική τιμή (50%) (miR-511 negative control) και οι υπόλοιπες τιμές δεν κανονικοποιήθηκαν. Τα ποσοστά των ασθενών και των υγιών ατόμων που έδωσαν

θετικές τιμές για το miR-511 (miR-511 positive groups) δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων ($p=0.44$).

Από το σύνολο των 19 υγιών ατόμων και 16 ασθενών με διπολική διαταραχή που έδωσαν μετρήσιμο αποτέλεσμα (0 ή θετικό) για το miR-511, μελετήθηκε εάν υπάρχει διαφορά στα επίπεδα έκφρασης του miR-511 μεταξύ αυτών που έδωσαν θετικές τιμές (miR-511 positive control vs. miR-511 positive patients: 9 υγιείς και 7 ασθενείς). Ειδικότερα, οι miR-511 positive patients εμφάνιζαν μέσο όρο 3.69 ± 6.34 αντίγραφα/μλ, ενώ οι miR-511 positive control είχαν μέσο όρο 0.0023 ± 0.0015 αντίγραφα/μλ του miR-511. Η ομάδα αυτή των ασθενών (miR-511 positive patients) εμφανίζει σημαντικά αυξημένα επίπεδα του miR-511 στο ορό σε σύγκριση με την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου (miR-511 positive control), $p=0.0002$ (Διάγραμμα 5).

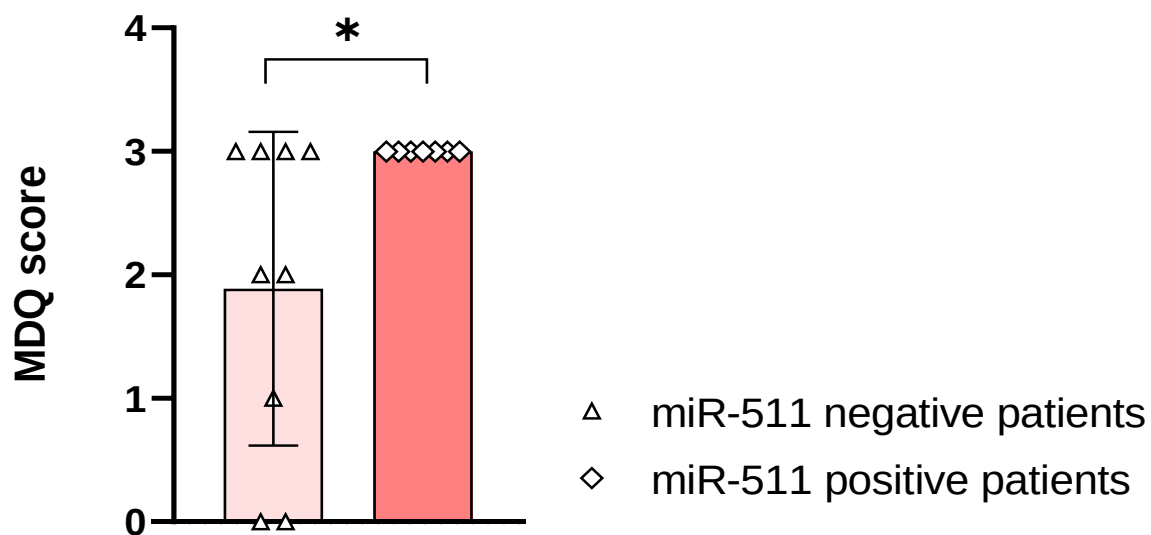


Διάγραμμα 5: Τα επίπεδα έκφρασης του miR-511 στον ορό υγιών ατόμων (μπλε χρώμα, control) και ασθενών με διπολική διαταραχή (κόκκινο χρώμα, patients) που δίνουν τιμές >0 αντίγραφα/μλ. Οι τιμές εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά με $p<0.001$.

Στη συνέχεια, συγκρίθηκαν το φύλο, η ηλικία, το BMI, το MDI score, η διάρκεια και η ηλικία έναρξης της νόσου των miR-511 negative ασθενών και miR-511 positive ασθενών και δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους.

Ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί η σημαντική διαφορά που βρέθηκε στο MDQ score μεταξύ των δύο ομάδων των ασθενών ($p=0.0337$). Οι ασθενείς που δίνουν θετικές τιμές (>0) για το miR-511 έχουν σημαντικά υψηλότερα σκορ στο ερωτηματολόγιο Διαταραχής του Θυμικού (MDQ) σε σχέση με τους ασθενείς που δίνουν μηδενικά επίπεδα (Διάγραμμα 6). Από την ομάδα των miR-511 positive ασθενών, 3 από τους 6 εμφάνιζαν προηγούμενο οικογενειακό ιστορικό

συναισθηματικών διαταραχών (50%), ενώ 2 από τους 9 miR-511 negative ασθενείς είχαν επίσης οικογενειακό ιστορικό (22.22%). Τα ποσοστά αυτά δεν διέφεραν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους ($p=0.264$).



Διάγραμμα 6: Το MDQ σκορ των ασθενών που δίνουν θετικές τιμές των επιπέδων έκφρασης του miR-511 (miR-511 positive patients, ροζ χρώμα) εμφανίζει σημαντική αύξηση ($p < 0.1$) σε σχέση με τους ασθενείς που έχουν μηδενικά επίπεδα του miR-511 (miR-511 zero patients, μπεζ χρώμα).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πολλές μελέτες δείχνουν την ύπαρξη ενός διαφορετικού προφίλ έκφρασης των *cimiRNAs* στο αίμα ατόμων που πάσχουν από διάφορες συναισθηματικές διαταραχές σε σχέση με υγιή άτομα. Η διαφορική αυτή έκφραση συγκεκριμένων, καλά μελετημένων *cimiRNAs* θα μπορούσε να αξιοποιηθεί ως μια εξατομικευμένη μοριακή υπογραφή για την πρόγνωση ή/και διάγνωση τέτοιων ασθενειών όπως και την αξιολόγηση της ανταπόκρισης των ασθενών σε κάποια υπάρχουσα θεραπεία. Σε αυτό το πλαίσιο, στη συγκεκριμένη μελέτη εξετάστηκε η έκφραση των *cimiRNAs*, *miR-16* και *miR-511* στον ορό 21 ασθενών με διπολική διαταραχή και 24 υγιών ατόμων.

Κοινωνικο-οικονομικά και δημογραφικά στοιχεία

Οι δύο ομάδες αντιστοιχίστηκαν ως προς το φύλο και την ηλικία τους, αλλά παρουσίαζαν διαφορές στον τόπο κατοικίας τους, την οικογενειακή τους κατάσταση, τον αριθμό των παιδιών, το μορφωτικό τους επίπεδο, την εργασιακή τους κατάσταση και την καπνιστική τους συμπεριφορά. Η επιλογή των υγιών ατόμων έγινε από το περιβάλλον του Πανεπιστημίου και για το λόγο αυτό υπάρχουν κάποιες από τις διαφορές στα κοινωνικά χαρακτηριστικά μεταξύ των δύο ομάδων, όπως για παράδειγμα τα πολύ υψηλότερα ποσοστά ανεργίας και τα χαμηλά επίπεδα σπουδών των ασθενών. Μία κύρια όμως διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων είναι ότι οι ασθενείς, παρά το ότι βρίσκονται σε φάση νορμοθυμίας, σημειώνουν στις κλίμακες υψηλότερα score τόσο στο ερωτηματολόγιο MDQ όσο και στο MDI συγκριτικά με τους υγιείς.

Στη παρούσα μελέτη οι περισσότεροι ασθενείς προέρχονταν από αγροτική περιοχή σε σύγκριση με τα υγιή άτομα. Η έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου, η έλλειψη κοινωνικής στήριξης, η φτώχεια και η μειωμένη πρόσβαση στη δημόσια υγεία αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης ψυχιατρικών ασθενειών (Lee SC et al., 2020). Αν και η συχνότητα εμφάνισης της διπολικής διαταραχής ανάμεσα σε άτομα που κατοικούν σε αστικές και σε αγροτικές περιοχές στον γενικό πληθυσμό παρουσιάζει παρόμοιες τιμές, η επίπτωση της διπολικής διαταραχής είναι σημαντικά υψηλότερη σε υποβαθμισμένες περιοχές με υψηλό δείκτη υλικής στέρησης (Kroon et al., 2013). Τα ευρήματα αυτά πιθανώς ερμηνεύουν τα υψηλότερα ποσοστά διαμονής των ασθενών σε αγροτικές περιοχές της Ελλάδας, αφού αυτές οι περιοχές εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα στέρησης σε σχέση με τον αστικό ιστό (Lyberaki et al., 2010).

Επιπλέον, οι ασθενείς στην πλειοψηφία τους ήταν άγαμοι και οι έγγαμοι είχαν λιγότερα παιδιά από τους υγιείς εθελοντές. Προηγούμενες μελέτες, που εξετάστηκε η οικογενειακή κατάσταση ως κοινωνικοοικονομικός παράγοντας σε σχέση με τη διπολική διαταραχή, βρέθηκε ότι τα άτομα που είναι μόνα τους τείνουν να έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της ασθένειας σε σχέση με παντρεμένα άτομα, πιθανώς λόγω της απουσίας συναισθηματικής και κοινωνικής υποστήριξης

στην καθημερινή τους ζωή (Tsuchiya et al., 2013). Υπάρχουν ενδείξεις ότι υψηλότερες συχνότητες διπολικής διαταραχής παρατηρούνται σε άτομα που παραμένουν ανύπαντρα, πιθανότατα γιατί τα άτομα που πάσχουν και παντρεύονται αδυνατούν να διατηρήσουν το γάμο τους (Lieberman et al., 2010). Ειδικότερα, τα άτομα με διπολική διαταραχή σημειώνουν χαμηλότερες βαθμολογίες σε κλίμακες συζυγικής προσαρμογής, έχουν περισσότερες εξωσυζυγικές σεξουαλικές εμπειρίες και υψηλότερα ποσοστά διαζυγίων (Lieberman et al., 2010). Η διαταραχή των κοινωνικών σχέσεων, ως απόρροια της ασθένειας, μπορεί να οφείλεται για τη συσχέτιση της διπολικής διαταραχής με την οικογενειακή κατάσταση (Rowland & Marwaha, 2018). Οι διαφορές στον αριθμό των παιδιών μπορεί να οφείλονται στην αδυναμία σύναψης σταθερών σχέσεων, στα χαμηλότερα ποσοστά γονιμότητας που εμφανίζουν οι ασθενείς με διπολική διαταραχή, τόσο άνδρες όσο και γυναίκες, σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό, αλλά ακόμη και στην ύπαρξη υψηλών ποσοστών σεξουαλικής δυσλειτουργίας μεταξύ των ασθενών που λαμβάνουν ψυχοτρόπα φάρμακα (Grover et al., 2017).

Οι περισσότεροι ασθενείς της μελέτης ολοκλήρωσαν τις σπουδές τους μέχρι το επίπεδο του Λυκείου, σε αντίθεση με την ομάδα ελέγχου που πολλοί από αυτούς είχαν Διδακτορικό δίπλωμα. Η επιλογή της ομάδας ελέγχου έγινε εντός του χώρου του Πανεπιστημίου, οπότε πιθανώς αυτές οι διαφορές στο μορφωτικό επίπεδο να αντικατοπτρίζουν στην πραγματικότητα μόνο το συγκεκριμένο δείγμα και όχι τον γενικό πληθυσμό. Σε μια μελέτη, όμως, που αφορά το μορφωτικό επίπεδο ατόμων με διπολική διαταραχή βρέθηκε ότι οι ασθενείς συμπλήρωναν λιγότερα χρόνια εκπαίδευσης, ενώ όσοι συνέχιζαν τις σπουδές τους αδυνατούσαν να τις ολοκληρώσουν (Glahn et al., 2006). Οι παράγοντες που συνεισφέρουν στην κακή επίδοση μπορεί να είναι συνέπεια είτε γνωστικών είτε συμπεριφορικών διαταραχών που χαρακτηρίζουν την ασθένεια, χωρίς να αποκλείεται και η κατάχρηση ουσιών που σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα τερματισμού των σπουδών, αφού πολλοί ασθενείς εμφανίζουν συχνά τέτοιο ιστορικό (Glahn et al., 2006).

Οι ασθενείς που ήταν εργαζόμενοι συγκριτικά με τους υγιείς ήταν πολύ λιγότεροι. Αν και στην παρούσα μελέτη οι υγιείς προέρχονταν από το χώρο του Πανεπιστημίου, μελέτες δείχνουν υψηλά ποσοστά ανεργίας που παρουσιάζουν οι ασθενείς με διπολική διαταραχή σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό (40 – 60%) που κατά κύριο λόγο οφείλεται στα καταθλιπτικά συμπτώματα των ασθενών που ευθύνονται για τη χαμηλή τους παραγωγικότητα και την αδυναμία κοινωνικής δικτύωσης στο εργασιακό περιβάλλον (O'Donnell et al., 2022; Sletved et al., 2022).

Η πλειοψηφία των ασθενών στη μελέτη ήταν καπνιστές, συμπεριφορά που παρατηρείται συχνά στα άτομα με συναισθηματικές διαταραχές αν και η συσχέτιση του καπνίσματος με τη διπολική διαταραχή παραμένει αδιευκρίνιστη (Weinberger et al., 2017).

Ένα σχετικά μεγάλο ποσοστό των ασθενών (29.17%) εμφάνισαν και κάποιο άλλο νόσημα, κυρίως σακχαρώδη διαβήτη και υπέρταση. Πράγματι, μελέτες ανασκόπησης εκτιμούν ότι τουλάχιστον το 50% των ασθενών με διπολική διαταραχή πληρούν τα κριτήρια και για άλλες ψυχικές ή οργανικές διαταραχές, με προφανείς επιπτώσεις στο διαγνωστικό πλαίσιο, τη θεραπεία και το κόστος υγειονομικής τους περίθαλψης (De Berardis et al., 2023).

Επίπεδα miR-16 και miR-511 στον ορό ασθενών και υγιών ατόμων

Αρχικό βήμα για την ποσοτικοποίηση των δύο cimiRNAs στις ομάδες των υγιών και ασθενών ατόμων αποτέλεσε η απομόνωση του συνόλου των μικρών μορίων RNA από τα δείγματα. Ενώ η συγκέντρωση του συνολικού απομονωμένου RNA των ασθενών φάνηκε να είναι σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή των υγιών ατόμων, μία τέτοια διαφορά δεν μπορεί να είναι αντιπροσωπευτική κάποιας κατάστασης γιατί τέτοιου τύπου μελέτες στηρίζονται σε μεμονωμένα μόρια - βιοδείκτες που περιέχονται εντός αυτού του συνόλου.

Στον ορό αυτών των ασθενών με διπολική διαταραχή, το miR-16 βρέθηκε σημαντικά μειωμένο. Μέχρι στιγμής, το miR-16 δεν έχει μελετηθεί στην διπολική διαταραχή, ώστε να μπορέσει να γίνει κάποια άμεση σύγκριση με αποτελέσματα άλλων ερευνών. Εντούτοις, έχει μελετηθεί στην κατάθλιψη, όπου βρέθηκε μειωμένο, τόσο στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (Żurawek & Turecki, 2021) όσο και στον ορό των ασθενών (Gheysarzadeh et al., 2018; Ding et al., 2023) και τα επίπεδα του φαίνεται να επηρεάζονται από τη θεραπεία με SSRI καθώς μελέτες σε πειραματικά μοντέλα ζώων έδειξαν ότι οι SSRIs αυξάνουν τα επίπεδα του miR-16 στους σεροτονεργικούς πυρήνες της ραφής του εγκεφάλου προς τα φυσιολογικά (Yang et al., 2017). Το miR-16 αν και ελαττώνεται στη διπολική διαταραχή η μεταβολή αυτή των επιπέδων του δεν αποτελεί εκλεκτικό βιοδείκτη για τη διάγνωση της διπολικής διαταραχής, καθώς η έκφρασή του miR-16 φαίνεται να απορρυθμίζεται πέρα από τις συναισθηματικές διαταραχές και στο αίμα ασθενών που πάσχουν από συστημικές χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους, όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα και συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (Yan et al., 2019). Στην παρούσα εργασία οι ασθενείς (με διπολική διαταραχή) κλινικά βρίσκονταν σε φάση νορμοθυμίας, δεν λάμβαναν αντικαταθλιπτικά αλλά κυρίως άτυπα αντιψυχωσικά φάρμακα, τα οποία, σε αντίθεση με τους SSRI δε φαίνεται να επηρεάζουν τα επίπεδα του miR-16 (Swathy & Banerjee, 2022).

Κατά τη νορμοθυμική φάση των ατόμων με διπολική διαταραχή γενικώς θεωρείται ότι απουσιάζουν τα συμπτώματα της ασθένειας, κάτι μάλλον αμφιλεγόμενο (Lemaire et al., 2012). Παρόμοια, οι ασθενείς της μελέτης αυτής παρουσίασαν υψηλότερα σκορ στις κλίμακες των ερωτηματολογίων MDQ και MDI, κάτι το οποίο φανερώνει μία αδυναμία σταθεροποίησης της διάθεσής τους. Η απορρύθμιση των επιπέδων έκφρασης του miR-16 είναι πιθανόν να συσχετίζεται

με το παράδοξο χαρακτηριστικό της συναισθηματικής υπερ-ευαισθησίας που εμφανίζουν οι νορμοθυμικοί ασθενείς ακόμη και σε ουδέτερες καταστάσεις, το οποίο τους καθιστά ευάλωτους ακόμη και σε μικρά στρεσογόνα γεγονότα στη ζωή τους (M'bailara et al., 2009).

Το miR-16 έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται σε μονοπάτια συναπτικής διαβίβασης, καθώς στοχεύει τον μεταφορέα σεροτονίνης (Yang et al., 2010). Έτσι, τα μειωμένα επίπεδα του miR-16 που εντοπίσαμε στον ορό των ασθενών πιθανώς να ερμηνεύουν τις δυσλειτουργίες στη σεροτονεργική διαβίβαση όπως και τα αλλαγμένα επίπεδα του μεταφορέα σεροτονίνης που έχουν παρατηρηθεί στον εγκέφαλο και στο αίμα ασθενών με συναισθηματικές διαταραχές (Kambeitz & Howes, 2015).

Εκτός από τον μεταφορέα σεροτονίνης στόχος του miR-16 αποτελεί και ο νευροτροφικός παράγοντας BDNF, που εμπλέκεται σε μονοπάτια νευρωνικής επιβίωσης και συναπτικής πλαστικότητας και βρίσκεται σε αφθονία στον ιππόκαμπο, περιοχή του εγκεφάλου επιρρεπή στο στρες (Bai et al., 2012). Ο BDNF θεωρείται ότι συσχετίζεται με την παθοφυσιολογία της διπολικής διαταραχής και προηγούμενες μελέτες επιβεβαιώνουν μεταβολές στα επίπεδα του σε ασθενείς με διπολική διαταραχή (Chiou & Huang, 2019; Petersen et al., 2021; Wang D et al., 2020). Ωστόσο, ορισμένες από αυτές αναφέρουν την αύξηση των επιπέδων του και άλλες τη μείωσή του, το οποίο μπορεί να οφείλεται στην επιλογή ενός διαφορετικού συνόλου ασθενών με διαφορετική κλινική εικόνα. Τα ελαττωμένα επίπεδα του miR-16 στον ορό των ασθενών είναι πιθανό να σχετίζονται με τα αυξημένα επίπεδα του BDNF που έχουν αναφερθεί σε ασθενείς που βρίσκονταν σε αρχικά στάδια της νόσου (Petersen et al., 2021), εντούτοις στην παρούσα μελέτη τα επίπεδα του miR-16 δεν σχετίζονται με τα χρόνια νόσησης. Ο άμεσος προσδιορισμός των επιπέδων του BDNF και η συσχέτιση του με τα επίπεδα του BDNF, θα μπορούσε πιθανόν να αναδείξει μια τέτοια συσχέτιση.

Μελέτες έχουν δείξει ότι το miR-16 φαίνεται να ευοδώνει την κυτταρική επιβίωση (μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών PI3K/Akt/mTor) και να ελαττώνει την έκφραση δεικτών απόπτωσης, όπως η κασπάση-3 (Yang et al., 2017). Η ελάττωση λοιπόν του miR-16 στους διπολικούς ασθενείς μπορεί να σχετίζεται με την απόπτωση και την αυτοφαγία που αυξάνονται σταδιακά στη κατάθλιψη και τη διπολική διαταραχή, αν και στην μελέτη αυτή δεν βρέθηκε συσχέτιση των επιπέδων του miR-16 με τα χρόνια νόσησης.

Το miR-16 εμπλέκεται επίσης σε αποκρίσεις στρες, έναν σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση συναισθηματικών διαταραχών, όπως επιβεβαιώνουν μελέτες έκφρασής του σε *in vitro* πειράματα κυτταροκαλλιιεργειών σεροτονεργικών νευρώνων και σε *in vivo* μοντέλα χρόνιου στρες τρωκτικών, που προσομοιάζουν την κατάθλιψη (Baudry et al., 2010; Yang et al., 2017; Baudry et al., 2019; Xu et al., 2019; Bai et al., 2012; Song et al., 2015). Στα διάφορα μοντέλα

χρόνιου ήπιου στρες ύστερα από τη θεραπεία με φλουοξετίνη, οι τιμές έκφρασης του miR-16 των «στρεσαρισμένων» αρουραίων προσέγγιζαν ως ένα βαθμό αυτές που εμφάνιζαν τα μη στρεσαρισμένα – control ζώα και τα συμπτώματα της κατάθλιψης εξομαλύνονταν σε συμπεριφορικό επίπεδο (Yang et al., 2017). Το miR-16 έχει πιθανώς έναν προστατευτικό ρόλο και μία μείωση των επιπέδων του θα μπορούσε να συμβάλλει στην εμφάνιση ενός συναισθηματικής φύσεως παθολογικού φαινοτύπου. Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη δεν πραγματοποιήθηκαν στους ασθενείς μετρήσεις για πιθανούς δείκτες στρες, όπως π.χ. τα επίπεδα κορτιζόλης ώστε να υπάρχει κάποια άμεση συσχέτιση μεταξύ των ελαττωμένων επιπέδων του miR-16 των ασθενών με την εμφάνιση του στρες. Από την άλλη, σε ένα άλλο ζωικό μοντέλο στρες παρατηρήθηκε ο φαινότυπος των ανθεκτικών στο στρες τρωκτικών, με ορισμένα ζώα που έχουν εκτεθεί σε στρεσογόνα ερεθίσματα να εμφανίζουν παρόμοια επίπεδα του miR-16 με τα control, υποδεικνύοντας έναν πιθανό μηχανισμό αντιμετώπισης του στρες σε μοριακό επίπεδο μέσω της αύξησης του miR-16 (Zurawek et al., 2016).

Όσον αφορά το miR-511, στην παρούσα εργασία τα επίπεδά του φάνηκε να είναι αυξημένα στους ασθενείς με διπολική διαταραχή. Έως τώρα, η έκφραση του miR-511 δεν είχε μελετηθεί στο αίμα ασθενών με συναισθηματικές διαταραχές (Maheu et al., 2015). Το miR-511 έχει προσδιορισθεί αποκλειστικά σε νεκροτομικό ιστό από εγκέφαλο ασθενών με κατάθλιψη και παρατηρήθηκαν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου (Maheu et al., 2015; Yoshino et al., 2021). Συγκεκριμένα, σε δείγματα βασεοπλευρικής αμυγδαλής (Basolateral Amygdala, BLA) ασθενών με MDD η έκφρασή του βρέθηκε αυξημένη, ενώ σε δείγματα πλαγιοραχιαίου προμετωπιαίου φλοιού (dorsolateral Prefrontal Cortex, dlPFC) η έκφρασή του ήταν μειωμένη (Maheu et al., 2015; Yoshino et al., 2021). Αυτές οι διαφορές στα επίπεδα έκφρασης υποδεικνύουν ότι δεν είναι δυνατό να γίνει κάποια άμεση θετική ή αρνητική συσχέτιση των επιπέδων του miR-511 μεταξύ εγκεφάλου και αίματος. Στη παρούσα μελέτη, τα επίπεδα του miR-511 στον ορό των miR-511 positive ασθενών βρέθηκαν σημαντικά υψηλότερα συγκριτικά με τους miR-511 positive υγιείς ($p < 0.001$), αλλά αυτό πιθανώς οφείλεται στον σχετικά μικρό αριθμό δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη.

Το miR-511 στοχεύει το mRNA του FKBP5, μιας πρωτεΐνης που δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της σηματοδότησης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR), ο οποίος με τη σειρά του ρυθμίζει τον άξονα υποθαλάμου – υπόφυσης – επινεφριδίων (YYE), που εμπλέκεται στις αποκρίσεις στρες (Zheng et al., 2016). Έτσι, η αύξηση των επιπέδων του miR-511 μπορεί να σχετίζεται με την αύξηση της δραστηριότητας της σηματοδότησης του GR που αντικατοπτρίζεται ως μία υπερδραστηριότητα στον άξονα YYE, ένα κύριο γνώρισμα της διπολικής διαταραχής (Spiliotaki

et al., 2006). Δεδομένου ότι το στρες αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση της διπολικής διαταραχής, γίνεται αντιληπτή η σημασία του miR-511 στα μονοπάτια παθογένεσης της νόσου (Umeoka et al., 2021). Σε ένα μοντέλο διαταραχής μετατραυματικού στρες (Post-Traumatic Stress Disorder, PTSD) ποντικών, το miR-511 φάνηκε ελαττωμένο σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου (ιππόκαμπος, υποθάλαμος, προμετωπιαίος φλοιός) των ποντικών που είχαν εκτεθεί στο στρες (Maurel et al., 2021). Ωστόσο, τα ποντίκια που ήταν ανθεκτικά στο στρες, στις ίδιες περιοχές του εγκεφάλου, παρουσίαζαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα του miR-511, ακόμη πιο υψηλά και από τα control ποντίκια. Αυτό πιθανώς φανερώνει την ύπαρξη ενός μοριακού αντισταθμιστικού μηχανισμού που προσδίδει αυτή την ανθεκτικότητα στο στρες (Maurel et al., 2021). Τα αυξημένα επίπεδα του miR-511 των ασθενών βρίσκονται σε αντιστοιχία με την αυξημένη έκφρασή του στον ορό τρωκτικών σε ένα μοντέλο PTSD, χωρίς όμως να διαφέρουν σημαντικά από τα υγιή άτομα (Maheu et al., 2021).

Παράλληλα, το miR-511 στοχεύει μια ισομορφή του υποδοχέα του νευροτροφικού παράγοντα GDNF (GFRα1a), ο οποίος ρυθμίζει την επιβίωση των νευρώνων, τη συναπτική διαβίβαση και είναι απαραίτητος για τη σύνθεση της ντοπαμίνης. Η αύξηση των επιπέδων του πιθανώς να έχει κάποια σχέση και με τις ανωμαλίες στις ντοπαμινεργικές λειτουργίες που παρατηρούνται στη διπολική διαταραχή (Ashok et al., 2017; Maheu et al., 2015; Tenenbaum & Humbert-Claude, 2017).

Το miR-511 δεν έχει μελετηθεί στην κυκλοφορία, παρά μόνο σε μία έρευνα που αναφέρει τον εντοπισμό του σε δενδριτικά κύτταρα και μακροφάγα του αίματος σε *ex vivo* κυτταροκαλλιέργειες μονοκυττάρων ανθρώπινης προέλευσης (Tserel et al., 2011). Εκεί φάνηκε να ρυθμίζει θετικά, σε ορισμένα στάδια του κυτταρικού κύκλου, την έκφραση του υποδοχέα τύπου Toll 4 (Toll-like Receptor 4), μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης που προάγει προ-φλεγμονώδεις αποκρίσεις (Tserel et al., 2011). Η σχετική αύξηση των επιπέδων του miR-511 που βρέθηκε, πιθανώς υποδηλώνει την ύπαρξη νευροφλεγμονής σε αυτούς τους ασθενείς, ένα χαρακτηριστικό που παρατηρείται συχνά στις διαταραχές τις διάθεσης (Benedetti et al., 2020).

Πειράματα σε ποντίκια που έχουν υποστεί σηπτικό σοκ δείχνουν επίσης ότι το miR-511 εμπλέκεται στη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων σε περιπτώσεις χρόνιας φλεγμονής. Ένας ακόμη στόχος του αποτελεί ο TNFR, ο οποίος μεσολαβεί την παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών και την απελευθέρωση άλλων κυτταροκινών που δρουν συνεργιστικά με τον παράγοντα νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor, TNF), μία από τις κυριότερες προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, για την ενορχήστρωση των απαντήσεων της φυσικής ανοσίας (Cavaillon, 2015). Αλλαγές στη φυσική ανοσία έχουν ήδη περιγραφεί σε διαταραχές της διάθεσης

(Ahmetpahic et al., 2018). Προηγούμενες μελέτες στον χώρο του Πανεπιστημίου μας επιβεβαιώνουν τη αύξηση των επιπέδων δεικτών φλεγμονής στο αίμα ασθενών με διπολική διαταραχή (Dadouli et al., 2022). Αυτή η μεταβολή θα μπορούσε να αποδοθεί σε φλεγμονή χαμηλού βαθμού ή/και σε ψυχολογικό στρες, καθώς και οι δύο παράγοντες μπορεί να εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της διπολικής διαταραχής και πιθανώς σχετίζονται με τις δράσεις του miR-511. Το χρόνιο στρες έχει κατασταλτικό ρόλο στο ανοσοποιητικό και μελέτες έδειξαν ότι μπορεί να μεταβάλλει τη λειτουργία των ουδετεροφίλων με πιθανό αποτέλεσμα την εμφάνιση καταθλιπτικών συμπτωμάτων (Seggerstrom et al., 2004; Duggal et al., 2013).

Τέλος, ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί το σημαντικά υψηλότερο MDQ σκορ των ασθενών που έδωσαν θετικές τιμές για τα επίπεδα έκφρασης του miR-511 σε σχέση με τους ασθενείς που έδωσαν μηδενικά επίπεδα. Ένα υψηλότερο σκορ για το ερωτηματολόγιο MDQ συνήθως συνοδεύεται και από μία πιο σοβαρή διαταραχή των λειτουργιών των ασθενών (Raimo et al., 2021). Επομένως, αυτή η αύξηση των επιπέδων του miR-511 θα μπορούσε να έχει κάποια σχέση με τη βαρύτητα της νόσου.

Συνοψίζοντας, τα ευρήματα για τα επίπεδα των miR-16 και miR-511 στον ορό των ασθενών με διπολική διαταραχή είναι αρκετά υποσχόμενα και συνάδουν με τις μέχρι τώρα μελέτες έκφρασης στην κυκλοφορία όσον αφορά τις συναισθηματικές διαταραχές. Το miR-16 φαίνεται ότι και στη διπολική διαταραχή αποτελεί έναν δείκτη, που ακόμη και σε αυτό το μικρό μέγεθος δείγματος, είναι διαφορετικός απ'ότι στα υγιή άτομα. Είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθούν εκτενέστερες μελέτες, ώστε να φανεί εάν αυτός ο δείκτης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα προγνωστικό στοιχείο ή στοιχείο που να δείχνει την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία, μέσω του προσδιορισμού του σε διαφορετικές φάσεις της ασθένειας (μανία, υπομανία, κατάθλιψη, νορμοθυμία). Χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση των επιπέδων των συγκεκριμένων miRNAs, πιθανώς σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, ακόμα και σε μία ποικιλία από βιολογικά υγρά. Αυτό θα βοηθήσει στη βελτιστοποίηση της διαδικασίας ποσοτικοποίησής τους, ώστε να υπάρξει η δυνατότητα να αξιοποιηθούν ως μη παρεμβατικοί βιοδείκτες για την παρακολούθηση της πορείας ασθενών με συναισθηματικές διαταραχές και την αποτελεσματικότητα της θεραπείας τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdollahi S, Zare-Chahoki A, Noorbakhsh F, Gorji A. A Review of Molecular Interplay between Neurotrophins and miRNAs in Neuropsychological Disorders. *Mol Neurobiol*. 2022 Oct;59(10):6260-6280.
- Ahmetspahic D, Brinker D, Alferink J. Depression-Associated Cellular Components of the Innate and Adaptive Immune System. *Inflammation and Immunity in Depression: Basic Science and Clinical Applications*. 2018 Jan 1;1–16.
- Allen L, Dwivedi Y. MicroRNA mediators of early life stress vulnerability to depression and suicidal behavior. *Mol Psychiatry*. 2020 Feb;25(2):308-320.
- Ambros V, Ruvkun G. Recent Molecular Genetic Explorations of *Caenorhabditis elegans* MicroRNAs. *Genetics*. 2018 Jul;209(3):651-673.
- Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 22;108(12):5003-8.
- Ashok AH, Marques TR, Jauhar S, Nour MM, Goodwin GM, Young AH, Howes OD. The dopamine hypothesis of bipolar affective disorder: the state of the art and implications for treatment. *Mol Psychiatry*. 2017 May;22(5):666-679.
- Ashraf SI, McLoon AL, Sclarsic SM, Kunes S. Synaptic protein synthesis associated with memory is regulated by the RISC pathway in *Drosophila*. *Cell*. 2006 Jan 13;124(1):191-205.
- Bahi A. Sustained lentiviral-mediated overexpression of microRNA124a in the dentate gyrus exacerbates anxiety- and autism-like behaviors associated with neonatal isolation in rats. *Behav Brain Res*. 2016 Sep 15;311:298-308.
- Bai M, Zhu X, Zhang Y, Zhang S, Zhang L, Xue L, Yi J, Yao S, Zhang X. Abnormal hippocampal BDNF and miR-16 expression is associated with depression-like behaviors induced by stress during early life. *PLoS One*. 2012;7(10):e46921.
- Baltrušis P, Höglund J. Digital PCR: modern solution to parasite diagnostics and population trait genetics. *Parasit Vectors*. 2023 Apr 25;16(1):143.
- Barrey E, Saint-Auret G, Bonnamy B, Damas D, Boyer O, Gidrol X. Pre-microRNA and mature microRNA in human mitochondria. *PLoS One*. 2011;6(5):e20220.
- Baudry A, Mouillet-Richard S, Schneider B, Launay JM, Kellermann O. miR-16 targets the serotonin transporter: a new facet for adaptive responses to antidepressants. *Science*. 2010 Sep 17;329(5998):1537-41.

- Baudry A, Pietri M, Launay JM, Kellermann O, Schneider B. Multifaceted Regulations of the Serotonin Transporter: Impact on Antidepressant Response. *Front Neurosci*. 2019 Feb 12;13:91.
- Benedetti F, Aggio V, Pratesi ML, Greco G, Furlan R. Neuroinflammation in Bipolar Depression. *Front Psychiatry*. 2020 Feb 26;11:71.
- Biomarkers Definitions Working Group.. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001 Mar;69(3):89-95.
- Boon RA, Vickers KC. Intercellular transport of microRNAs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013 Feb;33(2):186-92.
- Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*. 2006 Dec;13(12):1097-101.
- Boxberger N, Hecker M, Zettl UK. Dysregulation of Inflammasome Priming and Activation by MicroRNAs in Human Immune-Mediated Diseases. *J Immunol*. 2019 Apr 15;202(8):2177-2187.
- Canfrán-Duque A, Lin CS, Goedeke L, Suárez Y, Fernández-Hernando C. Micro-RNAs and High-Density Lipoprotein Metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016 Jun;36(6):1076-84.
- Cao DD, Li L, Chan WY. MicroRNAs: Key Regulators in the Central Nervous System and Their Implication in Neurological Diseases. *Int J Mol Sci*. 2016 May 28;17(6):842.
- Carroll WM. The global burden of neurological disorders. *Lancet Neurol*. 2019 May;18(5):418-419.
- Cattane N, Mora C, Lopizzo N, Borsini A, Maj C, Pedrini L, Rossi R, Riva MA, Pariante CM, Cattaneo A. Identification of a miRNAs signature associated with exposure to stress early in life and enhanced vulnerability for schizophrenia: New insights for the key role of miR-125b-1-3p in neurodevelopmental processes. *Schizophr Res*. 2019 Mar;205:63-75.
- Caudy AA, Myers M, Hannon GJ, Hammond SM. Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev*. 2002 Oct 1;16(19):2491-6.
- Cavaillon JM. The fiendish behavior of TNF can be counteracted by microRNA. *EMBO Mol Med*. 2015 Aug;7(8):989-91.
- Chan SP, Slack FJ. microRNA-mediated silencing inside P-bodies. *RNA Biol*. 2006 Jul;3(3):97-100.
- Chen W, Qin C. General hallmarks of microRNAs in brain evolution and development. *RNA Biol*. 2015;12(7):701-8.

- Chen Y, Wang X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Res.* 2020 Jan 8;48(D1):D127-D131.
- Cheng LC, Pastrana E, Tavazoie M, Doetsch F. miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. *Nat Neurosci.* 2009 Apr;12(4):399-408.
- Chiou YJ, Huang TL. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and bipolar disorder. *Psychiatry Res.* 2019 Apr;274:395-399.
- Chipman LB, Pasquinelli AE. miRNA Targeting: Growing beyond the Seed. *Trends Genet.* 2019 Mar;35(3):215-222.
- Cho KHT, Xu B, Blenkiron C, Fraser M. Emerging Roles of miRNAs in Brain Development and Perinatal Brain Injury. *Front Physiol.* 2019 Mar 28;10:227.
- Crabtree GW, Gogos JA. Synaptic plasticity, neural circuits, and the emerging role of altered short-term information processing in schizophrenia. *Front Synaptic Neurosci.* 2014 Nov 25;6:28.
- Czarny P, Bialek K, Ziolkowska S, Talarowska M, Śliwiński T. *The Neuroscience of Depression.* Academic Press. 2021 Mar 19;1:3-13.
- Dadouli K, Janho MB, Hatziefthimiou A, Voulgaridi I, Piaha K, Anagnostopoulos L, Ntellas P, Mouchtouri VA, Bonotis K, Christodoulou N, Speletas M, Hadjichristodoulou C. Neutrophil-to-Lymphocyte, Monocyte-to-Lymphocyte, Platelet-to-Lymphocyte Ratio and Systemic Immune-Inflammatory Index in Different States of Bipolar Disorder. *Brain Sci.* 2022 Aug 4;12(8):1034.
- De Berardis D, Fornaro M, Carmassi C. Editorial: Comorbidity in bipolar disorder, volume II. *Front Psychiatry.* 2023 Feb 28;14:1115357.
- Ding R, Su D, Zhao Q, Wang Y, Wang JY, Lv S, Ji X. The role of microRNAs in depression. *Front Pharmacol.* 2023 Mar 29;14:1129186.
- Duggal NA, Upton J, Phillips AC, Hampson P, Lord JM. Depressive symptoms are associated with reduced neutrophil function in hip fracture patients. *Brain Behav Immun.* 2013 Oct 1;33:173–82.
- Duman RS, Aghajanian GK, Sanacora G, Krystal JH. Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants. *Nat Med.* 2016 Mar;22(3):238-49.
- Dwivedi Y. Emerging role of microRNAs in major depressive disorder: diagnosis and therapeutic implications. *Dialogues Clin Neurosci.* 2014 Mar;16(1):43-61.
- Dwivedi Y. microRNAs as Biomarker in Depression Pathogenesis. *Ann Psychiatry Ment Health.* 2013;1(1):1003.

- Fan C, Zhu X, Song Q, Wang P, Liu Z, Yu SY. MiR-134 modulates chronic stress-induced structural plasticity and depression-like behaviors via downregulation of Limk1/cofilin signaling in rats. *Neuropharmacology*. 2018 Mar 15;131:364-376.
- Fan Z, Lu M, Qiao C, Zhou Y, Ding JH, Hu G. MicroRNA-7 Enhances Subventricular Zone Neurogenesis by Inhibiting NLRP3/Caspase-1 Axis in Adult Neural Stem Cells. *Mol Neurobiol*. 2016 Dec;53(10):7057-7069.
- Fountoulakis KN, Iacovides A, Kleanthous S, Samolis S, Gougoulas K, Tsiptsios I, Kaprinis GS, Bech P. Reliability, validity and psychometric properties of the Greek translation of the Major Depression Inventory. *BMC Psychiatry*. 2003 Jan 29;3:2.
- Gheysarzadeh A, Sadeghifard N, Afraidooni L, Pooyan F, Mofid MR, Valadbeigi H, Bakhtiari H, Keikhavani S. Serum-based microRNA biomarkers for major depression: MiR-16, miR-135a, and miR-1202. *J Res Med Sci*. 2018 Aug 23;23:69.
- Gill PS, Dweep H, Rose S, Wickramasinghe PJ, Vyas KK, McCullough S, Porter-Gill PA, Frye RE. Integrated microRNA-mRNA Expression Profiling Identifies Novel Targets and Networks Associated with Autism. *J Pers Med*. 2022 Jun 1;12(6):920.
- Glahn DC, Bearden CE, Bowden CL, Soares JC. Reduced educational attainment in bipolar disorder. *J Affect Disord*. 2006 Jun;92(2-3):309-12.
- Glinge C, Clauss S, Boddum K, Jabbari R, Jabbari J, Risgaard B, Tomsits P, Hildebrand B, Kääb S, Wakili R, Jespersen T, Tfelt-Hansen J. Stability of Circulating Blood-Based MicroRNAs - Pre-Analytic Methodological Considerations. *PLoS One*. 2017 Feb 2;12(2):e0167969.
- Grover S, Nehra R, Thakur A. Bipolar affective disorder and its impact on various aspects of marital relationship. *Ind Psychiatry J*. 2017 Jul-Dec;26(2):114-120.
- Gu S, Kay MA. How do miRNAs mediate translational repression? *Silence*. 2010 May 7;1(1):11.
- Gümürdü A, Yildiz R, Eren E, Karakulah G, Ünver T, Genç Ş, Park Y. MicroRNA exocytosis by large dense-core vesicle fusion. *Sci Rep*. 2017 Mar 30;7:45661.
- Gupta A, Pulliam L. Exosomes as mediators of neuroinflammation. *J Neuroinflammation*. 2014 Apr 3;11:68.
- He J, Ren W, Wang W, Han W, Jiang L, Zhang D, Guo M. Exosomal targeting and its potential clinical application. *Drug Deliv Transl Res*. 2022 Oct;12(10):2385-2402.
- Huang HY, Lin YC, Cui S, Huang Y, Tang Y, Xu J, Bao J, Li Y, Wen J, Zuo H, Wang W, Li J, Ni J, Ruan Y, Li L, Chen Y, Xie Y, Zhu Z, Cai X, Chen X, Yao L, Chen Y, Luo Y, Lu Xu S, Luo M, Chiu CM, Ma K, Zhu L, Cheng GJ, Bai C, Chiang YC, Wang L, Wei F, Lee

- TY, Huang HD. miRTarBase update 2022: an informative resource for experimentally validated miRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* 2022 Jan 7;50(D1):D222-D230.
- Huebschman JL, Corona KS, Guo Y, Smith LN. The Fragile X Mental Retardation Protein Regulates Striatal Medium Spiny Neuron Synapse Density and Dendritic Spine Morphology. *Front Mol Neurosci.* 2020 Sep 10;13:161.
- Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, Xiao T, Schafer J, Lee ML, Schmittgen TD, Nana-Sinkam SP, Jarjoura D, Marsh CB. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One.* 2008;3(11):e3694.
- Iftikhar, H., & Carney, G. E. (2016). Evidence and potential in vivo functions for biofluid miRNAs: From expression profiling to functional testing. *BioEssays*, 38(4), 367–378.
- Issler O, Chen A. Determining the role of microRNAs in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2015 Apr;16(4):201-12.
- Jasińska M, Miłek J, Cymerman IA, Łęski S, Kaczmarek L, Dziembowska M. miR-132 Regulates Dendritic Spine Structure by Direct Targeting of Matrix Metalloproteinase 9 mRNA. *Mol Neurobiol.* 2016 Sep;53(7):4701-12.
- Kambeitz JP, Howes OD. The serotonin transporter in depression: Meta-analysis of in vivo and post mortem findings and implications for understanding and treating depression. *J Affect Disord.* 2015 Nov 1;186:358-66.
- Karr J, Vagin V, Chen K, Ganesan S, Olenkina O, Gvozdev V, Featherstone DE. Regulation of glutamate receptor subunit availability by microRNAs. *J Cell Biol.* 2009 May 18;185(4):685-97.
- Kichukova TM, Popov NT, Ivanov HY, Vachev TI. Circulating microRNAs as a Novel Class of Potential Diagnostic Biomarkers in Neuropsychiatric Disorders. *Folia Med (Plovdiv).* 2015 Jul-Dec;57(3-4):159-72.
- Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci.* 2010 Oct;101(10):2087-92.
- Kroon JS, Wohlfarth TD, Dieleman J, Sutterland AL, Storosum JG, Denys D, de Haan L, Sturkenboom MC. Incidence rates and risk factors of bipolar disorder in the general population: a population-based cohort study. *Bipolar Disord.* 2013 May;15(3):306-13.
- Kumar S, Reddy PH. Are circulating microRNAs peripheral biomarkers for Alzheimer's disease? *Biochim Biophys Acta.* 2016 Sep;1862(9):1617-27.

- Laulagnier K, Javalet C, Hemming FJ, Chivet M, Lachenal G, Blot B, Chatellard C, Sadoul R. Amyloid precursor protein products concentrate in a subset of exosomes specifically endocytosed by neurons. *Cell Mol Life Sci*. 2018 Feb;75(4):757-773.
- Lee I, Ajay SS, Yook JI, Kim HS, Hong SH, Kim NH, Dhanasekaran SM, Chinnaiyan AM, Athey BD. New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome Res*. 2009 Jul;19(7):1175-83.
- Lee SC, DelPozo-Banos M, Lloyd K, Jones I, Walters JTR, Owen MJ, O'Donovan M, John A. Area deprivation, urbanicity, severe mental illness and social drift - A population-based linkage study using routinely collected primary and secondary care data. *Schizophr Res*. 2020 Jun;220:130-140.
- Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR, Kim VN. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J*. 2006 Feb 8;25(3):522-32.
- Lemaire M, Hernandez N, Martineau J, El-Hage W. P-173 - Decreased emotional reactivity to positive valence in normothymic bipolar patients. *European Psychiatry*. 2012;27(1):0924-9338.
- Li LX, Li YJ, He JX. Long noncoding RNA PAGBC contributes to nitric oxide (NO) production by sponging miR-511 in airway hyperresponsiveness upon intubation. *J Cell Biochem*. 2019 Feb;120(2):2058-2069.
- Li YY, Cui JG, Dua P, Pogue AI, Bhattacharjee S, Lukiw WJ. Differential expression of miRNA-146a-regulated inflammatory genes in human primary neural, astroglial and microglial cells. *Neurosci Lett*. 2011 Jul 20;499(2):109-13.
- Li, L., Wang, J. Roles of extracellular microRNAs in central nervous system. *ExRNA*. 2019 Mar 19;1(13).
- Lieberman DZ, Massey SH, Goodwin FK. The role of gender in single vs married individuals with bipolar disorder. *Compr Psychiatry*. 2010 Jul-Aug;51(4):380-5.
- Ludwig N, Leidinger P, Becker K, Backes C, Fehlmann T, Pallasch C, Rheinheimer S, Meder B, Stähler C, Meese E, Keller A. Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucleic Acids Res*. 2016 May 5;44(8):3865-77.
- Lyberaki A, Tinios P, Georgiadis T. Multidimensional Poverty in Greece: A Deep Persistent, Gray. *South-Eastern Journal of Economics* 2010 1:87-110.
- Macfarlane LA, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics*. 2010 Nov;11(7):537-61.

- Maheu M, Lopez JP, Crapper L, Davoli MA, Turecki G, Mechawar N. MicroRNA regulation of central glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) signalling in depression. *Transl Psychiatry*. 2015 Feb 17;5(2):e511.
- Martins HC, Schratt G. MicroRNA-dependent control of neuroplasticity in affective disorders. *Transl Psychiatry*. 2021 May 3;11(1):263.
- Maurel OM, Torrisi SA, Barbagallo C, Purrello M, Salomone S, Drago F, Ragusa M, Leggio GM. Dysregulation of miR-15a-5p, miR-497a-5p and miR-511-5p Is Associated with Modulation of BDNF and FKBP5 in Brain Areas of PTSD-Related Susceptible and Resilient Mice. *Int J Mol Sci*. 2021 May 13;22(10):5157.
- M'bailara K, Demotes-Mainard J, Swendsen J, Mathieu F, Leboyer M, Henry C. Emotional hyper-reactivity in normothymic bipolar patients. *Bipolar Disord*. 2009 Feb;11(1):63-9.
- Medley JC, Panzade G, Zinovyeva AY. microRNA strand selection: Unwinding the rules. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2021 May;12(3):e1627.
- Menke A, Binder EB. Epigenetic alterations in depression and antidepressant treatment. *Dialogues Clin Neurosci*. 2014 Sep;16(3):395-404.
- Michell DL, Vickers KC. Lipoprotein carriers of microRNAs. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Dec;1861(12 Pt B):2069-2074.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Brian KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 29;105(30):10513-8.
- Morrison KE, Narasimhan S, Fein E, Bale TL. Peripubertal Stress With Social Support Promotes Resilience in the Face of Aging. *Endocrinology*. 2016 May;157(5):2002-14.
- Moya PR, Wendland JR, Saleme J, Fried RL, Murphy DL. miR-15a and miR-16 regulate serotonin transporter expression in human placental and rat brain raphe cells. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013 Apr;16(3):621-9.
- Muqbil I, Bao B, Abou-Samra AB, Mohammad RM, Azmi AS. Nuclear export mediated regulation of microRNAs: potential target for drug intervention. *Curr Drug Targets*. 2013 Sep;14(10):1094-100.
- Murphy CP, Singewald N. Role of MicroRNAs in Anxiety and Anxiety-Related Disorders. *Curr Top Behav Neurosci*. 2019;42:185-219.

- Nguyen TPN, Kumar M, Fedele E, Bonanno G, Bonifacino T. MicroRNA Alteration, Application as Biomarkers, and Therapeutic Approaches in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*. 2022 Apr 25;23(9):4718.
- Noferesti SS, Sohel MM, Hoelker M, Salilew-Wondim D, Tholen E, Looft C, Rings F, Neuheoff C, Schellander K, Tesfaye D. Controlled ovarian hyperstimulation induced changes in the expression of circulatory miRNA in bovine follicular fluid and blood plasma. *J Ovarian Res*. 2015 Dec 9;8:81.
- O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018 Aug 3;9:402.
- Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*. 2007 Jul 13;130(1):89-100. Ortega MA, Alvarez-Mon MA, García-Montero C, Fraile-Martinez O, Lahera G, Monserrat J, Muñoz-Merida L, Mora F, Rodríguez-Jiménez R, Fernandez-Rajo S, Quintero J, Álvarez-Mon M. MicroRNAs as Critical Biomarkers of Major Depressive Disorder: A Comprehensive Perspective. *Biomedicines*. 2021 Nov 10;9(11):1659.
- Pal D., Ghatak S., Sen C.K. MicroRNA in Regenerative Medicine: Epigenetic Modification of MicroRNAs. 2015;3:77-109.
- Park CK, Xu ZZ, Berta T, Han Q, Chen G, Liu XJ, Ji RR. Extracellular microRNAs activate nociceptor neurons to elicit pain via TLR7 and TRPA1. *Neuron*. 2014 Apr 2;82(1):47-54.
- Pegtél DM, Peferoen L, Amor S. Extracellular vesicles as modulators of cell-to-cell communication in the healthy and diseased brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014 Sep 26;369(1652):20130516.
- Peter ME. Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: the next step. *Oncogene*. 2010 Apr 15;29(15):2161-4.
- Petersen NA, Nielsen MØ, Coello K, Stanislaus S, Melbye S, Kjærstad HL, Sletved KSO, McIntyre RS, Frikke-Smith R, Vinberg M, Kessing LV. Brain-derived neurotrophic factor levels in newly diagnosed patients with bipolar disorder, their unaffected first-degree relatives and healthy controls. *BJPsych Open*. 2021 Feb 16;7(2):e55.
- Pierouli K, Papageorgiou L, Mitsis T, Papakonstantinou E, Diakou I, Leptidis S, Sigala M, Dragoumani K, Spandidos DA, Bacopoulou F, Chrousos GP, Goulielmos GN, Eliopoulos E, Vlachakis D. Role of microRNAs and long non-coding RNAs in glucocorticoid signaling (Review). *Int J Mol Med*. 2022 Dec;50(6):147.

- Qian Y, Song J, Ouyang Y, Han Q, Chen W, Zhao X, Xie Y, Chen Y, Yuan W, Fan C. Advances in Roles of miR-132 in the Nervous System. *Front Pharmacol*. 2017 Oct 25;8:770.
- Qurashi A, Chang S, Peng J. Role of microRNA pathway in mental retardation. *ScientificWorldJournal*. 2007 Nov 2;7:146-54.
- Rago L, Beattie R, Taylor V, Winter J. miR379-410 cluster miRNAs regulate neurogenesis and neuronal migration by fine-tuning N-cadherin. *EMBO J*. 2014 Apr 16;33(8):906-20.
- Raimo S, Santangelo G, Trojano L. The emotional disorders associated with multiple sclerosis. *Handb Clin Neurol*. 2021;183:197-220.
- Rani A, O'Shea A, Ianov L, Cohen RA, Woods AJ, Foster TC. miRNA in Circulating Microvesicles as Biomarkers for Age-Related Cognitive Decline. *Front Aging Neurosci*. 2017 Oct 4;9:323.
- Rao P, Benito E, Fischer A. MicroRNAs as biomarkers for CNS disease. *Front Mol Neurosci*. 2013 Nov 26;6:39.
- Roberts TC. The MicroRNA Biology of the Mammalian Nucleus. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2014 Aug 19;3(8):e188.
- Rowland TA, Marwaha S. Epidemiology and risk factors for bipolar disorder. *Ther Adv Psychopharmacol*. 2018 Apr 26;8(9):251-269.
- Ruby, J.G., Jan, C., and Bartel, D.P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 448, 83–86.
- Schaefer A, O'Carroll D, Tan CL, Hillman D, Sugimori M, Llinas R, Greengard P. Cerebellar neurodegeneration in the absence of microRNAs. *J Exp Med*. 2007 Jul 9;204(7):1553-8.
- Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA, Kane CG, Sabatini ME, Kiebler M, Greenberg ME. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature*. 2006 Jan 19;439(7074):283-9.
- Segerstrom SC, Miller GE. Psychological stress and the human immune system: A meta-analytic study of 30 years of inquiry. *Psychol Bull* [Internet]. 2004 Jul [cited 2022 Jun 7];130(4):601–30.
- Sharrouf KA, Suchkova IO. The influence of lactoferrin on the epigenetic characteristics of mammalian cells of different types. *Medical academic journal*. 2021;21(1):85-95.
- Shi J. Regulatory networks between neurotrophins and miRNAs in brain diseases and cancers. *Acta Pharmacol Sin*. 2015 Feb;36(2):149-57.
- Shu Z, Tan J, Miao Y, Zhang Q. The role of microvesicles containing microRNAs in vascular endothelial dysfunction. *J Cell Mol Med*. 2019 Dec;23(12):7933-7945.

- Sletved KSO, Coello K, Stanislaus S, Kjærstad HL, Melbye SA, Faurholt-Jepsen M, Miskowiak K, Vinberg M, Kessing LV. Socio-economic status and functioning in patients newly diagnosed with bipolar disorder and their unaffected siblings - Results from a cross-sectional clinical study. *J Affect Disord*. 2022 Aug 1;310:404-411.
- Sohel MH. Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges. *Achievements in the Life Sciences*. 2016;10(2):175-186.
- Song MF, Dong JZ, Wang YW, He J, Ju X, Zhang L, Zhang YH, Shi JF, Lv YY. CSF miR-16 is decreased in major depression patients and its neutralization in rats induces depression-like behaviors via a serotonin transmitter system. *J Affect Disord*. 2015 Jun 1;178:25-31.
- Spiliotaki M, Salpeas V, Malitas P, Alevizos V, Moutsatsou P. Altered glucocorticoid receptor signaling cascade in lymphocytes of bipolar disorder patients. *Psychoneuroendocrinology*. 2006 Jul;31(6):748-60.
- Sulser F. The role of CREB and other transcription factors in the pharmacotherapy and etiology of depression. *Ann Med*. 2002;34(5):348-56.
- Sun XH, Song MF, Song HD, Wang YW, Luo MJ, Yin LM. miR-155 mediates inflammatory injury of hippocampal neuronal cells via the activation of microglia. *Mol Med Rep*. 2019 Apr;19(4):2627-2635.
- Swathy B, Banerjee M. Understanding Pharmaco-Epigenomic Response of Antipsychotic Drugs Using Genome-Wide MicroRNA Expression Profile in Liver Cell Line. *Front Mol Neurosci*. 2022 Mar 22;15:786632.
- Tafet GE, Nemeroff CB. The Links Between Stress and Depression: Psychoneuroendocrinological, Genetic, and Environmental Interactions. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2016 Spring;28(2):77-88.
- Tenenbaum L, Humbert-Claude M. Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Gene Delivery in Parkinson's Disease: A Delicate Balance between Neuroprotection, Trophic Effects, and Unwanted Compensatory Mechanisms. *Front Neuroanat*. 2017 Apr 10;11:29.
- Terracciano A, Chiurazzi P, Neri G. Fragile X syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2005 Aug 15;137C(1):32-7.
- Tserel L, Runnel T, Kisand K, Pihlap M, Bakhoff L, Kolde R, Peterson H, Vilo J, Peterson P, Rebane A. MicroRNA expression profiles of human blood monocyte-derived dendritic cells and macrophages reveal miR-511 as putative positive regulator of Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*. 2011 Jul 29;286(30):26487-95.

- Tsuchiya KJ, Byrne M, Mortensen PB. Risk factors in relation to an emergence of bipolar disorder: a systematic review. *Bipolar Disord*. 2003 Aug;5(4):231-42.
- Turchinovich A, Weiz L, Langhein A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res*. 2011 Sep 1;39(16):7223-33.
- Uchida S, Hara K, Kobayashi A, Funato H, Hobara T, Otsuki K, Yamagata H, McEwen BS, Watanabe Y. Early life stress enhances behavioral vulnerability to stress through the activation of REST4-mediated gene transcription in the medial prefrontal cortex of rodents. *J Neurosci*. 2010 Nov 10;30(45):15007-18.
- Umeoka EHL, van Leeuwen JMC, Vinkers CH, Joëls M. The Role of Stress in Bipolar Disorder. *Curr Top Behav Neurosci*. 2021;48:21-39.
- Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007 Jun;9(6):654-9. van den Berg MMJ, Krauskopf J, Ramaekers JG, Kleinjans JCS, Prickaerts J, Briedé JJ. Circulating microRNAs as potential biomarkers for psychiatric and neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol*. 2020 Feb;185:101732.
- van den Berg MMJ, Krauskopf J, Ramaekers JG, Kleinjans JCS, Prickaerts J, Briedé JJ. Circulating microRNAs as potential biomarkers for psychiatric and neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol*. 2020 Feb;185:101732.
- Veremeyko T, Kuznetsova IS, Dukhinova M, W Y Yung A, Kopeikina E, Barteneva NS, Ponomarev ED. Neuronal extracellular microRNAs miR-124 and miR-9 mediate cell-cell communication between neurons and microglia. *J Neurosci Res*. 2019.
- Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*. 2011 Apr;13(4):423-33.
- Vo N, Klein ME, Varlamova O, Keller DM, Yamamoto T, Goodman RH, Impey S. A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Nov 8;102(45):16426-31.
- von Brandenstein M, Bernhart SH, Pansky A, Richter C, Kohl T, Deckert M, Heidenreich A, Stadler PF, Montesinos-Rongen M, Fries JWU. Beyond the 3'UTR binding-microRNA-induced protein truncation via DNA binding. *Oncotarget*. 2018 Aug 28;9(67):32855-32867.
- Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Nov;1803(11):1231-43.

- Wan Y, Liu Y, Wang X, Wu J, Liu K, Zhou J, Liu L, Zhang C. Identification of differential microRNAs in cerebrospinal fluid and serum of patients with major depressive disorder. *PLoS One*. 2015 Mar 12;10(3):e0121975.
- Wang D, Li H, Du X, Zhou J, Yuan L, Ren H, Yang X, Zhang G, Chen X. Circulating Brain-Derived Neurotrophic Factor, Antioxidant Enzymes Activities, and Mitochondrial DNA in Bipolar Disorder: An Exploratory Report. *Front Psychiatry*. 2020 Sep 11;11:514658.
- Wang H, He Y, Sun Z, Ren S, Liu M, Wang G, Yang J. Microglia in depression: an overview of microglia in the pathogenesis and treatment of depression. *J Neuroinflammation*. 2022 Jun 6;19(1):132.
- Weber B, Stresemann C, Brueckner B, Lyko F. Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle*. 2007 May 2;6(9):1001-5.
- Weinberger AH, Kashan RS, Shpigel DM, Esan H, Taha F, Lee CJ, Funk AP, Goodwin RD. Depression and cigarette smoking behavior: A critical review of population-based studies. *Am J Drug Alcohol Abuse*. 2017 Jul;43(4):416-431.
- Wilczynska A, Bushell M. The complexity of miRNA-mediated repression. *Cell Death Differ*. 2015 Jan;22(1):22-33.
- Wium-Andersen MK, Ørsted DD, Nordestgaard BG. Elevated C-reactive protein and late-onset bipolar disorder in 78 809 individuals from the general population. *Br J Psychiatry*. 2016 Feb;208(2):138-45.
- World Health Organization. 2022.
- Xu J, Wang R, Liu Y, Wang W, Liu D, Jiang H, Pan F. Short- and long-term alterations of FKBP5-GR and specific microRNAs in the prefrontal cortex and hippocampus of male rats induced by adolescent stress contribute to depression susceptibility. *Psychoneuroendocrinology*. 2019 Mar;101:204-215.
- Xu M, Ji J, Jin D, Wu Y, Wu T, Lin R, Zhu S, Jiang F, Ji Y, Bao B, Li M, Xu W, Xiao M. The biogenesis and secretion of exosomes and multivesicular bodies (MVBs): Intercellular shuttles and implications in human diseases. *Genes Dis*. 2022 Apr 22;10(5):1894-1907.
- Xu YY, Xia QH, Xia QR, Zhang XL, Liang J. MicroRNA-Based Biomarkers in the Diagnosis and Monitoring of Therapeutic Response in Patients with Depression. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2019 Dec 27;15:3583-3597.
- Yan L, Liang M, Hou X, Zhang Y, Zhang H, Guo Z, Jinyu J, Feng Z, Mei Z. The role of microRNA-16 in the pathogenesis of autoimmune diseases: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother*. 2019 Apr;112:108583.

- Yang T, Nie Z, Shu H, Kuang Y, Chen X, Cheng J, Yu S, Liu H. The Role of BDNF on Neural Plasticity in Depression. *Front Cell Neurosci*. 2020 Apr 15;14:82.
- Yang Y, Hu Z, Du X, Davies H, Huo X, Fang M. miR-16 and Fluoxetine Both Reverse Autophagic and Apoptotic Change in Chronic Unpredictable Mild Stress Model Rats. *Front Neurosci*. 2017 Jul 25;11:428.
- Ying SY, Chang DC, Lin SL. The microRNA (miRNA): overview of the RNA genes that modulate gene function. *Mol Biotechnol*. 2008 Mar;38(3):257-68.
- Yoshino Y, Roy B, Dwivedi Y. Differential and unique patterns of synaptic miRNA expression in dorsolateral prefrontal cortex of depressed subjects. *Neuropsychopharmacology*. 2021 Apr;46(5):900-910.
- Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, Hristov M, Köppel T, Jahantigh MN, Lutgens E, Wang S, Olson EN, Schober A, Weber C. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal*. 2009 Dec 8;2(100):ra81.
- Zhang HP, Liu XL, Chen JJ, Cheng K, Bai SJ, Zheng P, Zhou CJ, Wang W, Wang HY, Zhong LM, Xie P. Circulating microRNA 134 sheds light on the diagnosis of major depressive disorder. *Transl Psychiatry*. 2020 Mar 16;10(1):95.
- Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, Mi S. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015 Feb;13(1):17-24.
- Zhao C, Sun X, Li L. Biogenesis and function of extracellular miRNAs. *ExRNA*. 2019 Apr 26;1:38.
- Zhao Z, Zlokovic BV. Remote control of BBB: A tale of exosomes and microRNA. *Cell Res*. 2017 Jul;27(7):849-850.
- Zheng D, Sabbagh JJ, Blair LJ, Darling AL, Wen X, Dickey CA. MicroRNA-511 Binds to FKBP5 mRNA, Which Encodes a Chaperone Protein, and Regulates Neuronal Differentiation. *J Biol Chem*. 2016 Aug 19;291(34):17897-906.
- Zhou L, Zhu Y, Chen W, Tang Y. Emerging role of microRNAs in major depressive disorder and its implication on diagnosis and therapeutic response. *J Affect Disord*. 2021 May 1;286:80-86.
- Zhou Y, Lu M, Du RH, Qiao C, Jiang CY, Zhang KZ, Ding JH, Hu G. MicroRNA-7 targets Nod-like receptor protein 3 inflammasome to modulate neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Mol Neurodegener*. 2016 Apr 16;11:28.

- Zurawek D, Kusmider M, Faron-Gorecka A, Gruca P, Pabian P, Kolasa M, Solich J, Szafran-Pilch K, Papp M, Dziedzicka-Wasylewska M. Time-dependent miR-16 serum fluctuations together with reciprocal changes in the expression level of miR-16 in mesocortical circuit contribute to stress resilient phenotype in chronic mild stress - An animal model of depression. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2016 Jan;26(1):23-36.
- Żurawek D, Turecki G. The miRNome of Depression. *Int J Mol Sci*. 2021 Oct 20;22(21):11312.
- Τσόπελας Χ, Κωνσταντινίδου Δ, Δουζένης Α. Αυτοσυμπληρούμενα ερωτηματολόγια διερεύνησης της διπολικότητας. *Ψυχιατρική*. 2010;21:226-239.