

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ
ΒΑΣΔΕΚΗ ΣΤΕΡΓΙΟΥ D.R.C.O.E.
ΦΟΙΤΗΤΟΥ**

«Micro RNA and Athletic performances»

«Micro RNA και Αθλητικές επιδόσεις»

ΛΑΡΙΣΑ 2013

Στο γονιδίωμα του ανθρώπου υπάρχουν γονίδια τα οποία δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες.

Μία σημαντική κατηγορία τέτοιων γονιδίων είναι τα γονίδια των μικροRNA (MicroRNA, miRNA) που υπολογίζεται ότι αριθμούν τουλάχιστον 250 μέλη στο γονιδίωμα του ανθρώπου. Τα MicroRNA αποτελούνται από μικρές αλληλουχίες RNA που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες μήκους 22 νουκλεοτιδίων και κάποια από αυτά ελέγχουν την έκφραση ή την καταστολή άλλων γονιδίων κατά την ανάπτυξη. Τα microRNAs μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II είναι μονόκλωνα και κόβονται από την AGO1 πρωτεΐνη που έχει λειτουργία RNAσης.

Αλλαγές miRNAs με φυσικές δραστηριότητες. Η έρευνα για MiRNAs σχετιζόμενα με μυϊκή δραστηριότητα έδειξε ότι σε ποντίκια με έντονη κινητική δραστηριότητα η ανάλυση έδειξε ένα miRNA το (miRNA-21) παρουσίασε μεγάλη αύξηση ενώ τρία άλλα mRNAs (miRNA – 696, miRNA-709 και miRNA-720) παρουσίασαν μειωμένες τιμές σε σχέση με ποντίκια.

Οι ερευνητικές παρατηρήσεις έδειξαν ότι το miRNA-696 είναι ένα microRNA που υπερεκφράζεται με τη φυσική δραστηριότητα. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφέρουμε κάποια «λεχθέντα» από την αρχαιότητα ακόμη, για τα αγαθά αποτελέσματα της φυσικής δραστηριότητας, π.χ. ο Marcus Tullius Cicero που έζησε 65 π.Χ. είπε «είναι η άσκηση και μόνο αυτή που υποστηρίζει την πνευματική διαύγεια και διατηρεί το σώμα σθεναρό».

Πρόσφατες έρευνες (Kirk Peterson, Curlo Croce, 2006 nature medicine) έδειξαν ότι τα microRNAs εμπλέκονται στις βασικές λειτουργίες των κυττάρων και στην ογκογένεση. Υπάρχει έρευνα ότι το microRNA-133 παίζει κριτικό ρόλο στον καθορισμό

της καρδιομυϊκής υπερτροφίας συνεχώς και στην αθλητική άσκηση. Παρατηρήθηκε ελάττωση της έκφρασης αμφοτέρων των microRNA-133 και microRNA-1 σε ποντίκια αλλά και σε ανθρώπους με καρδιακή υπετροφία.

Επίσης εάν ελαττώσουμε εξωγενώς το microRNA-133 θα έχουμε ως αποτέλεσμα καρδιακή υπετροφία. Τα υπάρχοντα στοιχεία έδειξαν ότι το MicroRNA-133 και πιθανώς το microRNA-1 έχουν «ρόλο-κλειδί» στην καρδιακή υπετροφία, γεγονός που δίδει μια νέα θεραπεία ήτοι την θεραπευτική χορήγηση των ανωτέρω στην αναφερθείσα καρδιακή νόσο. Σε έρευνα των (Fernades, Magahaes, Phillips 2010) εδείχθη ο σημαντικός ρόλος των microRNAs-16, -21 και 126 στην επαναδημιουργία αγγείων σε καρδιαγγειακή νόσο.

Εδείχθη επίσης από τους (Fernades, Modeiro, Phillips, **Medski Spas Exerc:** 2012 Feb. 9) ότι η Αθλητική Κολύμβηση σε ποντικούς, αυξάνει το καρδιακό MicroRNA-126 και την Αγγειογέννηση.

Μελέτες που διεξήχθησαν σε αθλητές άνδρες και περιλάμβαναν βιοψία μυών για ανάλυση της έκφρασης γονιδίων έδειξαν ότι τα αθλούμενα υποκείμενα βελτίωσαν την έκφραση κάποιων γονιδίων των, μέσω της μετοχονδρικής λειτουργίας των, και μέσω αύξησης microRNAs. Η Άσκηση μετέβαλε το επίπεδο έκφρασης 34 microRNAs πολλά εκ των οποίων έχουν ρόλο σε φλεγμονώδεις διαδικασίες. Η έρευνα αυτή υποστηρίζει ότι η άσκηση επιδρά μέσω των microRNAs στην διαφοροποίηση των λευκών αιμοσφαιρίων.

υπάρχουν αυξημένες ενδείξεις ότι το microRNA εμπλέκεται σε αλλαγές γονιδίων υπευθύνων για την παραγωγή ουδετερόφιλων λευκών αιμοσφαιρίων. Η άσκηση οδηγεί σε μια

ταχεία μεταβολή της γονιδιακής έκφρασης των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων λευκών αιμοσφαιρίων. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι microRNAs παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική λειτουργία και συχνά δρουν προς εξασθένηση ή αποσιώπηση της γονιδιακής μεταγραφής. Ανάλυση *in silico* έδειξε ότι συλλογικά 36 microRNAs στοχοποιούν 4.724 γονίδια. Περαιτέρω μελετώντας τις αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης γονιδίων υπεθύνων για τα ουδετερόφιλα, οι οποίες αλλαγές έγιναν μετά από αθλητική άσκηση όπως ήδη αναφέρθηκε αναγνωρίσαμε τρία μονοπάτια.

Πρώτο μονοπάτι Προτεόλυσης μέσω Ουβικουΐτινης.

Δεύτερο μονοπάτι Jak-STAT και

Τρίτο σημαντικό μονοπάτι Hedgehog στο οποίο η επίδραση του microRNA στην γονιδιακή έκφραση ήταν ευλογοφανής. Καθένας από τα τρία αυτά μονοπάτια είναι γνωστό ότι παίζει ρόλο-κλειδί στους μηχανισμούς πρόκλησης οποιασδήποτε φλεγμονής ελαφρά άσκησης μεταβάλλει το Profile του microRNA στα κυκλοφορούντα ουδετερόφιλα λευκά αιμοσφαίρια στους ανθρώπους.

Τα ανωτέρω στοιχεία υποστηρίζουν την υπόθεση ότι αλλαγές σχετιζόμενες με την αθλητική άσκηση επηρεάζουν την έκφραση microRNA των ουδετερόφιλων λευκών αιμοσφαιρίων και παίζουν ρόλο στη γονιδιακή έκφραση των ουδετερόφιλων λευκών αιμοσφαιρίων ως αντίδραση στην αθλητική δραστηριότητα όχι μόνο διεγείρει την γονιδιακή έκφραση των ουδετερόφιλων λευκών αιμοσφαιρίων, ειδικότερα δε των microRNAs τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετάφραση των απαραίτητων πρωτεϊνών και τελικά στην κυτταρική λειτουργία.

Ένας αυξανόμενος αριθμός ερευνών τόσο σε ποντίκια όσο και σε ανθρώπους έδειξε καταφανώς τον ρυθμιστικό ρόλο - κλειδί των microRNAs για τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα

των λευκών αιμοσφαιρίων. Για παράδειγμα το microRNA-223 έδειξε να επηρεάζει την πολυμορφοπύρηνη ανάπτυξη σε ανθρώπους. Επίσης ο Johnnidis και συνεργάτες βρήκαν εξεσηλασμένη ουδετεροφιλία και ανώμαλη πυρηνική μορφολογία σε microRNA-223 εξαρτούμενους ποντικούς.

Η έρευνα των P. Fulassetti, DM Cooper in (J appl Physio 27 January 2010) έδειξε πως η αθλητική άσκηση οδηγεί σε αλλαγές της έκφρασης των microRNA-526 και microRNA-458 και δράσει αυτών επί των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων των λευκών αιμοσφαιρίων.

Τοιουτοτρόπως εξέφρασαν την άποψη ότι η αθλητική άσκηση μεταβάλλει τα MicroRNAs των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων εις τους ανθρώπους.

Υπάρχει ένας κατάλογος MicroRNAs των γονιδίων που επηρεάζονται και του μονοπατιού δράσης από τους ανωτέρω ερευνητές και εδώ θα αναφέρουμε κάποια από αυτά: microRNA-124 36 γονίδια, ANKRD12, HBP1, PTEN, TRIM37, AHNK, PUSP2 κ.α. και μονοπάτι δράσης αυτό της Ουβικοϊίνης. Επίσης το microRNA-141 δρα στα γονίδια BAG5, P15RS, CFBF, MYBLR μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού Hedgehog.

Τέλος το MicroRNA-107 δρα στα γονίδια ZCCCHC2, UBE231 TUBB WDR68 και άλλα μέσω του μονοπατιού JAK-STAT signaling pathway.

Πρόσφατα υπάρχει ένας ικανός αριθμός προσεγγίσεων της επίδρασης των microRNAs με τη γονιδιακή έκφραση, την παραγωγή πρωτεϊνών και την κυτταρική λειτουργία γενικώς. Ιδιαίτερως εξέσθηκε η αλλαγή μετά αθλητική άσκηση που συμβαίνει σε microRNAs και στην γονιδιακή έκφραση.

Ένας άλλος παράγων που χρησιμοποιήθηκε είναι τα αποτελέσματα δύο ξεχωριστών ερευνών (ήτοι gene expression data και microRNA data). Αμφότερα τα πρωτόκολλα περιλαμβάνουν αεροβικές ασκήσεις (cycle ergometry). Τα δεδομένα αυτά έδειξαν ότι μεταβάλλει σε microRNAs παίζουν σημαντικό ρόλο στα αποτελέσματα της άθλησης επί των ουδετεροφίλων λευκών αιμοσφαιρίων.

Κατά την τελευταία δεκαετία εδόθη προσοχή, κάτι σαν «μόδα» στην επίδραση μιας σειράς παραγόντων ζωής (lifestyle) που συμπεριλαμβάνουν διανοητικές συναναστροφές, κοινωνική δράση προσεγγμένη διατροφή και αθλητικές δραστηριότητες γι' αυτό το τελευταίο (Αθλητικές ασκήσεις) χρησιμοποιώντας RT-PCR επαληθεύουμε τα επίπεδα αλλαγών πριν και μετά την άσκηση σε επτά miRNAs. Τα TaqMan αποτελέσματα ήταν σημαντικά για όλα $P < 0,05$.

Υπάρχει ένα μεγάλο ενδιαφέρον για τα microRNAs ως «λεπτούς ρυθμιστές» της έκφρασης των γονιδίων και της μετάφρασης πρωτεϊνών, τα ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων, και της φυσιολογίας αυτών.

Ευρέθη επίσης ότι με την τεχνική TaqMan RT-PCR επιβεβαιώθηκαν τα με την τεχνική microarray-derived miRNA data αποτελέσματα.

Τελικώς στη παρούσα εργασία ευρέθη μια αύξηση στο microRNA-223 αμέσως μετά την αθλητική άσκηση.

Η κυρίαρχη έρευνα σχετικά με τις ρυθμιστικές λειτουργίες των microRNAs συμπεριλαμβάνει συχνά *in silico* τις δυνατότητες γονιδίων – στόχων να εκφράζονται. Τα οποία υφίστανται αλλαγή ή βρέθηκε να εκφράζονται διαφορετικά εις το συγκεκριμένο πείραμα. Τελευταίως υπάρχει πληθώρα τεχνικών που χρησιμοποιούνται για

να συνδιάσουν τη ρυθμιστική λειτουργία του microRNA με την γονιδιακή έκφραση της παραγωγής πρωτεϊνών ή την κυτταρική λειτουργία.

Είναι γνωστό ότι στις κυτταρικές καλλιέργειες τα συστήματα τα οποία είναι πολύ πλούσια με ανοδικές ρυθμιστικές λειτουργίες του microRNA μπορούν να οδηγήσουν σε μία καθοδική ρυθμιστική λειτουργία της έκφρασης του γονιδίου.

Τοιουτοτρόπως ερευνήσαμε την σχέση των ειδικών αλλαγών εις το microRNA και στη γονιδιακή έκφραση ευρέθη ότι περίπου ~80% των ρυθμιζομένων microRNAs υπήρχε πράγματι μια ρύθμιση των γονιδίων στόχων των. Σήμερα γνωρίζουμε ότι τα microRNAs είναι ικανά να προκαλέσουν σίγηση της έκφρασης των γονιδίων στο κυτταρόπλασμα με μηχανισμούς που έχουν ως αποτέλεσμα την διαμεμβρανική δυσλειτουργία. Μερικοί ερευνητές πιστεύουν πως η δυσλειτουργία του mRNA επέρχεται μόνο όταν υπάρχει πλήρης συσχέτιση του microRNA και του στόχου του mRNA. Περαιτέρω έρευνα έδειξε ότι αρκετά microRNAs έχουν αναφερθεί για να δείξουν ανωμαλίες σε ασθενείς με μυοπάθεια.

Η μυοτροφική πλάγια σκλήρωσις (ALS) είναι η περισσότερο γνωστή κινητική νόσος των ενηλίκων. Τα συμπτώματα της νόσου περιλαμβάνουν ατροφία και παράλυση των ποδιών καθώς και των αναπνευστικών μυών λόγω ελλειπούς ανάπτυξης και καταστροφής των κινητικών νευρώσεων. Σήμερα δεν υπάρχει μια αποτελεσματική θεραπεία για την σκλήρυνση κατά πλάκας.

Τοιουτοτρόπως η εύρεσις των σηματοδοτούμενων οδών και των κυτταρικών διαβιβαστών της (ALS) παραμένει μια μεγίστη πρόκλησις στην έρευνα για την εύρεση μιας αποτελεσματικής θεραπείας. Υπό το φως των προσφάτων ερευνών συμμετέχουν και τα microRNAs. Ερευνούμε εάν η πρόοδος της νόσου σε

ποντίκια που πάσχουν από ALS εμφανίζονται αλλαγές στην έκφραση των microRNAs. Από τα 320 microRNA-206 είχε την περισσότερο δραματική ρυθμιστική λειτουργία. Η ρυθμιστική λειτουργία του microRNA-206 συνυπάρχει με την έναρξη των νευρολογικών συμπτωμάτων.

Επειδή η ALS οδηγεί σε απονεύρωση των σκελετικών μυών ερευνήσαμε εάν το microRNA-206 και η ρυθμιστική λειτουργία του είναι αποτέλεσμα αυτής της απονεύρωσης. Πράγματι 10 ημέρες μετά την απόκοψη του ισχιακού νεύρου σε ποντικούς τα επίπεδα του πρωϊμου και ώριμου microRNA-206 εκτοξεύτηκαν υψηλά σε τρεις μύες με ταχείας αντίδρασης μυικές ίνες. Το microRNA-206 είναι ένα εξειδικευμένο για μυς microRNA και συνδιάζεται με το microRNA-133β.

Προγενέστερη μελέτη έχουν συνδύασα την βασική πρωτεΐνη base helix-loop-helix, (BHLH) και την μυογενίνη (myogenin) στην γονιδιακή έκφραση της απονευρωτικής εξάρτησης.

Τρεις εξελικτικά E-boxes που εμπλέκονται για την MyoD και την myogenin τοποθετούνται μεταξύ -910 και -765 ζεύγη βάσεων (βρ) ανοδικά από την έναρξη του υποκινητή (pre-microRNA-206). Σε κυτταρικές καλλιέργειες η MyoD ελέγχεται από τις προαναφερθείσες περιοχές. Τα επίπεδα του microRNA-206 στην ALS μπορεί να είναι μια αβλαβής σύμπτωση ή συνεργάτης στην παθολογία. Για να διευκρινίσουμε αυτές τις πιθανότητες εργασθήκαμε στοχεύοντας τμήματα στα οποία η έκφρασις του microRNA-133β. Ποντίκια που ήταν ομόζυγα του microRNA-206 δεν έδειξαν εμφανείς ανωμαλίες σχετικά με το βάρος τους, την συμπεριφορά τους και την αρχιτεκτονική δομή των μυϊκών ινών στους σκελετικούς μύες, σε αντίθεση με την έκφραση των microRNA-133β και microRNA-1.

Η έλλειψις του microRNA-206 δεν επηρέασε την έναρξη της νόσου, αλλά όντως επιτάχυνε την εξέλιξη αυτής και εξαφάνισε την επιβίωση. Η επιδείνωση των συμπτωμάτων της νόσου στο microRNA-206 στα ποντίκια συνοδευόμενο από προϊούσα ατροφία των σκελετικών μυών που οδηγούσε σε κώφωση, παράλυση και τελικά θάνατο. Πώς όμως το microRNA-206 δρα στην βοήθεια της επιβίωσης στο ALS; Στη περίπτωση η παθολογία της νευρομυϊκής σύναψης έχει ρόλο- κλειδί στο ALS, ενώ το microRNA-206 εκφράζεται αποκλειστικά στους μύες υποστηρίχθηκε πως το microRNA επηρεάζει την νευρο-μυϊκή αλληλεπίδραση. Αληθώς ένα μετάγραφο που απομονώθηκε από την micro RNA-206/133β περιοχή αρχικώς αναγνωρίσθηκε ως συνδεόμενο με την σύναψη μη κωδικό στοιχείο και ονομάσθηκε 7H4 και φάνηκε να έχει σχέση με κωδικά στοιχεία του μετασυναπτικού μηχανισμού. Παρ' ότι η αναφερόμενη 7H4 ακολουθία δεν συμπεριλάμβανε το microRNA-206 η αντιστροφή PCR (RT-PCR) έδειξε ότι πράγματι micro RNA-206 ακολουθίες συμπεριλαμβάνονταν στο μετάγραφο του συναπτικού μηχανισμού. Αυτή η έκφρασις μας οδήγησε να συγκεντρώσουμε την προσοχή μας στην νευρομυϊκή ένωση. (NMJ)

Εξετάζουμε την νευρομυϊκή ένωση σε νεογέννητη και ώριμα ποντίκια και βρήκαμε ότι προφανώς το microRNA-206 επιδρούσε στο σχηματισμό νέων (NMJs) μετά από βλάβη του νευρώνα η οποία απονεύρωνε τους μύες. Τρεις εβδομάδες μετά την λειτουργική αποκέντρωση παρουσιάσθηκε μυϊκή ατροφία και παρατηρήθηκε πως η επανεύρωση των ήδη απονευρωμένων μυών καθυστέρησε όταν απουσίαζε το microRNA-206. Μετά την επανεύρωση οι αναγεννημένοι νευράξονες προτίμησαν τις αρχικές συνοπτικές τους θέσεις.

Κατά την διάρκεια της επανεύρωσης παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων microRNA-206 αποτελεί τοπική σηματοδότηση των μυών που επάγει την αναγέννηση των νευραξόνων. Η έκφραση του microRNA-206 είναι υψηλή και πλούσια σε αργούς μύες οι οποίες παρουσιάζουν αντίσταση στην απονεύρωση σε ποντίκια με ALS.

Πιθανώς το microRNA-206 και η σηματοδότηση αυτού βοηθούν στην προστασία των αργών μυϊκών ινών. Σήμερα πιστεύετε ότι το microRNA-206 παίζει ρόλο τροποποιητή στην παθογένεια του ALS και μας δίνει νέες δυνατότητες στην κατανόηση των μηχανισμών αυτής της νόσου και υποστηρίζει ευκαιρίες επανεύρωσης μέσω microRNA-206 που θα αποτελεί και την θεραπεία της ALS.

Κατά την αθλητική άσκηση συχνά έχουμε τραυματισμούς είτε σε ατομικά αγωνίσματα, π.χ. στίβος, ιππασία, κολύμβηση είτε σε ομαδικούς αγώνες, ποδόσφαιρο, Μπάσκετ, κλπ.

Σε τέτοιου είδους αγωνίσματα πολλάκις έχουμε τραυματικές βλάβες του νωτιαίου μυελού, στις περιπτώσεις αυτές παρατηρείται αλλαγή της έκφρασης του microRNA ως επακόλουθο κάποιας τραυματικής βλάβης του νωτιαίου μυαλού.

Υπάρχουν δύο μηχανισμοί καταστροφής μετά οξεία βλάβη, του νωτιαίου μυελού: μία αρχική μηχανική βλάβη, και μία δευτερογενής βλάβη ήτις προάγεται από πολλαπλές βιολογικές ακολουθίες συμπεριλαμβανομένης της εκτεταμένης αλλαγής της γονιδιακής έκφρασης. Μεταβολή της έκφρασης σε πολλά γονίδια φαίνεται να παίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της δευτεροπαθούς βλάβης σε τραυματισμό του νωτιαίου μυελού (Bareyert and Shwab 2003, Di Giovanni et al 2003, Nestic et al 2004)

Αρκετές έρευνες γίνονται στο ρυθμιστικό αυτό δίκτυο και έχει πλέον καθιερωθεί μια τοιαύτη αλλαγή της έκφρασης των γονιδίων. Εντός αυτού του πεδίου τα microRNAs είναι πολύ ελκυστικά στους υποψήφιους ερευνητές διότι τα microRNAs δύνανται μετα-μεταγραφικά να ρυθμίζουν ολόκληρο το set των γονιδίων (clan et al 2005, Limet al 2005).

Τα microRNAs είναι ενδογενή μη-κωδικά ~2 nt RNA μόρια τα οποία έχουν ανακαλυφθεί προσφάτως ως θεμελιώδεις και μετα-μεταγραφικοί ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης (Kosic, 2006, Krichevsky 2007). Πρόσφατες έρευνες υποστηρίζουν πως τουλάχιστον το 20-30% των ανθρωπίνων γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ρυθμίζεται από microRNAs (Krichevsky 2007). Ένας ικανός αριθμός από microRNAs βρέθηκε στο Κ.Ν.Σ. των θηλαστικών συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου και του νευρικών κυττάρων και φαίνεται να είναι σημαντικοί ρυθμιστές της πλαστικότητας αυτών (Baket et al 2008 Miska et al 2009).

Μετικά microRNAs φαίνεται ότι εμπλέκονται σε σοβαρές νευρολογικές ασθένειες όπως το σύνδρομο Tourette και το εύθραυστο Χ σύνδρομο (Kosik 2006).

Πρόσφατα σοβαρές μελέτες υποστηρίζουν την πιθανότητα το microRNA να εμπλέκται σε απονευρώσεις (Rihen et al 2006, Kim et al 2007, Shaefer et al 2007).

Σήμερα δεν υπάρχουν περαιτέρω έρευνες σχετικά με την έκφραση των microRNAs μετά τραυματική βλάβη των Νωτιαίων μυελών. Στην παρούσα εργασία εξετάζεται η προσωρινή έκφρασις των microRNAs σε νωτιαίο μυελό μετά την πρόκληση βλάβης αυτού σε ενήλικους αρουραίους.

Τα δικά μας ευρήματα παρουσιάζουν αρχικά μια αλλαγή μετά από πρόκληση βλάβης στο νωτιαίο μυελό. Εξετάζουμε την

έκφραση από 350 *Rattus norvegicus*-microRNAs. Με βάση το σηματοδοτικό πάχος της έκφρασης του microRNA τα επίπεδα των microRNAs που εκφράζονται στους νωτιαίους μυελούς ενηλίκων αρουραίων χωρίστηκαν σε τέσσερις κατηγορίες χαμηλό επίπεδο (intensity <500), μέσο επίπεδο (500-4999) υψηλό επίπεδο (5000-9999) και υψηλότερο επίπεδο (>10.000).

Μεταξύ όλων των εκφραζομένων microRNAs, 36 εκφράστηκαν εις το υψηλότερο επίπεδο των φυσιολογικών νωτιαίων μυελών. Μετά τραυματική βλάβη του νωτιαίου μυελού 97 από 269 microRNAs παρουσίασαν σημαντική αλλαγή της έκφρασης αυτών. Από αυτά 60 microRNAs εκφράστηκαν υψηλότερα, από το χαμηλό επίπεδο μάλιστα εκφράστηκαν μεταξύ του μεσαίου και του υψηλότερου επιπέδου. Αυτά τα microRNAs κατηγοριοποιήθηκαν σε πέντε κλάσεις κατά ιεραρχική δομή: οι κλάσεις A και C περιείχαν τα ανοδικά - ρυθμιζόμενα microRNAs και οι κλάσεις B και E περιείχαν microRNAs που ήταν ανοδικά - ρυθμιζόμενα στις 4 ώρες μετά την τραυματική βλάβη του νωτιαίου μυελού και καθοδικά - ρυθμιζόμενα microRNAs από την 1^η μέχρι την 7^η ημέρα μετά την τραυματική βλάβη του νωτιαίου μυελού.

Η έκφραση 89 microRNAs πάνω από το χαμηλό επίπεδο και 83 microRNAs του χαμηλού επιπέδου παραμένει ανεπηρέαστη, μετά την τραυματική βλάβη του νωτιαίου μυελού.

Για να σταθμίσουμε την πλατφόρμα έκφρασης του υποκειμένου των microRNAs συμπεριλαμβανομένων τεσσάρων καθοδικά - ρυθμιζόμενων (microRNA-137, microRNA-181^a, microRNA-219-3p και microRNA-79) και ενός ανοδικά - ρυθμιζόμενου (microRNA-121) εγένετο εξέταση αυτών με RT-PCR και στη συνέχεια ανάλυση των δεδομένων.

Η ανάλυση του ρόλου των MicroRNAs ως επακόλουθον της τραυματικής βλάβης του Νωτιαίου μυελού και κυρίως των καθοδικά – ρυθμιζόμενων microRNA μεταβάλλεται μετά την τραυματική βλάβη του Νωτιαίου μυελού. Η Βιοπληροφορική ανάλυση αποκάλυψε ότι μερικοί φλεγμονώδεις ρυθμιστές microRNAs όπως ο Factor – α της ογκογόνου νέκρωσης (TNF-α) ή ιντερλευκίνη – 1β (IL-1β) και το ενδοκυτταρικό μόριο συμφύσεων 1 (ICAM1) και τα microRNAs τους αποτελούν δυνητικούς στόχους καθοδικώς ρυθμιζόμενων microRNAs μετά από τραυματική βλάβη του Νωτιαίου μυελού, αντιστρόφως μερικά αντιφλεγμονώδη microRNAs όπως είναι η annexinA1 και η annexinA2 ήταν πιθανοί στόχοι των microRNA-221 και microRNA-1 αναδρομικώς, τα οποία είναι καθοδικά – ρυθμιζόμενα μετά από τραυματική βλάβη του νωτιαίου μυελού. Μερικά ανοδικά – ρυθμιζόμενα microRNAs μετά τραυματική βλάβη του Νωτιαίου μυελού είναι ανοδικά για μερικά αντί-οξειδοτικά γονίδια όπως το SOD1 καθώς και για γονίδια της καταλάσης. Τα τελευταία χρόνια η απόπτωση έχει αναγνωρισθεί ως ένας σημαντικός μηχανισμός του κυτταρικού θανάτου σε πολλές νευρολογικές διαταραχές συμπεριλαμβανομένης της τραυματικής βλάβης του νωτιαίου μυελού.

Στην παρούσα εργασία ερευνάται η έκφραση του microRNA μετά τραυματική βλάβη νωτιαίου μυελού σε αρουραίους.

Real-time qRT-PCR απεδείχθη ακριβώς μέθοδος και τα αποτελέσματα της αρκετά αξιόπιστα. Παρουσιάζεται τοιουτοτρόπως ότι $\approx 77\%$ του αναγνωρισμένου σε αρουραίους ώριμο microRNAs εκφράζεται στο νωτιαίο μυελό των αρουραίων όστις αποτελεί μια πλούσια πηγή προς έρευνα της έκφρασης των microRNAs. Μεταξύ των 60 microRNAs τα οποία διαφοροποιήθηκαν σημαντικά μετά από τραυματική βλάβη του

νωτιαίου μυελού, 30ησαν ανοδικά – ρυθμιζόμενα 16ησαν καθοδικά – ρυθμιζόμενα και 14 ανοδικά – ρυθμιζόμενα 4 ώρες μετά την τραυματική βλάβη και ακολούθως καθοδικά – ρυθμιζόμενα από την 1^η μέχρι και την 7^η ημέρα μετά την τραυματική βλάβη του Ν.Ν.,

Αυτά τα μεταβαλλόμενα microRNAs με μια αλλαγή της λειτουργίας μάλλον επιδρούν σ' ένα μεγάλο αριθμό νευρολογικών γονιδίων.

Η παρουσίασις ενός μεγάλου αριθμού των αλλαγών έκφρασις των microRNAs αποτελεί ένα σημαντικό βήμα των υποκειμένων μοριακών μηχανισμών της βλάβης.

Οπωσδήποτε όμως η παθοφυσιολογική γνώσις της απορρύθμισης αυτών των microRNAs μετά τραυματική βλάβη του νωτιαίου μυελού πρέπει να ερευνηθή περαιτέρω.

Συμπερασματικώς δυνάμεθα αναφέρουμε ότι παρατηρείται αύξησις των microRNAs γενικώς μετά από αθλητικές επιδόσεις και πως η Παθοφυσιολογική γνώσις των microRNAs χρήζει περαιτέρω ερεύνης.

Ευχαριστώ

Στέργιος Βασδέκης D.R.C.O.G.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Hideya Mizuno, Akinozi Kumamuta, Naoki Ito et al. Identification of Muscle-specific Micro RNAs in serum of muscular dystrophy animal models: Promising novel blood-based markers of muscular dystrophy. Published March 30, 2011 on Plos ONE.
2. Natab D.da Silva Junior, Tiago Fernandes, Ursule P.R. Soci, Alex W.A. Monteizo. Swimming training in rats increases cardiac micro-RNA-126 expression and angiogenesis. Published 27 January 2012, Medicine and Science in Sports and exercise.
3. T. Fernandes, U.P,R Soci and E.M. Oliveira. Eccentric and Concentric cardiac hypertrophy induced by exercise training: Micro-RNAs and molecular determinants. Brazilian Journal of Medicine and Biological Research , September 2011.
4. Aoi W. et al. The microRNA miR-696 regulates PGC-1 in mouse skeletal muscle in response to physical activity. 2010 Endocrinol Metab.
5. Care A., Catalucci D., Felicetti F, Addurio A. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. Nat Med 2007
6. Kadi F., Ponsot E., Holm L., The effects of regular strength training on telomere length in human skeletal muscle. Med Science Sports and Exercise. 2008
7. Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. Adv Genet 70, 2010
8. Yu X, Zuo Q. 2. MicroRNAs in the regeneration of skeletal muscle. Front Biosci. 2013 Jan

9. Oliveira-Carvalho V, Silva MM, Guimarães GV, Bacal F, Bocchi EA. MicroRNAs: new players in heart failure. *Mol Biol Rep.* 2012 Dec 15.
10. Uhlemann M, Möbius-Winkler S, Fikenzer S, Adam J, Redlich M, Möhlenkamp S, Hilberg T, Schuler GC, Adams V. Circulating microRNA-126 increases after different forms of endurance exercise in healthy adults. *Eur J Prev Cardiol.* 2012
11. Sandek A, von Haehling S, Anker SD. Muscle in heart disease: highlights from the European Society of Cardiology's annual meeting 2012. *Int J Cardiol.* 2012
12. Yamamoto H, Morino K, Nishio Y, Ugi S, Yoshizaki T, Kashiwagi A, Maegawa H. MicroRNA-494 regulates mitochondrial biogenesis in skeletal muscle through mitochondrial transcription factor A and Forkhead box j3. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012 Dec
13. Fernandes-Silva MM, Carvalho VO, Guimarães GV, Bacal F, Bocchi EA. Physical exercise and microRNAs: new frontiers in heart failure. *Arq Bras Cardiol.* 2012 May
14. McDanel TG, Smith TP, Harhay GP, Wiedmann RT. Next-generation sequencing of the porcine skeletal muscle transcriptome for computational prediction of microRNA gene targets. *PLoS One.* 2012