



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία

Ο ρόλος των μεταλλοπρωτεϊνών στο ανεύρυσμα κοιλιακής
αορτής

The role of matrix metalloproteinases in abdominal aortic
aneurysm

Επιβλέποντες καθηγητές

Κουρέτας Δημήτριος

Στάγκος Δημήτριος

Τσέζου Ασπασία

Φοιτητής

Μεγαγιάννης Αντώνης

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κουρέτας Δημήτριος

Στάγκος Δημήτριος

Τσέζου Ασπασία

Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών
Οργανισμών

Τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας

Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών
Οργανισμών

Τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας

Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής

Τμήμα Ιατρικής

Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	5
Abstract.....	5
A. Εισαγωγή.....	6
A.1 Ανεύρυσμα Κοιλιακής Αορτής	6
A.2 Κλινικές Εκδηλώσεις	6
A.3 Προδιαθεσικοί παράγοντες	7
A.4 Δομή αορτικού τοιχώματος.	8
A.5 Παθοφυσιολογία	9
A.6 Μεταλλοπρωτεΐνάσες.....	12
A.6.1 Κολλαγενάσες	13
A.6.2 Ζελατινάσες.....	14
A.6.3 Στρωμολυσίνες.....	15
A.6.4 Ματριλυσίνες.....	15
A.6.5 Μεμβρανικού τύπου MMPs.....	15
A.6.6 Άλλες MMPs.....	16
A.7 Σκοπός εργασίας	18
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	19
B.1 Συλλογή δειγμάτων	19
B.2 Απομόνωση της μεσαίας στοιβάδας του αορτικού τοιχώματος.....	20
B.3 Απομόνωση άμεσου RNA από ιστό της μεσαίας στοιβάδας αορτής με ΑΚΑ και φυσιολογικής.....	21
B.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφής (RT-PCR)	22
B.5 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (qRT-PCR)	23
B.6 Απομόνωση άμεσης πρωτεΐνης από ιστό της μεσαίας στοιβάδας αορτής με ΑΚΑ και φυσιολογικής.....	24
B.7.1. Αποδιάταξη των πρωτεϊνών	26
B.7.2. Διαχωρισμός των πρωτεϊνών	26
B.1.8 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western (Western Blot).....	26

Γ. Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	29
Γ.1. Αποτελέσματα Western Blot.....	29
Γ.2. Αποτελέσματα Real-time PCR.....	29
Δ. Συζήτηση	31
Βιβλιογραφία	33

Περίληψη

Το Ανεύρυσμα Κοιλιακής Αορτής (ΑΚΑ) είναι μία πολυπαραγοντική νόσος και αφορά στη διάταση της αορτικής διαμέτρου κατά 50% της φυσιολογικής τιμής. Το ΑΚΑ συνιστά ένα σημαντικό πρόβλημα υγείας, που εντοπίζεται σε ένα σημαντικό ποσοστό ανδρών άνω των 65 χρονών και συνήθως παραμένει ασυμπτωματικό μέχρι την ρήξη του. Στην αιτιοπαθογένεια της νόσου ενέχονται τρεις κυρίως διαδικασίες που συμπεριλαμβάνουν την απόπτωση των λείων μυϊκών κυττάρων, τη χρόνια φλεγμονή του αορτικού τοιχώματος και την αποικοδόμηση του τοιχώματος της αορτής ως συνέπεια της ενισχυμένης δράσης πρωτεολυτικών μονοπατιών. Σκοπός της παρούσης εργασίας είναι η διερεύνηση της έκφρασης των μεταλλοπρωτεϊνών MMP-2, MMP-9 και MMP-13 στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η μεταγραφική και πρωτεϊνική έκφραση των MMP-2, MMP-9 και MMP-13 στη μεσαία στοιβάδα της αορτής με την χρήση των τεχνικών της Real-time PCR και Western blot αντίστοιχα ανάμεσα σε δείγματα ανευρυσματικής και φυσιολογικής κοιλιακής αορτής.

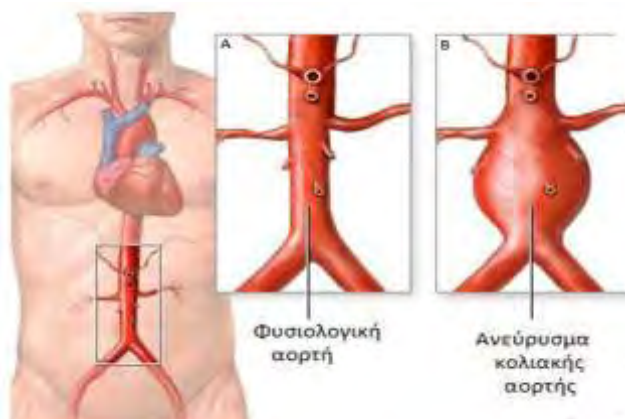
Abstract

Abdominal aortic aneurysm (AAA) is considered to be a multifactorial disease, which is characterized by an increase in the diameter of the aorta of 50% its normal diameter. AAA is an important health problem, which primarily affects a significant percentage of men over 65 years of age and usually remains asymptomatic until the event of its rupture. Hallmarks of AAA pathology are the apoptosis of smooth muscle cells, the inflammation and the degeneration of aortic wall as a result of the upregulation of proteolytic pathways. The purpose of this study was to examine the expression of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and MMP-13 in the abdominal aortic aneurysm. Specifically, we examined the mRNA and protein expression levels of MMP-2, MMP-9 and MMP-13, with the use of Real-time PCR and Western blot respectively, in tissue specimens from the media layer of AAA and normal abdominal aorta.

A. Εισαγωγή

A.1 Ανεύρυσμα Κοιλιακής Αορτής

Το ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής (ΑΚΑ) είναι μια εκφυλιστική νόσος της κοιλιακής αορτής και ορίζεται ως η μόνιμη και τοπική διάταση της κοιλιακής αορτής η οποία υπερβαίνει τη φυσιολογική διάμετρο αυτής κατά 50% ή είναι μεγαλύτερη των 3 cm.¹ Τα ΑΚΑ συνιστούν ένα σοβαρό πρόβλημα υγείας που σχετίζεται με υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα ως αποτέλεσμα της ρήξης του. Στις Ηνωμένες Πολιτείες τα ΑΚΑ αποτελούν την 13^η αιτία θανάτου,



Εικόνα 1: Κοιλιακή Αορτή Α) σε φυσιολογική κατάσταση και Β) με ΑΚΑ.

ενώ κάθε χρόνο υπολογίζεται ότι περίπου 15,000 άτομα πεθαίνουν εξαιτίας της ρήξης του ανευρύσματος. Τα ΑΚΑ συνιστούν το συχνότερο τύπο αρτηριακού ανευρύσματος που απαντώνται στον οργανισμό και συνήθως εντοπίζονται στην υπονεφρική αορτή, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να επεκταθούν σε μία ή και στις δύο λαγόνιες αρτηρίες στην πυελό. Υπολογίζεται ότι το 6-9% του πληθυσμού ηλικίας άνω των 55 σε άντρες και άνω των 70 σε γυναίκες έχει ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής, ενώ επίσης είναι γνωστό ότι η ρήξη του οδηγεί σε ποσοστό 80% στο θάνατο.

A.2 Κλινικές Εκδηλώσεις

Το ΑΚΑ είναι τις περισσότερες φορές ασυμπτωματικό μέχρι την ρήξη του γεγονός που καθιστά δύσκολη τη διάγνωσή τους. Η διάγνωσή του συνήθως τίθεται τυχαία κατά τη διάρκεια φυσικής εξέτασης ρουτίνας ή κάποιου απεικονιστικού ελέγχου. Οι ασθενείς συνήθως περιγράφουν αίσθημα παλμών στην κοιλιακή χώρα ή πιθανώς να εντοπίζεται σφύζουσα μάζα την περιοχή. Το ανεύρυσμα μπορεί να προκαλέσει έντονη συμπτωματολογία που χαρακτηρίζεται από αίσθημα πληρότητας, ναυτία, εμετούς και έντονο ραχιαίο και κοιλιακό πόνο σαν αποτέλεσμα ρήξης ή μεγάλης διάτασης, πίεσης γειτονικών δομών, εμβολής, διαχωρισμού ή θρόμβωσης. Για την διάγνωση της νόσου, ο γιατρός αρχικά κάνει μία ψηλάφηση της κοιλιακής αορτής και εάν τεθούν υπόνοιες για την ύπαρξη ανευρύσματος τότε διενεργείτε ένα υπερηχογράφημα triplex κοιλίας για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη του, ενώ για τον πλήρη προσδιορισμό των ανατομικών χαρακτηριστικών του ανευρύσματος είναι απαραίτητη η αξονική τομογραφία άνω και κάτω κοιλίας.

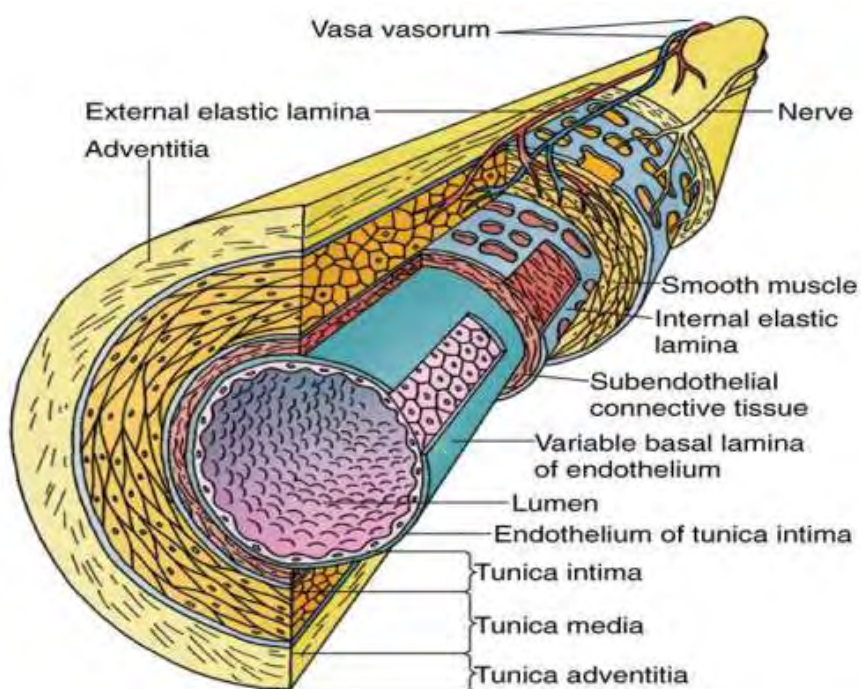
A.3 Προδιαθεσικοί παράγοντες

Παρόλο που τα ακριβή αίτια της ασθένειας παραμένουν ασαφή, διάφοροι παράγοντες θεωρούνται επιβαρυντικοί για την εμφάνιση της νόσου. Σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες, έχουν περιγραφεί και συνδεθεί με την παρουσία και ανάπτυξη του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής οι εξής παράγοντες:^{1,2}

- Ηλικία: Ο κίνδυνος για την ανάπτυξη ανευρύσματος αυξάνεται με την ηλικία. Συγκεκριμένα υπολογίζεται ότι σε άνδρες ηλικίας 65-80 ετών το ποσοστό αυτών που έχουν ΑΚΑ ανέρχεται στο 2-5%, ενώ σε γυναίκες της ίδιας ηλικίας στο 1%. Επίσης μελέτες έχουν δείξει ότι με την ηλικία αυξάνεται και ο κίνδυνος ρήξης του ανευρύσματος.
- Φύλο: Στους άντρες είναι αυξημένος ο κίνδυνος εμφάνισης ΑΚΑ σε σχέση με της γυναίκες. Οι κύριες αιτίες δεν έχουν διασαφηνιστεί, αλλά είναι πιθανόν να ευθύνονται ορμονικοί και γενετικοί παράγοντες, καθώς επίσης σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η διαφορετική έκθεση των δύο φύλων σε άλλους προδιαθεσικούς παράγοντες.
- Κάπνισμα: Είναι ο κύριος προδιαθεσικός παράγοντας για την εμφάνιση ΑΚΑ. Το κάπνισμα φαίνεται να αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης ΑΚΑ 6-7 φορές, ενώ επίσης έχει συσχετιστεί με την ταχεία ανάπτυξή του, αυξάνοντας έτσι το κίνδυνο της ρήξης του.
- Οικογενειακό ιστορικό: Ενδιαφέρον παρουσιάζουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι υπάρχει γενετική προδιάθεση στην εμφάνιση της νόσου, καθώς εκτιμάται ότι ένα ποσοστό ασθενών της τάξεως του 15-20% παρουσιάζει οικογενειακό ιστορικό ανευρύσματος. Επιπλέον πληθυσμιακές έρευνες έδειξαν ότι ένα θετικό οικογενειακό ιστορικό για το ΑΚΑ συνδέεται με διπλάσιο κίνδυνο εμφάνισής του στον ασθενή σε σχέση με αυτούς χωρίς οικογενειακό ιστορικό.
- Υπέρταση: Η υπέρταση συσχετίζεται με το ΑΚΑ αλλά μόνο για τις γυναίκες.
- Υπερχοληστερολαιμία: Αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα έχουν συνδεθεί με την εμφάνιση ΑΚΑ.

A.4 Δομή αρτηρικού τοιχώματος.

Το τοίχωμα της αρτηρίας αποτελείται από τρία διακριτά στρώματα ιστού, τον έσω χιτώνα, τον μεσαίο χιτώνα και τον έξω αρτηρικό χιτώνα (εικόνα 2). Ο έσω χιτώνας απαρτίζεται από μια μονή στοιβάδα πεπλατυσμένων ενδοθηλιακών κυττάρων τα οποία επενδύουν τον αυλό του αγγείου μαζί με τον υποκείμενο υπενδοθηλιακό συνδετικό ιστό. Ο μεσαίος χιτώνας αποτελεί την παχύτερη στοιβάδα του αρτηρικού τοιχώματος και αποτελείται από ομόκεντρες στοιβάδες λείων μυϊκών κυττάρων. Διάσπαρτες μεταξύ των λείων μυϊκών κυττάρων βρίσκονται ελαστικές ίνες, ίνες κολλαγόνου και πρωτεογλυκάνες. Τα ινώδη στοιχεία σχηματίζουν πέταλα εντός της θεμέλιας ουσίας που εκκρίνουν τα κύτταρα και διατηρούν τη δυναμική του τοιχώματος. Τέλος ο έξω χιτώνας καλύπτει την εξωτερική επιφάνεια της αρτηρίας και αποτελείται από ινοβλάστες, ίνες κολλαγόνου και ελαστίνης με επιμήκη προσανατολισμό. Μέσα στον έξω χιτώνα διεισδύουν μικρότερα αγγεία τα οποία ενέχονται στην αιμάτωση κυρίως του μεσαίου χιτώνα. Οι ανωτέρω στοιβάδες διαχωρίζονται μεταξύ τους με λεπτά στρώματα ελαστίνης. Συγκεκριμένα η έσω ελαστική μεμβράνη διαχωρίζει τον έσω και μεσαίο χιτώνα ενώ η εξωτερική ελαστική μεμβράνη εντοπίζεται μεταξύ του μεσαίου και έξω χιτώνα του τοιχώματος.³



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση του αρτηρικού τοιχώματος

A.5 Παθοφυσιολογία

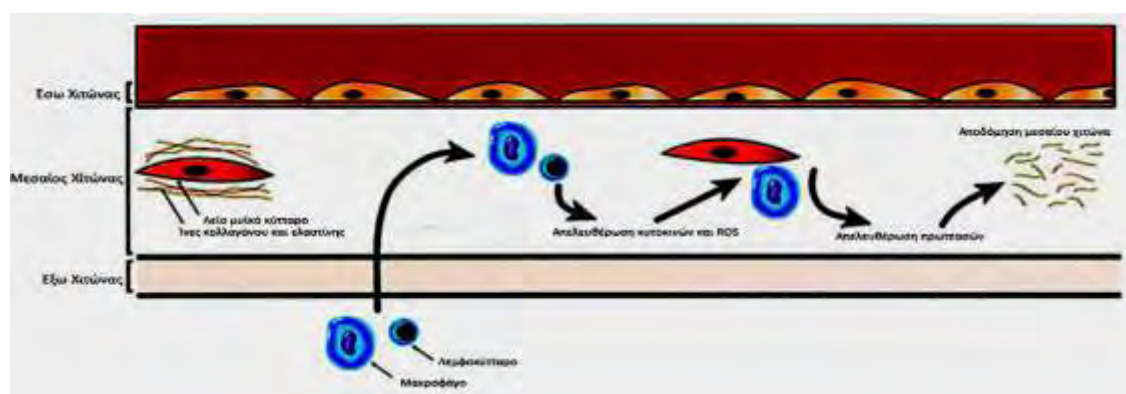
Η υπονεφρική αορτή είναι πιο επιρρεπής στην ανάπτυξη του ανευρύσματος σε σχέση με άλλα τμήματα, για διάφορους λόγους. Μηχανικά, είναι το τμήμα που συρρικνώνεται περισσότερο κατά την διάρκεια της συστολής και διαστέλλεται περισσότερο κατά την διάρκεια της διαστολής. Ακόμα, το τοίχωμά της είναι λεπτότερο και έχει λιγότερα εξωχιτώνικά αγγεία από την θωρακική αορτή.²

Όσο αφορά όμως στους μηχανισμούς που ενέχονται στην αιτιοπαθογένεια του ανευρύσματος υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις. Είναι όμως κοινώς αποδεκτό ότι η δημιουργία του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής είναι μία πολύπλοκη και πολυπαραγοντική διαδικασία, ενώ μελέτες έχουν αναφέρει ότι τρεις είναι οι κύριες διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στην παθογένεια του ΑΚΑ: η πρωτεόλυση, η φλεγμονή και η απόπτωση λείων μυϊκών κυττάρων.¹ Συγκεκριμένα, χαρακτηριστικά της παθοφυσιολογίας του ΑΚΑ αποτελούν η αποδόμηση της ελαστίνης και του κολλαγόνου στον μεσαίο και έξω χιτώνα της αορτής, η απώλεια των λείων μυϊκών κυττάρων με επακόλουθη λέπτυνση του μεσαίου χιτώνα του τοιχώματος και η διείσδυση των λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων στο αορτικό τοίχωμα.⁴

Αρχικά το τοίχωμα της κοιλιακής αορτής χαρακτηρίζεται από μια κατάσταση χρόνιας φλεγμονής που χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση στο αορτικό τοίχωμα φλεγμονωδών κυττάρων όπως λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα. Σύμφωνα με μελέτες τα φλεγμονώδη αυτά κύτταρα παράγουν και εκκρίνουν κυτοκίνες όπως η ιντερλευκίνη-1, ιντερλευκίνη-6 καθώς και αυξητικούς παράγοντες όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων α (TNF- α). Αποτέλεσμα αυτών είναι η ενεργοποίηση και απελευθέρωση αποικοδομητικών ενζύμων όπως διάφορες πρωτεάσες και μεταλλοπρωτεϊνάσες. Μεταξύ των αποικοδομητικών ενζύμων που ενεργοποιούνται συγκαταλέγονται και οι πρωτεάσες των οικογενειών κυστεΐνης και σερίνης. Επίσης έρευνες υποστηρίζουν ότι τα φλεγμονώδη κύτταρα αφού συσσωρευτούν στο τοίχωμα της αορτής μεταναστεύουν και στις διάφορες στοιβάδες αυτής, με αποτέλεσμα να καθιστούν το τοίχωμα λιγότερο ανθεκτικό. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι τα θραύσματα που παράγονται από την αποδόμηση της ελαστίνης και του κολλαγόνου, καθώς και οι κυτοκίνες που απελευθερώνονται από τα φλεγμονώδη κύτταρα λειτουργούν ως χημειοτακτικοί παράγοντες γεγονός που έχει ενοχοποιηθεί για την μετανάστευση τους στο αορτικό τοίχωμα. Παρόλα αυτά αν και μέχρι σήμερα δεν έχουν αποσαφηνιστεί οι μηχανισμοί που παρέχουν το έναυσμα για την μετανάστευσή τους, μελέτες επίσης υποστηρίζουν ότι η μετανάστευσή τους έχει συσχετιστεί με την ύπαρξη αθηροσκλήρωσης στην κοιλιακή αορτή, ωστόσο αυτό δε σημαίνει ότι με την

ύπαρξη της θα αναπτυχτεί ανεύρυσμα αλλά ούτε και ότι είναι απαραίτητος προϋπάρχον όρος για την ανάπτυξη του ανευρύσματος.

Επιπλέον χαρακτηριστικό της αιτιοπαθογένειας του ανευρύσματος είναι η αποικοδόμηση του αορτικού τοιχώματος. Έρευνες έχουν δείξει ότι η ενισχυμένη δράση και ενεργοποίηση πρωτεολυτικών μονοπατιών και ενζύμων έχουν ως αποτέλεσμα την πρωτεόλυση της ελαστίνης και του κολλαγόνου κυρίως στον έσω και μεσαίο χιτώνα της αορτής. Οι ίνες ελαστίνης και κολλαγόνου είναι οι κύριοι παράγοντες για την εμφάνιση των μηχανικών ιδιοτήτων της αορτής. Επίσης η απελευθέρωση ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) σύμφωνα με διάφορες ερευνητικές ομάδες φαίνεται να ενισχύει την αποδόμηση του τοιχώματος (εικόνα 3). Η αποδόμησή τους έχει σαν συνέπεια την αύξηση της ελαστικότητας του αορτικού τοιχώματος, καθώς επίσης την αποδιοργάνωση και λέπτυνση αυτού με αποτέλεσμα την διαστολή του και τον σχηματισμό του ανευρύσματος. Η ελαστίνη είναι πιο άφθονη στον μεσαίο χιτώνα του αορτικού τοιχώματος, ενώ το κολλαγόνο υπερέχει στον έξω χιτώνα και έχει την δυνατότητα σε αντίθεση με την ελαστίνη να αναγεννάται. Στο ΑΚΑ ο έξω χιτώνας, λόγω της αποδόμησης που υφίσταται ο μεσαίος χιτώνας, φαίνεται να είναι υπεύθυνος για την αντοχή της αορτής. Ακόμα, η αποδόμηση του κολλαγόνου σε αυτόν φαίνεται να είναι η κύρια αιτία της ρήξης του ανευρύσματος. Έτσι η ισορροπία ανάμεσα στην αναγέννηση του κολλαγόνου, που έχει αναφερθεί ότι είναι αυξημένη στο ΑΚΑ και στην αποδόμησή του φαίνεται να είναι καθοριστική για την ρήξη του ανευρύσματος.



Εικόνα 3: Σχηματισμός Ανευρύσματος Κοιλιακής Αορτής

Σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση ανευρύσματος επίσης φαίνεται να διαδραματίζει και ο μεσαίος χιτώνας της αορτής αποτελούμενος από λεία μυϊκά κύτταρα (SMCs). Τα SMCs υφίστανται απόπτωση που σε συνδυασμό με τα ανωτέρω οδηγεί στη λέπτυνση της αορτής και τη δημιουργία του ΑΚΑ. Συγκεκριμένα, μελέτες έχουν δείξει ότι η αποδόμηση της ελαστίνης και του κολλαγόνου που

παρατηρείται σε συνδυασμό με την απελευθέρωση ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) συμβάλλουν στην απόπτωση των λείων μυϊκών κυττάρων.

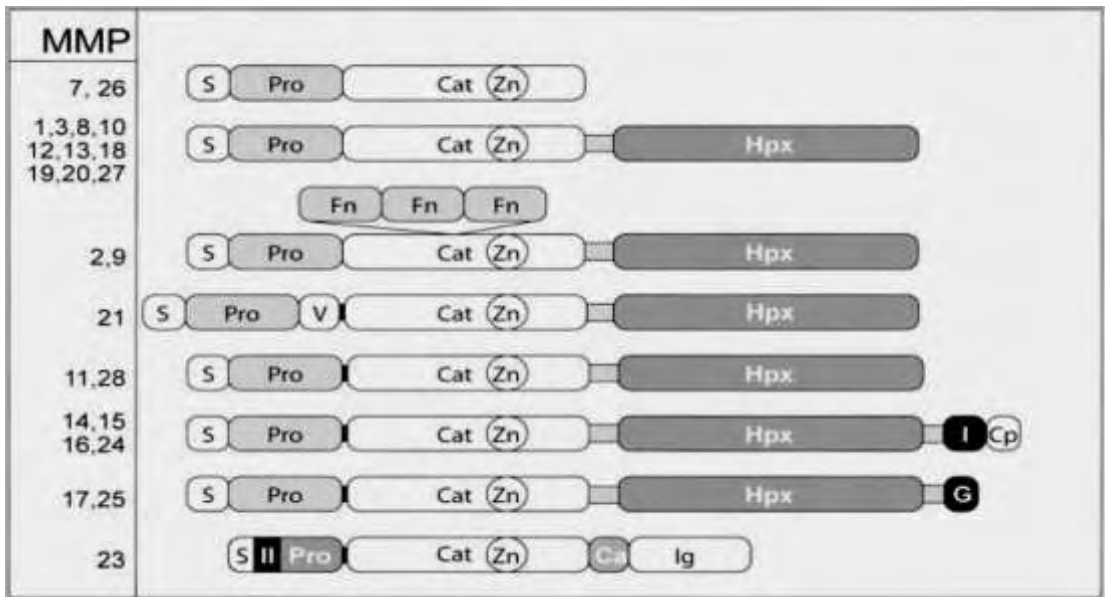
Η ανάπτυξη του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής έχει συνδεθεί επίσης στους περισσότερους ασθενείς με την ύπαρξη θρόμβου στο αορτικό τοίχωμα. Σε αντίθεση με τις άλλες αποφρακτικές παθήσεις, η ροή του αίματος διατηρείται στο ανεύρυσμα οδηγώντας σε μία συνεχή ανανέωση της δραστηριότητας των συστατικών του θρόμβου. Παρόλο που ο θρόμβος μειώνει σημαντικά την πίεση του ανευρυσματικού τοιχώματος, αυξάνει όμως το πάχος του οδηγώντας σε δημιουργία τοπικής υποξίας στα εσωτερικά στρώματα του μεσαίου χιτώνα του τοιχώματος, το οποίο προάγει την δημιουργία φλεγμονής. Επίσης, έχει αναφερθεί και η συμμετοχή του θρόμβου στην ανάπτυξη του ανευρύσματος ως μια πηγή πρωτεασών. Ακόμα, υπάρχουν στοιχεία ότι πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα παγιδεύουν και αποθηκεύουν την μεταλλοπρωτεϊνάση MMP-9 μέσα στον ανευρυσματικό θρόμβο.⁵

A.6 Μεταλλοπρωτεϊνάσες

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (matrix metalloproteinases, MMPs) είναι μια οικογένεια δομικά και λειτουργικά όμοιων ενζύμων που ανήκουν στην οικογένεια των ενδοπεπτιδασών, οι οποίες αποδομούν στοιχεία της εξωκυττάριας ουσίας και συνδετικές πρωτεΐνες. Η φυσιολογική τους λειτουργία στον οργανισμό έγκειται στην ισορροπημένη φράση μεταξύ των MMPs και των φυσικών αναστολέων τους, των TIMPs. Έρευνες έχουν δείξει ότι η πρωτεολυτική δράση τους διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειακή αναδιαμόρφωση, την κυτταρική μετανάστευση και την επεξεργασία των πρωτεϊνών εξωκυττάριας ουσίας και των μορίων προσκόλλησης, ενώ μελέτες σχετικά με την παθογένεια του ΑΚΑ έχουν συσχετίσει την αυξημένη δραστηριότητα τους με την αποδόμηση πρωτεϊνών του συνδετικού ιστού και της θεμέλιας ουσίας, χαρακτηριστικών ιστολογικών ευρημάτων ανευρυσματικής αορτής.⁶

Οι MMPs γενικά αποτελούνται από μια προπεπτιδική και μια καταλυτική περιοχή, καθώς επίσης και από μια περιοχή σύνδεσης και μια περιοχή αιμοπιξίνης (εικόνα 4). Μπορεί είτε να εκκρίνονται από τα κύτταρα είτε να είναι αγκιστρωμένες στην πλασματική τους μεμβράνη. Αρχικά, οι MMPs εντοπίζονται σε πρόδρομες μορφές, ενώ η απομάκρυνση ενός καταλοίπου κυστεΐνης από την καταλυτική τους περιοχή συντελεί στην τελική ενεργοποίησή τους. Η απομάκρυνση του παραπάνω καταλοίπου πραγματοποιείται είτε από άλλες MMPs είτε από άλλες κατηγορίες πρωτεϊνών. Επίσης, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η δραστηριότητα των MMPs ρυθμίζεται και σε επίπεδο της μεταγραφής αλλά και από ενδογενείς αναστολές τους. Η πρώτη MMP ανακαλύφθηκε στην ουρά τους γυρίνου που βρίσκονταν στο στάδιο τους μεταμόρφωσής του και ήταν μια κολλαγενάση. Από τότε μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί 24 διαφορετικές MMPs στα σπονδυλωτά, από τους οποίους οι 23 έχουν βρεθεί στον άνθρωπο. Οι πρωτεϊνάσες που εντάσσονται στην οικογένεια των MMP έχουν τα εξής τρία μοριακά χαρακτηριστικά:⁶

1. Ομολογία αλληλουχίας με την κολλαγενάση-1 (MMP-1)
2. Ένα μοτίβο κυστεΐνης PRCGXPD στην προπεπτιδική περιοχή το οποία διατηρεί τους MMPs στην ανενεργή μορφή τους (pro-MMPs). Εξαίρεση αποτελεί η MMP-23 που στερείται του συγκεκριμένου μοτίβου
3. Ένα μοτίβο δέσμησης ψευδαργύρου που αποτελείται από τρία μόρια ιστιδίνης με την συντηρημένη αλληλουχία HEXGHXXGXXH και εντοπίζεται στην καταλυτική περιοχή



Εικόνα 4: Η οργάνωση των περιοχών των MMPs. S: πεπτιδίο σήματος, Pro: προ-πεπτιδίο, Cat: καταλυτική περιοχή, Zn: ενεργή θέση Zinc, Hpx: περιοχή αιμοπιξίνης, Fn: περιοχή φιβρονεκτίνης, V: υποδοχέας βιτρονεκτίνης, I: διαμεμβανική περιοχή τύπου I, II: διαμεμβανική περιοχή τύπου II, G: άγκυρα GPI, Cp: κυτοπλασματική περιοχή, Ca: περιοχή με συστοιχίες κυστεΐνης και Ig: IgG-παρόμοια περιοχή

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες με βάση την ειδικότητα για το υπόστρωμα, την ομοιότητα της αλληλουχίας τους και την οργάνωση των περιοχών τους χωρίζονται στις εξής έξι κατηγορίες:⁷

A.6.1 Κολλαγενάσες

Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται οι MMP-1, MMP-8, MMP-13, και η MMP-18 που έχει εντοπιστεί στο χεποrus. Το βασικό χαρακτηριστικό αυτών των ενζύμων είναι η ικανότητά τους να διασπούν το κολλαγόνο τύπου I, II και III σε μία συγκεκριμένη θέση στα τρία τέταρτα από το αμινοτελικό τους άκρο. Επίσης, μπορούν να αποδομήσουν και άλλα μόρια της εξωκυττάριας ουσίας και μη. Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε μοντέλα ποντικών για ΑΚΑ αλλά και σε ιστό αορτής από ασθενείς με ΑΚΑ έχουν δείξει υψηλά μεταγραφικά και πρωτεϊνικά επίπεδα των MMP-1, MMP-8 και MMP-13. Η MMP-13 έχει μοριακό βάρος 60kDa και η ενεργοποίησή της γίνεται μέσω της πρωτεόλυσης της πεπτιδικής της περιοχής, ενώ έχει ως κύρια δραστηριότητα την αποδόμηση του κολλαγόνου, καθώς επίσης διακρίνεται από τις άλλες κολλαγενάσες για την ικανότητα της να πρωτεολύει τη ζελατίνη, τις πρωτεογλυκάνες, την φιβρονεκτίνη και να ενεργοποιεί μέσω πρωτεόλυσης

ανενεργές πρόδρομες μορφές μεταλλοπρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν συσχετιστεί με την παρουσία ΑΚΑ, καθώς επίσης φαίνεται ότι ενέχονται στην παθογένεια της νόσου καθώς συμβάλλουν στην αποδόμηση του κολλαγόνου που παρατηρείται στο αορτικό τοίχωμα ανευρυσματικής αορτής. Επιπλέον η υψηλή έκφρασή τους έχει συσχετιστεί με την κίνδυνο ρήξης του ανευρύσματος.

A.6.2 Ζελατινάσες

Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν η ζελατινάση Α (MMP-2) και η ζελατινάση Β (MMP-9). Τα ένζυμα αυτά πρωτεολύουν μετουσιωμένες πρωτεΐνες κολλαγόνου και ζελατίνης. Ακόμα στην καταλυτική τους περιοχή έχουν τρεις επαναλήψεις της περιοχής της φιμπρονεκτίνης τύπου II, με την οποία προσδένονται στην ζελατίνη, στο κολλαγόνο και στην λαμίνη. Η MMP-2, αλλά όχι η MMP-9, πρωτεολύει το κολλαγόνο τύπου I, II, και III. Οι MMP-2 και MMP-9 φαίνεται να είναι οι κύριες μεταλλοπρωτεϊνάσες που συμμετέχουν στο σχηματισμό του ΑΚΑ πρωτεολύοντας την ελαστίνη στον μεσαίο χιτώνα κυρίως. Η MMP-2 είναι ένα ένζυμο με μοριακό βάρος 72 kDa και όπως αναφέρθηκε πρωτεολύει το κολλαγόνο και την ζελατίνη. Αυτό το ένζυμο μπορεί να ενεργοποιηθεί είτε εξωκυτταρικά από πρωτεάσες είτε ενδοκυτταρικά μέσω S-glutathiolation χωρίς να χρειάζεται η πρωτεολυτική απομάκρυνση της προπεπτιδικής περιοχής. Ακόμα σε αντίθεση με τις άλλες μεταλλοπρωτεϊνάσες μπορεί να ενεργοποιηθεί στην κυτταρική μεμβράνη από τις περισσότερες μεμβρανικές μεταλλοπρωτεϊνάσες. Η MMP-9 είναι το άλλο μέλος των ζελατινασών και έχει μοριακό βάρος 92 kDa. Έρευνες έχουν συσχετίσει τα επίπεδα έκφρασης της MMP-2 με το μέγεθος των ανευρυσμάτων καθώς φαίνεται ότι η MMP-2 να είναι αυξημένη στα μικρά ανευρύσματα, κάτι που δείχνει ότι είναι ένα ένζυμο που συμμετέχει στην γένεση του ανευρύσματος. Η MMP-9, σε αντίθεση με την MMP-2, είναι πιο αυξημένη στα πιο μεγάλα ανευρύσματα, στοιχείο που δείχνει ότι είναι το κύριο ένζυμο που προάγει την διεύρυνση και την ρήξη του ανευρύσματος.

A.6.3 Στρωμολυσίνες

Στη συγκεκριμένη οικογένεια ανήκουν η στρωμολυσίνη 1 (MMP-3) και στρωμολυσίνη 2 (MMP-10) οι οποίες χαρακτηρίζονται από έχουν παρόμοιες ειδικότητες υποστρώματος, αλλά η MMP-3 έχει μεγαλύτερη πρωτεολυτική ικανότητα σε σχέση με την MMP-10. Ακόμα η MMP-3 ενεργοποιεί και διάφορες πρόδρομες μορφές μεταλλοπρωτεϊνών, ενώ φαίνεται ότι αυτή η δραστηριότητά της να είναι κρίσιμη για την πλήρη ενεργοποίηση της MMP-1. Τέλος, η MMP-3 έχει συσχετιστεί με το ΑΚΑ και συγκεκριμένα με την αποδόμηση της ελαστίνης και του κολλαγόνου σε αυτό καθώς επίσης ενέχεται στον σχηματισμό του μέσω της ενεργοποίησης άλλων MMPs, όπως η MMP-1.

A.6.4 Ματριλυσίνες

Οι ματριλυσίνες χαρακτηρίζονται από την έλλειψη περιοχής της αιμοπηξίνης. Μέλη της κατηγορίας αυτής είναι η ματριλυσίνη 1 (MMP-7) και η ματριλυσίνη 2 (MMP-26) οι οποίες και οι δύο πρωτεολύουν στοιχεία της εξωκυττάριας ουσίας. Εκτός από τα στοιχεία της εξωκυττάριας ουσίας, η MMP-7 αποδομεί και μόρια της επιφάνειας του κυττάρου όπως η προ-α-ντεφενσίνη, ο υποδοχέας Fas, pro-TNF-α και η Ε-καδχερίνη.

A.6.5 Μεμβρανικού τύπου MMPs

Στη συγκεκριμένη οικογένεια ανήκουν έξι μεμβρανικού τύπου MMPs (MT-MMPs): οι τέσσερις είναι πρωτεΐνες τύπου I διαμεμβρανικής περιοχής (MMP-14, MMP-15, MMP-16, και MMP-24), και οι άλλες δύο είναι πρωτεΐνες που περιέχουν άγκυρα γλυκοσυλο-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (GPI) (MMP-17 και MMP-25). Με εξαίρεση την MT4-MMP, είναι όλες ικανές να ενεργοποιούν την proMMP-2. Επίσης τα ένζυμα αυτά διασπούν μόρια της εξωκυττάριας ουσίας και η MT1-MMP (MMP-14) χαρακτηρίζεται από κολλαγονολυτική δραστηριότητα για τα κολλαγόνα τύπου I, II και III. Η MT1-MMP φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση, ενώ έχει συνδεθεί και με το ΑΚΑ μέσω της ικανότητάς της να ενεργοποιεί την pro-MMP-2. Η MT5-MMP (MMP-17) εντοπίζεται στον εγκέφαλο και εκφράζεται κυρίως στην παραγκεφαλίτιδα. Η MT6-MMP εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος και σε αναπλαστικά αστροκυττάρια και γλοιοβλαστώματα.

A.6.6 Άλλες MMPs

Οι παρακάτω επτά MMPs δεν εντάσσονται σε καμία κατηγορία. Η στρωμολυσίνη 3 (MMP-11) συνήθως δεν εντάσσεται στις στρωμολυσίνες δεδομένου ότι η αλληλουχία της και η ειδικότητα των υποστρωμάτων διαφέρει από τις στρωμολυσίνες. Η μεταλλοελαστάση (MMP-12) εκφράζεται κυρίως στα μακροφάγα και είναι απαραίτητη για τη μετανάστευση των μακροφάγων, ενώ μελέτες έχουν δείξει ότι εκτός από την ελαστίνη, αποδομεί και μια σειρά άλλων πρωτεϊνών. Επίσης, λόγω της ελαστολυτικής της ικανότητας έχει συσχετιστεί με το ΑΚΑ. Η MMP-19 που ταυτοποιήθηκε από cDNA κλώνους ύπατος και ως αυτοαντιγόνο T-κυττάρων από ασθενής με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Εναμελυσίνη (MMP-20), η οποία διασπά την αμελογενίνη, εντοπίζεται κυρίως εντός του νεοσχηματισμένου σμάλτου των δοντιών. Η MMP-22 κλωνοποιήθηκε αρχικά από ινοβλάστες κοτόπουλου, και ένα ανθρώπινο ομόλογο έχει ταυτοποιηθεί με βάση τις EST αλληλουχίες. Η λειτουργία αυτού του ενζύμου δεν είναι γνωστή. Η MMP-23 εκφράζεται κυρίως σε αναπαραγωγικούς ιστούς. Το ένζυμο αυτό στερείται το μοτίβο κυστεΐνης στην προπεπτιδική περιοχή. Επίσης απουσιάζει η περιοχή αιμοπηξίνης και αντί αυτής έχει μια περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη ακολουθούμενη από μία περιοχή ανοσοσφαιρίνης. Φαίνεται να είναι τύπου II μεμβρανική πρωτεΐνη λόγω του γεγονότος ότι στην διαμεμβρανική της περιοχή που φέρει στο αμινοτελικό άκρο του προπεπτιδίου εντοπίζεται ένα αναγνωριστικό μοτίβο φουρίνης που έχει στο προπεπτίδιο, διασπάται στο Golgi και απελευθερώνεται ως ενεργό ένζυμο στον εξωκυτταρικό χώρο. Η τελευταία προσθήκη στην οικογένεια των MMP είναι η επιλυσίνη (MMP-28) που εκφράζεται κυρίως σε κερατινοκύτταρα. Πρότυπα έκφρασης της MMP-28 σε ανέπαφο και κατεστραμμένο ιστό δείχνουν ότι έχει λειτουργία στην αιμόσταση και στην επούλωση πληγών.

<i>MMP</i>	<i>Enzyme</i>	<i>Genetic location</i>	<i>Main extracellular matrix substrates</i>	<i>Role in aortic aneurysm</i>
MMP-1	Collagenase 1	11q22-q23	Collagens (I, II, III, VII, VIII, X), gelatin, fibronectin, vitronectin, laminin, aggrecan	Collagenolysis, associated with risk of rupture
MMP-2	Gelatinase A	16q13	Collagens (I, II, III, IV, V, VII, X, XI), gelatin, elastin, fibronectin, vitronectin, laminin	Elastolysis, dominant role in early stages of aneurysm formation
MMP-3	Stromelysin 1	11q23	Collagens (III, IV, V, VII, IX, X, XI), gelatin, elastin, fibronectin, vitronectin, laminin	Elastin and collagen degradation, activates other pro-MMPs, angiogenesis
MMP-8	Collagenase 2	11q21-q22	Collagens (I, II, III), aggrecan	Collagen degradation, aneurysm rupture
MMP-9	Gelatinase B	20q11.2-q13.1	Collagens (IV, V, XI, XIV), gelatin, elastin, vitronectin, laminin, aggrecan	Elastolysis, collagenolysis, dominant role in later stages of aneurysm formation and rupture
MMP-12	Macrophage elastase	11q22.2-q22.3	Collagens (I, IV, V), gelatin, elastin, fibronectin, vitronectin, laminin	Elastolytic activity
MMP-13	Collagenase 3	11q22.3	Collagens (I, II, III, IV, VI, IX, X, XIV), gelatin, fibronectin, aggrecan	Collagenolysis, associated with risk of rupture
MMP-14	MT1-MMP	14q11-q12	Collagens (I, II, III), gelatin, fibronectin, tenascin, vitronectin, laminin	Activates pro-MMP-2

Εικόνα 5: MMPs που έχουν συσχετιστεί με το ανεύρυσμα και ο ρόλος τους σε αυτό

A.7 Σκοπός εργασίας

Σκοπός της παρούσης εργασίας είναι η μελέτη της έκφρασης των μεταλλοπρωτεϊνών MMP-2, MMP-9 και MMP-13 σε ιστό ανευρυσματικής και φυσιολογικής κοιλιακής αορτής. Πιο συγκεκριμένα, μέσω Real-time PCR θα εξεταστούν τα επίπεδα έκφρασης των mRNA των MMP-2 και MMP-9 σε ιστό ανευρυσματικής και φυσιολογικής κοιλιακής αορτής, ενώ μέσω Western blot θα πραγματοποιηθεί έλεγχος της έκφρασης της MMP-13 σε αυτούς τους ιστούς. Τα ένζυμα αυτά φαίνεται να έχουν ρόλο στον σχηματισμό του ΑΚΑ μέσω της αποδόμησης πρωτεϊνών, όπως το κολλαγόνο και η ζελατίνη, στην θεμέλια ουσία της μεσαίας στιβάδας της κοιλιακής αορτής

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1 Συλλογή δειγμάτων

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας εργασία χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ανευρυσματικής κοιλιακής αρτηίας, τα οποία ελήφθησαν από ασθενείς που υπεβλήθησαν σε ανοιχτή χειρουργική αποκατάσταση για ρήξη Ανευρύσματος Κοιλιακής Αορτής (ΑΚΑ). Τα δείγματα του ανευρύσματος ελήφθησαν σε συνεργασία με την Αγγειοχειρουργική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Η χειρουργική επέμβαση για ΑΚΑ έγινε με βάση το μέγεθος του ανευρύσματος (διάμετρος αρτηίας >5.0cm) κατόπιν διάγνωσης με αξονική αγγειογραφία (Computed Tomography Angiography). Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν δείγματα φυσιολογικής κοιλιακής αρτηίας χωρίς αθηροσκληρωτικές αλλοιώσεις τα οποία ελήφθησαν σε συνεργασία με το τμήμα Εγκληματολογικών Επιστημών της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Συγκεκριμένα στην εργασία συμπεριλήφθησαν 8 δείγματα αορτικού τοιχώματος ΑΚΑ και 8 δείγματα φυσιολογικής κοιλιακής αρτηίας. Το εύρος της ηλικίας και το φύλο των δειγμάτων τόσο της ομάδας μελέτης όσο και της ομάδα ελέγχου παρατίθενται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1 : Στοιχεία για την ηλικία και το φύλο 5 ασθενών που αποτέλεσαν την ομάδα μελέτης.

ΟΜΑΔΑ ΜΕΛΕΤΗΣ	ΗΛΙΚΙΑ	ΦΥΛΟ	
AAA	Μέσος όρος	74 ± 6.4	7 Άνδρες / 1 Γυναίκα
Normal	Μέσος όρος	65 ± 6.4	7 Άνδρες / 1 Γυναίκα

B.2 Απομόνωση της μεσαίας στοιβάδας του αορτικού τοιχώματος.

Σύμφωνα με έρευνες, η στοιβάδα του αορτικού τοιχώματος, η οποία κατέχει πρωταρχικό ρόλο στην παθογένεια του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής (ΑΚΑ), είναι η μεσαία στοιβάδα αυτού, ενώ ο κύριο κυτταρικός τύπος που ενέχεται στη παθογένεση της νόσου είναι τα λεία μυϊκά κύτταρα (Smooth Muscle Cells, SMCs) που εντοπίζονται στο μεσαίο χιτώνα της αορτής.

Η απομόνωση της μεσαίας στοιβάδας έγινε από δείγματα κοιλιακής αορτής με ΑΚΑ που ελήφθησαν άσηπτα κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης καθώς και από δείγματα φυσιολογικής κοιλιακής αορτής που ελήφθησαν κατόπιν νεκροτομής χωρίς κάποια χημική επεξεργασία. Τα δείγματα μετά την παραλαβή τους υπεβλήθησαν σε έκπλυση με το ρυθμιστικό διάλυμα Phosphate Buffer Saline (PBS) χωρίς CaCl_2 και MgCl_2 (PBS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+}), ώστε να απομακρυνθούν τυχόν ανεπιθύμητα υπολείμματα και να διατηρηθεί η σταθερότητα του pH τους.

Στη συνέχεια με τη βοήθεια αποστειρωμένων νυστεριών απομακρύνθηκε ήπια ο έσω και έξω χιτώνας της αορτής. Ο εναπομείναντας ιστός που αποτελεί τον μεσαίο χιτώνα της αορτής αφού υπέστη περαιτέρω έκπλυση με το διάλυμα PBS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} ώστε να απομακρυνθούν υπολείμματα αίματος, τεμαχίστηκε σε πολύ μικρά κομμάτια και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία -80°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία.

Αναλυτική διαδικασία :

- Ξεπλύμα του ιστού 3-4 φορές με PBS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} σε θερμοκρασία δωματίου (room temperature, RT) με σκοπό την απομάκρυνση υπολειμμάτων του χειρουργείου ή της νεκροψίας και τη διατήρηση της σταθερότητας του pH.
- Απομάκρυνση του έσω και έξω αορτικού χιτώνα με τη βοήθεια αποστειρωμένων νυστεριών.
- Ξέπλυμα του εναπομείναντα ιστού, δηλαδή του μεσαίου χιτώνα αορτής, 3-4 φορές με PBS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} .
- Τεμαχισμός του ιστού σε μικρά κομμάτια με αποστειρωμένο νυστέρι.
- Μεταφορά και αποθήκευση του ιστού σε θερμοκρασία -80°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία για την απομόνωση της πρωτεΐνης.

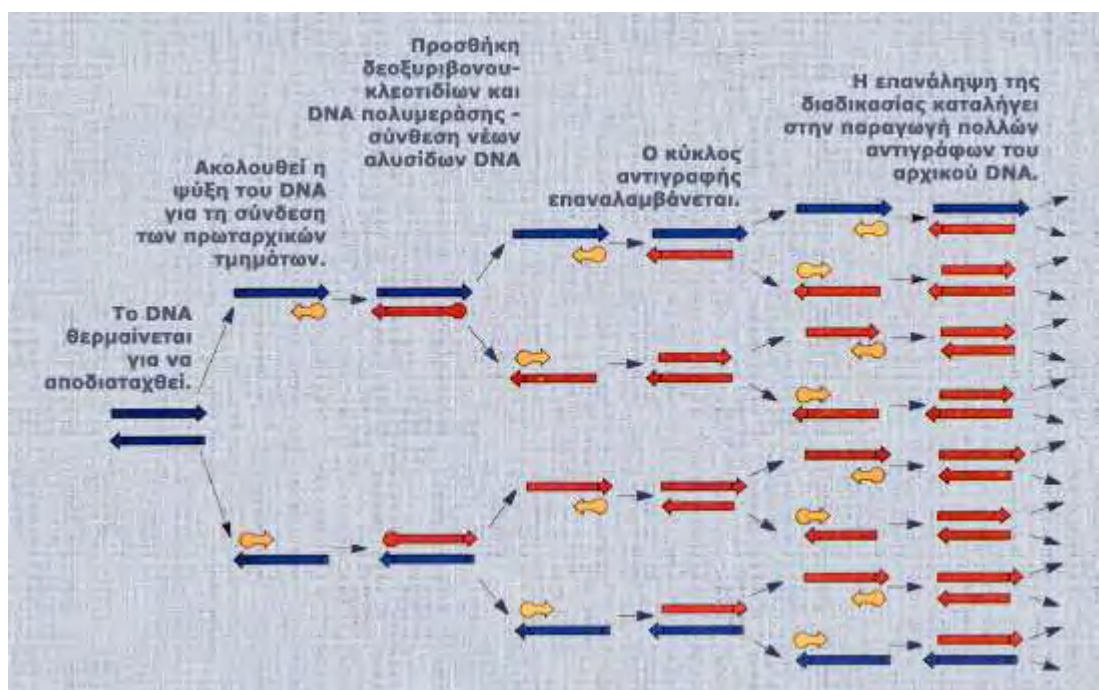
B.3 Απομόνωση άμεσου RNA από ιστό της μεσαίας στοιβάδας αορτής με ΑΚΑ και φυσιολογικής.

Άμεσο RNA απομονώθηκε από ιστό της μεσαίας στοιβάδας των δειγμάτων προκειμένου να ακολουθήσει μελέτη της έκφρασης των γονιδίων του ενδιαφέροντός μας σε επίπεδο μεταγραφής και συγκεκριμένα αξιολογήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του mRNA των γονιδίων *MMP-3* και *MMP-9*. Η απομόνωση του RNA έγινε με την κάτωθι διαδικασία.

- Προσθήκη 1mL Trizol σε ιστό της μεσαίας στοιβάδας των δειγμάτων, το οποίο διαλύει τις μεμβράνες των κυττάρων συμβάλλοντας στην απελευθέρωση του RNA.
- Ομογενοποίηση των δειγμάτων.
- Προσθήκη 200μl χλωροφορμίου και ήπια ανάδευση με vortex με στόχο τη λύση των κυττάρων.
- Επώαση των δειγμάτων για 3min στους 15-30 °C και φυγοκέντρηση για 15min στις 12000 στροφές στους 4 °C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης σε κάθε σωληνάριο σχηματίζονται τρεις φάσεις: η υποκείμενη φάση που περιέχει φαινόλη/χλωροφόρμιο στα οποία είναι διαλυμένες οι πρωτεΐνες, η ενδιάμεση φάση και η ανώτερη υδατική φάση όπου και εντοπίζεται κυρίως το RNA.
- Μεταφορά της ανώτερης υδατικής φάσης σε καινούργιο σωληνάριο όπου και πραγματοποιείται κατακρήμνιση του RNA με προσθήκη 1mL ισοπροπανόλης. Ακολουθεί επώαση στους 15-30 °C για 10min και φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 10min στις 12000 στροφές στους 4 °C.
- Αφαίρεση του υπερκείμενου και έπλυση του ιζήματος που δημιουργήθηκε λόγω της ισοπροπανόλης με αιθανόλη 75% και φυγοκέντρηση για 10min στις 10000 στροφές στους 4 °C.
- Τέλος, αφαίρεση του υπερκείμενου και επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία 37 °C ώστε να στεγνώσουν καλά.
- Διάλυση του RNA με 30μl ddH₂O και επώαση στους 55 °C για 10min.
- Τα δείγματα φωτομετρούνται ώστε να ελεγχθεί η ποσότητα του RNA που απομονώθηκε από κάθε δείγμα. Με τη φωτομέτρηση υπολογίζεται η απορρόφηση του RNA στα μήκη κύματος 260nm και 280nm καθώς και ο μεταξύ τους λόγος (ratio). Η συγκέντρωση του κάθε δείγματος υπολογίζεται σύμφωνα με τον εξής τύπο: συγκέντρωση RNA = συντελεστής αραίωσης x OD₂₆₀ x 40μg/ml.

B.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφής (RT-PCR)

Το RNA που απομονώθηκε χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) κατά την οποία η αλυσίδα μονόκλωνου RNA αρχικά μεταγράφεται αντίστροφα σε συμπληρωματικό DNA από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση και ακολούθως το παραγόμενο μόριο cDNA ενισχύεται σε μια κλασική αντίδραση PCR (εικόνα 6)



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας της PCR

Συγκεκριμένα, για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές εξανουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας, αντίστροφη μεταγραφάση scRIII, ρυθμιστικό διάλυμα 5x, δεσοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) και 1μg RNA από κάθε δείγμα. Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής :

- Αρχικά το διάλυμα RNA με τα τυχαία εξανουκλεοτίδια θερμάνθηκε στους 65 °C για 5min με σκοπό την αποδιάταξη τυχόν δευτεροταγών δομών του RNA.
- Επώαση των δειγμάτων σε πάγο για 5min με σκοπό τη σταθεροποίηση της αποδιάταξης των δευτεροταγών δομών του RNA.
- Προσθήκη των υπόλοιπων αντιδραστηρίων και τοποθέτηση των δειγμάτων σε συσκευή PCR στις εξής συνθήκες :
 - 37 °C για 60min

- 65 °C για 10min
- Τελική θερμοκρασία 4 °C

B.5 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (qRT-PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR) επιτρέπει την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση ενός συγκεκριμένου μορίου DNA. Η μέθοδος βασίζεται στις γενικές αρχές της κλασικής μεθόδου PCR και το κύριο χαρακτηριστικό της είναι ότι κάθε μόριο DNA που ενισχύεται, ποσοτικοποιείται σε κάθε κύκλο αντίδρασης. Η ποσοτικοποίηση γίνεται με τη χρήση φθορίζουσών χρωστικών που παρεμβάλλονται στη διπλή έλικα του DNA. Τα επίπεδα του φθορισμού που μετρούνται από έναν ειδικό ανιχνευτή αντανakλούν τα επίπεδα έκφρασης του υπό μελέτη γονιδίου, καθώς η χρωστική φθορίζει μόνο όταν προσδένεται σε δίκλωνο DNA.

Στην παρούσα εργασία η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των γονιδίων *MMP-2* και *MMP-9*. Για την ανίχνευση των προϊόντων την αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε η συσκευή ABI7300 και η φθορίζουσα ουσία SYBR Green PCR Master Mix. Η SYBR Green μπορεί να συνδεθεί σε όλα τα δίκλινα μόρια DNA αλλά μόνο σε μια συγκεκριμένη περιοχή. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μετά από σύγκριση των μεταγράφων των υπό μελέτη γονιδίων με αυτών του γονιδίου αναφοράς (*GAPDH*) με τη συγκριτική μέθοδο CT. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο υπολογίζεται ο σχετικός λόγος έκφρασης του υπό μελέτη γονιδίου βάσει της διαφοράς των κύκλων του PCR μεταξύ του γονιδίου αυτού και του γονιδίου αναφοράς.

Το διάλυμα αντίδρασης που χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό των γονιδίων περιείχε cDNA, SYBR Green, εκκινητής Forward, εκκινητής Reverse και δις απεσταγμένο νερό. Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:

- Αρχική αποδιάταξη τους 95 °C για 10min
- 45 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια :
 - Αποδιάταξη στους 95 °C για 30sec
 - Υβριδοποίηση-σύνδεση εκκινητών για 30sec
 - Επιμήκυνση στους 72 °C για 15sec
- Τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 10min

B.6 Απομόνωση άμεσης πρωτεΐνες από ιστό της μεσαίας στοιβάδας αορτής με ΑΚΑ και φυσιολογικής.

Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα απομονώθηκε από τη μεσαία στοιβάδα αορτής με ΑΚΑ και φυσιολογικής προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της έκφρασης γονιδίων του ενδιαφέροντος σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Για το σκοπό αυτό, σε ιστό του μεσαίου αορτικού χιτώνα προστίθονταν κάθε φορά αναστολείς πρωτεασών (protease inhibitor cocktail tablets EDTA-free, Roche, Mannheim, Germany), προκειμένου να αποφευχθεί η διάσπαση των κυτταρικών πρωτεϊνών από τις πρωτεάσες που απελευθερώνονται από τα κυτταρικά οργανίδια κατά τη διάλυση των κυττάρων. Έπειτα προστίθονταν κατάλληλη ποσότητα διαλύματος λύσης (lysis buffer) και ακολουθούσε ομογενοποίηση των δειγμάτων.

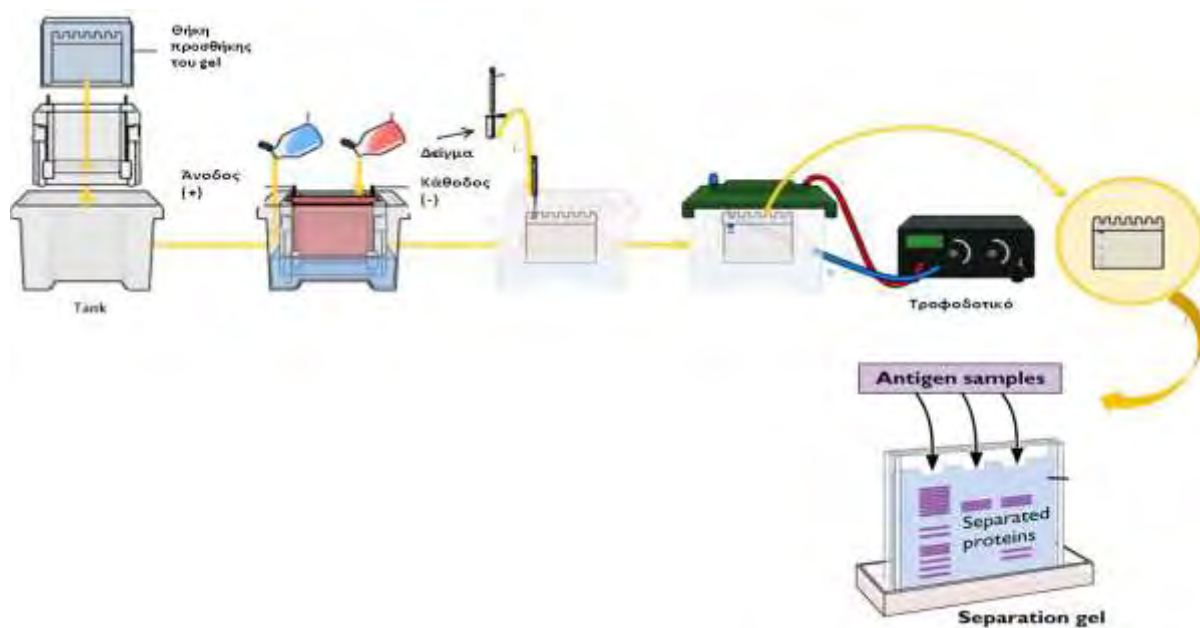
Πιο αναλυτικά τα στάδια της απομόνωσης πρωτεΐνης είναι ως εξής:

- Ξεπάγωμα ιστού μεσαίου αορτικού χιτώνα από τους -80°C .
- Προσθήκη 10-30μl αναστολέων πρωτεασών ανάλογα με το μέγεθος του ιστού.
- Προσθήκη 100-300μl διαλύματος λύσης ανάλογα πάλι με το μέγεθος του ιστού.
- Ομογενοποίηση των δειγμάτων.
- Μηχανική ανάδευση σε vortex και ακόλουθη επώαση των δειγμάτων σε πάγο για 10 λεπτά. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται 3 φορές.
- Φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 15 λεπτά στους 4°C .
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωληνάριο.
- Αποθήκευση των πρωτεϊνικών δειγμάτων στους -80°C .

Ο υπολογισμός της ποσότητας των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν έγινε με τη μέθοδο Bradford, κατά την οποία μια χρωστική (Commassie Brilliant Blue G-25, Bio-Rad Protein Assay), όταν δεσμευτεί σε μια πρωτεΐνη αλλάζει το μέγιστο της απορρόφησης από τα 460nm στα 595nm. Για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών στα δείγματα δημιουργήθηκε αρχικά μια πρότυπη καμπύλη συσχέτισης απορρόφησης και πρωτεϊνικής συγκέντρωσης, με την χρήση δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης πρωτεΐνης. Έπειτα για την ανάλυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων άγνωστης συγκέντρωσης προστέθηκαν 5μl από κάθε δείγμα σε 495μl διάλυμα Bradford, ακολούθησε ήπια ανάδευση των δειγμάτων αρκετές φορές, μεταφορά τους σε κυβέττα και τέλος φωτομέτρηση στα 595nm. Με βάση την πρότυπη καμπύλη που είχε δημιουργηθεί βάση των δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης, προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνικών δειγμάτων.

B.7 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου – SDS

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πρωτεϊνών ανάλογα με το μέγεθός τους. Η διάλυση των πρωτεϊνών σε διάλυμα SDS είναι αυτή που επιτρέπει το διαχωρισμό τους κυρίως βάσει της μάζας τους. Το SDS είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό που καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μια φυσικής πρωτεΐνης. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις κύριες αλυσίδες σε αναλογία ενός μορίου SDS ανά 2 αμινοξέα, προσδίδοντας έτσι στην αποδιατεταγμένη πρωτεΐνη φορτίο ανάλογο της μάζας της. Το αρνητικό φορτίο που αποκτάται με τη δέσμευση του SDS είναι συνήθως πολύ μεγαλύτερο από το φορτίο της φυσικής πρωτεΐνης, καθιστώντας το αρχικό φορτίο αμελητέο. Τα σύμπλοκα SDS-αποδιατεταγμένης πρωτεΐνης ηλεκτροφορούνται σε μια λεπτή κατακόρυφη πλάκα πολυακρυλαμιδίου με κατεύθυνση ροής από επάνω προς τα κάτω (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου

B.7.1. Αποδιάταξη των πρωτεϊνών

Πριν την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται αποδιάταξη αυτών. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκε ήταν 20μg. Το διάλυμα αποδιάταξης περιείχε :

- x μl (20μg) πρωτεϊνικό δείγμα
- 5 μl Sample Buffer
- 2 μl Reducing Buffer
- y μl ddH₂O (μέχρι τελικό όγκο 24μl)

Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε συσκευή PCR για αποδιάταξη των πρωτεϊνών στους 95°C για 5min.

B.7.2. Διαχωρισμός των πρωτεϊνών

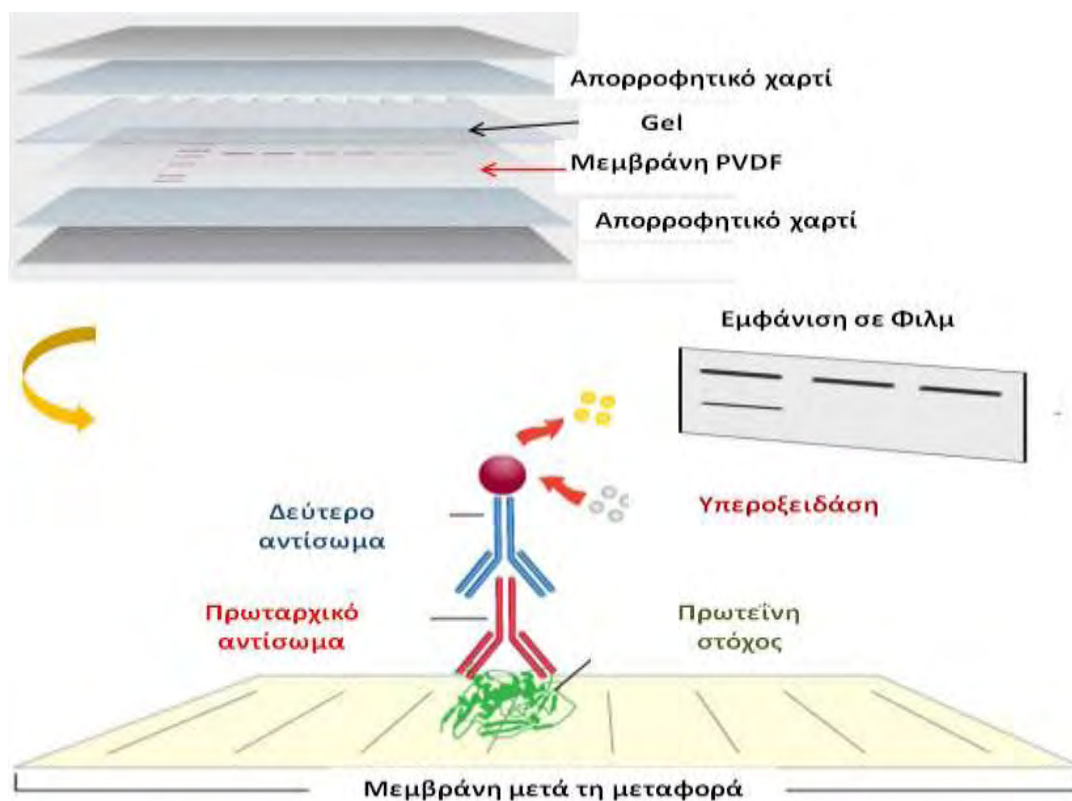
Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών περιλαμβάνει τα κάτωθι στάδια:

- Στήσιμο της συσκευής.
- Προσθήκη 600ml Running Buffer στο μπροστά και πίσω μέρος της συσκευής καθώς επίσης και άλλα 200ml στο μέσω αυτής.
- Τα δείγματα φορτώνονται στην πηκτική. Στη μία άκρη αυτής φορτώνεται μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών.
- Ηλεκτροφόρηση στα 200V και 120mA για 50min.
- Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης προετοιμάζονται τα διαλύματα και τα υλικά που θα χρησιμοποιηθούν στην ανοσοαποτύπωση.

B.1.8 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western (Western Blot)

Η ανοσοαποτύπωση ή αποτύπωση κατά Western επιτρέπει την ανίχνευση μιας μικρής ποσότητας πρωτεΐνης μέσα από ένα πλήθος άλλων πρωτεϊνών. Μετά το διαχωρισμό των πρωτεϊνικών δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική SDS-πολυακρυλαμιδίου ακολουθεί η μεταφορά τους (με αποτύπωση, κυρίως ανοσοαποτύπωση) σε μια επιφάνεια, συνήθως μεμβράνη PVDF (Polybinylidene Fluoride membrane, Millipore, USA), που τις κάνει να αντιδρούν πιο εύκολα με το αντίσωμα που προστίθεται μετά και είναι ειδικό για τις πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν. Το σύμπλοκο αντισώματος-αντιγόνου στην επιφάνεια μπορεί να

ανιχνευτεί με την προσθήκη ενός δεύτερου αντισώματος ειδικού για το πρώτο. Σήμανση του δεύτερου αντισώματος με ραδιενέργεια ή με το ένζυμο υπεροξειδάση της ραπανίδας (Horseradish Peroxidase, HRP) δημιουργεί μια σκοτεινή γραμμή σε φιλμ ακτίνων X (αυτοραδιογραφία), που αντιπροσωπεύει τα επίπεδα της υπό μελέτης πρωτεΐνης (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western

Για τη μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου στην μεμβράνη PVDF με ηλεκτροαποτύπωση ακολουθούνται τα κάτωθι στάδια:

- Η μεμβράνη PVDF επωάζεται για 2min σε μεθανόλη με σκοπό να ενεργοποιηθεί.
- Τα χαρτιά Whitman, η μεμβράνη και το gel επωάζονται σε Transfer Buffer για 10min.
- Κατασκευάζεται το sandwich ως εξής:
 - 2 χαρτάκια Whitman
 - 1 μεμβράνη PVDF
 - Gel
 - 2 χαρτάκια Whitman

- Ακολουθώντας το sandwich μεταφέρεται στην ειδική συσκευή για Semi-dry Transfer.
- Η ηλεκτροαποτύπωση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται στα 15V για 30min.

Μετά το πέρας της μεταφοράς ακολουθεί βάψιμο της μεμβράνης με Ponceau μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες των πρωτεϊνών. Ακολουθούν διαδοχικά ξεπλύματα της μεμβράνης με TBS-T (1 φοράx15min και 3φορέςx5min). Η μεμβράνη μεταφέρεται σε διάλυμα μπλοκαρίσματος 5% (γάλα σε σκόνη διαλυμένο σε TBS-T) ολονύκτια για τον κορεσμό των θέσεων δέσμησης πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος, ώστε να αποφευχθούν μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις του αντισώματος με τη μεμβράνη και κατόπιν έκπλυση 3 φορές με TBS-T για 10min.

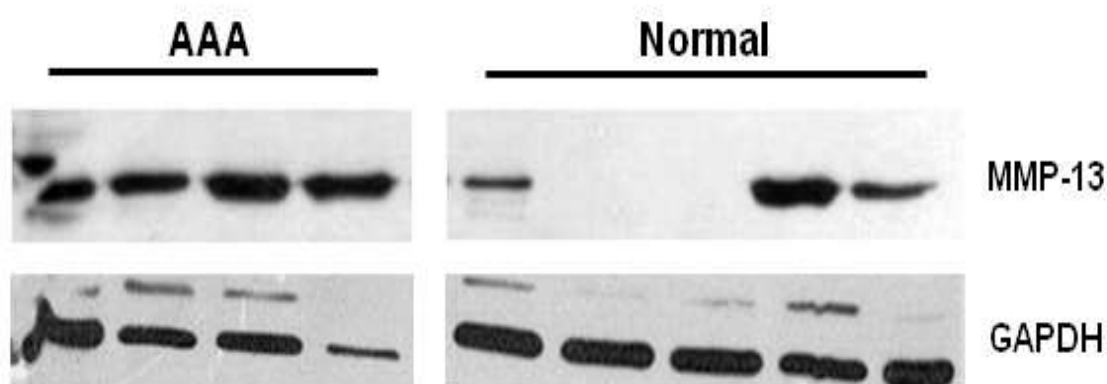
- Έπειτα η μεμβράνη επωάζεται ολονύκτια στους 4°C με το εκάστοτε πρωταρχικό αντίσωμα στην κατάλληλη αραιώση με TBS-T/0.01% Tween 20 με 5%γ γάλα σε σκόνη υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C.
- Απομάκρυνση του πρωταρχικού αντισώματος και έκπλυση της μεμβράνης με TBS-T 3 φορές για 10min, έτσι ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του πρώτου αντισώματος.
- Επώαση της μεμβράνης με το δεύτερο αντίσωμα, συζευγμένο με υπεροξειδάση, που αναγνωρίζει και προσδένεται στο πρώτο αντίσωμα, στην κατάλληλη αραιώση με TBS-T/0.01% Tween 20 με 5%γ γάλα σε σκόνη υπό συνεχή ανάδευση για 1h σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απομάκρυνση του δεύτερου αντισώματος και έκπλυση 3 φορές με TBS-T για 10min.
- Η ανίχνευση γίνεται με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας.

Για την εμφάνιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Η μεμβράνη επώαστηκε για 1min σε 10ml διαλύματος λουμινόλης (1.25mM σε 0.1M Tris-Cl pH=8.5), στο οποίο προστέθηκαν 10μl 3% H₂O₂ και 100μl κουμαρικού οξέος. Η συζευγμένη με το δεύτερο αντίσωμα υπεροξειδάση αντιδρά με το υπεροξείδιο δημιουργώντας ρίζες υπεροξειδίου, οι οποίες αντιδρούν με τον ενισχυτή της χημειοφωταύγειας κουμαρικό οξύ δημιουργώντας ρίζες κουμαρικού οξέος. Αυτές με τη σειρά τους οξειδώνουν τη λουμινόλη σε 3-άμινο-φθαλικό, ουσία η οποία εκπέμπει φως. Στη συνέχεια η μεμβράνη καλύφθηκε με διάφανη μεμβράνη και ακολούθησε έκθεση σε φωτογραφικό φιλμ. Το φιλμ εμφανίστηκε με τα αντιδραστήρια εμφάνισης. Συγκεκριμένα, 3min επώαση στο διάλυμα ανάπτυξης-Kodak και 3min στο διάλυμα σταθεροποίησης-Kodak και 3min στο νερό.

Γ. Αποτελέσματα-Συζήτηση

Γ.1. Αποτελέσματα Western Blot

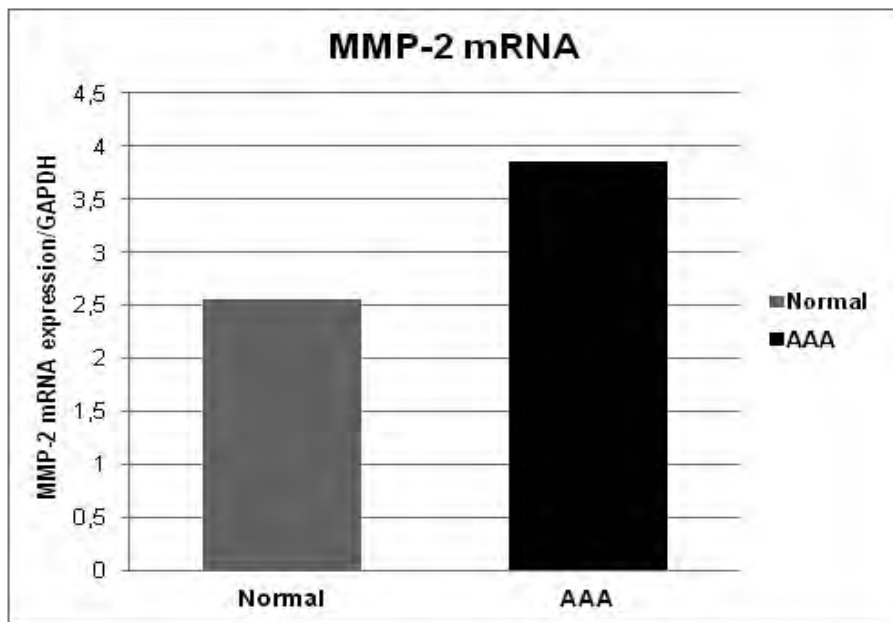
Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του Western blot για την έκφραση της πρωτεΐνης MMP-13 στο μεσαίο χιτώνα του τοιχώματος της κοιλιακής αορτής. Ως πρωτεΐνη αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το GAPDH, που εκφράζεται ισόποσα και στα δείγματα από το ανεύρυσμα και στα φυσιολογικά. Τέλος, παρατηρούμε ότι η MMP-13 είναι αυξημένη στα δείγματα πρωτεΐνης που προέρχονται από ιστό ανευρύσματος κοιλιακής αορτής σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα που σε μερικά δεν εκφράζεται και καθόλου η MMP-13.



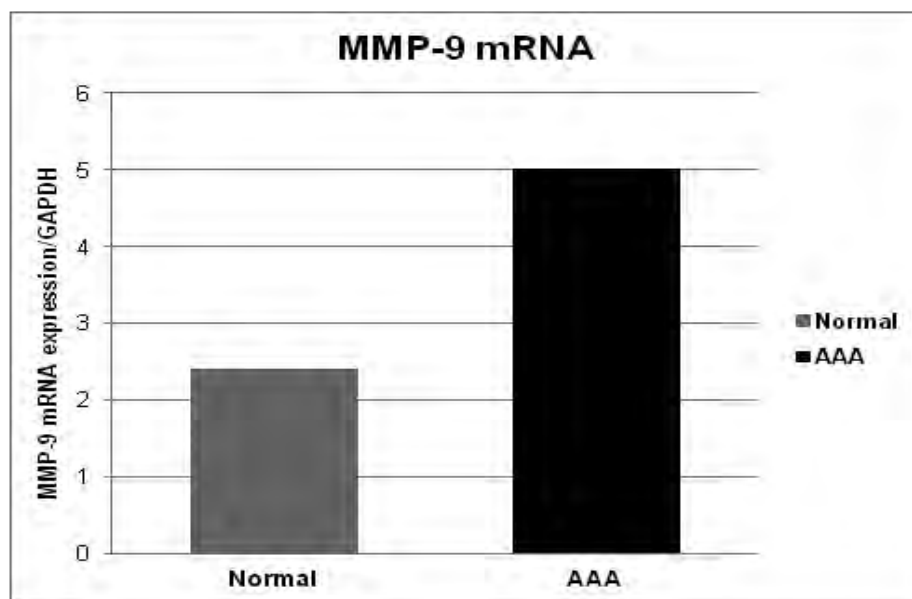
Εικόνα 9: Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης MMP-13 στη μεσαία στοιβάδα αορτικού τοιχώματος από ιστό Ανευρύσματος κοιλιακής αορτής και φυσιολογικής αορτής. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς.

Γ.2. Αποτελέσματα Real-time PCR

Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της Real-time PCR σχετικά με τα επίπεδα έκφρασης των mRNA των γονιδίων MMP-2 και MMP-9. Παρατηρείται ότι η έκφραση τόσο του mRNA της πρωτεΐνης MMP-2 όσο και του mRNA της πρωτεΐνης MMP-9 είναι αυξημένη στα δείγματα από ιστό ανευρύσματος κοιλιακής αορτής σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα.



Εικόνα 10: Επίπεδα έκφρασης της MMP-2 στη μεσαία στοιβάδα φυσιολογικής και ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής



Εικόνα 11: Επίπεδα έκφρασης της MMP-9 στη μεσαία στοιβάδα φυσιολογικής και ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής

Δ. Συζήτηση

Από τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας προκύπτει ότι η έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών είναι αυξημένη στα δείγματα που προέρχονται από ιστό ανευρύσματος κοιλιακής αορτής σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα. Φαίνεται ότι οι μεταλλοπρωτεΐνες έχουν ενεργό ρόλο τόσο στον σχηματισμό του ΑΚΑ όσο και στην περαιτέρω ανάπτυξη του ανευρύσματος μέχρι την ρήξη του. Οι MMP-2, MMP-9 και MMP-13 είναι αυξημένες στο μεσαίο χιτώνα της κοιλιακής αορτής στο ανεύρυσμα, αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αποδόμηση του κολλαγόνου, της ζελατίνης και άλλων ουσιών θεμέλιας ουσίας του μεσαίου χιτώνα. Η αποδόμηση της θεμέλιας ουσίας του μεσαίου χιτώνα οδηγεί και στην απόπτωση λείων μυϊκών κυττάρων από τον μεσαίο χιτώνα. Αυτά έχουν ως συνέπεια την λέπτυνση και την μείωση της δυναμικής του αορτικού τοιχώματος. Έτσι το αορτικό τοίχωμα γίνεται πιο ελαστικό και πιο ευαίσθητο με αποτέλεσμα την αύξηση της διαστολής της κοιλιακής αορτής. Συνεπώς, υπάρχει περαιτέρω ανάπτυξη του ανευρύσματος και αύξηση της διαμέτρου του ώσπου τελικά να έχουμε την ρήξη του ανευρύσματος.

Η αυξημένη έκφραση των MMP-2, MMP-9 και MMP-13 στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής υποστηρίζεται και από άλλες έρευνες υπάρχουν στη μέχρι σήμερα βιβλιογραφία. Σε μία έρευνα που εξετάστηκαν ιστοί υπονεφρικής αορτής που είχαν ληφθεί από χειρουργική αποκατάσταση ΑΚΑ, αποφρακτική νόσο της αορτής, ή από όργανα για μεταμόσχευση (control), έδειξε ότι τα επίπεδα έκφρασης του mRNA της MMP-2 ήταν αυξημένα στους ιστούς του ΑΚΑ σε σχέση με τους άλλους ιστούς. Σε αντίθεση με την MMP-2, τα επίπεδα mRNA της MMP-9 δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ιστών που προέρχονταν από αποφρακτική νόσο και ΑΚΑ, αλλά ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένα σε σχέση με τα επίπεδα των δειγμάτων που συμπεριλήφθησαν στην ομάδα ελέγχου.⁸ Αποτελέσματα που συνηγορούν με αυτά που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία. Μια άλλη μελέτη δείχνει ότι ενεργές μορφές των MMP-2 και MMP-9 είναι αυξημένες στον όρο ασθενών με ΑΚΑ σε σχέση με τον ορό από υγιή άτομα. Στην ίδια έρευνα αναφέρεται ότι η MMP-9 είναι η κύρια MMP που εκφράζεται στον ανευρυσματικό ιστό και παράγεται κυρίως από τα μακροφάγα που έχουν μεταναστεύσει στο ανεύρυσμα, καθώς επίσης αναφέρεται ότι η MMP-9 αποτελεί πιο ισχυρό αναστολέα της αορτικής συστολής σε σχέση με την MMP-2.⁹ Επίσης, μία ακόμη έρευνα του Honserian και συν. δείχνει ότι τα επίπεδα της MMP-9 στο πλάσμα είναι αυξημένα σε ασθενείς με ΑΚΑ σε σχέση με αυτά των υγιών ατόμων και ασθενών με αποφρακτική νόσο της αορτής.¹⁰ Μία επιπλέον έρευνα έδειξε ότι καλλιεργημένα λεία μυϊκά κύτταρα, που προέρχονται από ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής, παράγουν αυξημένα επίπεδα της

MMP-2.¹¹ Ο Freestone και συν. έδειξαν ότι στα μικρού μεγέθους ανευρύσματα κοιλιακής αορτής η MMP-2 είναι άφθονη, κάτι που δείχνει ότι η MMP-2 είναι σημαντική για την γένεση του ανευρύσματος.¹² Σε μια άλλη μελέτη ο McMillan και οι συνεργάτες του βρήκαν ότι, σε αντίθεση με την MMP-2, το mRNA της MMP-9 εκφράζεται υψηλότερα σε ανευρύσματα μεσαίας διαμέτρου από ότι σε μικρότερα. Το στοιχείο αυτό δείχνει ότι η MMP-9 είναι το κύριο πρωτεολυτικό ένζυμο που προάγει την επέκταση και την ρήξη του ανευρύσματος.¹³ Επίπλέον σε έρευνες που έγιναν σε ποντίκια δείχτηκε ότι η στοχευόμενη αποσιώπηση του γονιδίου της MMP-9 καταστέλλει την ανάπτυξη ΑΚΑ στο ποντίκι¹⁴, ενώ σε άλλη έρευνα δείχνετε ότι η MMP-2 και MMP-9 είναι απαραίτητες για την επαγωγή ΑΚΑ σε πειραματικά μοντέλα ποντικών¹⁵.

Σε πείραμα που αφορά την MMP-13 δείχνουν ότι εκφράζεται σταθερά σε ανθρώπους με νόσο του αορτικού ιστού και ότι το mRNA της MMP-13 εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό στο ΑΚΑ σε σχέση με τις άλλες ασθένειες. Κάτι που ίσως υποδεικνύει ότι η MMP-13 είναι ένα σημαντικό μόριο για την παθογένεση του ανευρύσματος.¹⁶ Σε μία άλλη μελέτη για την MMP-13 οι ερευνητές έδειξαν ότι η έκφρασή της ήταν αυξημένη στο ΑΚΑ σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα, ενώ με την χρήση αντισώματος ειδικού για την MMP-13 έδειξαν ότι εντοπίζεται σε όλο το ανευρυσματικό αορτικό τοίχωμα.¹⁷

Συμπερασματικά παρατηρούμε ότι όλες οι έρευνες αναπαράγουν τα αποτελέσματα ότι οι MMP-2, MMP-9 και MMP-13 είναι αυξημένες στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής. Οι MMP-2 και MMP-9 έχουν μελετηθεί καλύτερα και πιο διεξοδικά σε σχέση με τις άλλες μεταλλοπρωτεΐνες για τον ρόλο τους στο ΑΚΑ και φαίνεται να είναι οι κύριες MMPs που εκφράζονται στο ΑΚΑ και οδηγούν στον σχηματισμό του και την περαιτέρω ανάπτυξή του κυρίως μέσω της αποδόμησης που συντελούν στον μεσαίο χιτώνα.

Βιβλιογραφία

1. Nordon IM, Hinchliffe RJ, Loftus IM, Thompson MM. Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Nat Rev Cardiol*. 2011
2. Almahameed A, Latif AA, Graham LM. Managing abdominal aortic aneurysms: treat the aneurysm and the risk factors. *Cleve Clin J Med*. 2005
3. Pugsley MK, Tabrizchi R. The vascular system. An overview of structure and function. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2000
4. Ailawadi G, Eliason JL, Upchurch GR Jr. Current concepts in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*. 2003
5. N Sakalihasan, R Limet, O D Defawe. Abdominal aortic aneurysm. *Lancet* 2005
6. Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol*. 2008
7. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003
8. Davis V, Persidskaia R, Baca-Regen L, Itoh Y, Nagase H, Persidsky Y, Ghorpade A, Baxter BT. Matrix Metalloproteinase-2 Production and Its Binding to the Matrix Are Increased in Abdominal Aortic Aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998
9. Sakalihasan N, Delvenne P, Nusgens BV, Limet R, Lapiere CM. Activated forms of MMP2 and MMP9 in abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 1996
10. Hovsepian DM, Ziporin SJ, Sakurai MK, Lee JK, Curci JA, Thompson RW. Elevated plasma levels of matrix metalloproteinase-9 in patients with abdominal aortic aneurysms: a circulating marker of degenerative aneurysm disease. *J Vasc Interv Radiol*. 2000
11. Crowther M, Goodall S, Jones JL, Bell PR, Thompson MM. Increased matrix metalloproteinase 2 expression in vascular smooth muscle cells cultured from abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 2000
12. Freestone T, Turner RJ, Coady A, Higman DJ, Greenhalgh RM, Powell JT. Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995
13. McMillan WD, Tamarina NA, Cipollone M, Johnson DA, Parker MA, Pearce WH. Size matters: the relationship between MMP-9 expression and aortic diameter. *Circulation* 1997
14. Pyo R, Lee JK, Shipley JM, Curci JA, Mao D, Ziporin SJ, Ennis TL, Shapiro SD, Senior RM, Thompson RW. Targeted gene disruption of matrix

- metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest* 2000
15. Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest* 2002
 16. Mao D, Lee JK, VanVickle SJ, Thompson RW. Expression of collagenase-3 (MMP-13) in human abdominal aortic aneurysms and vascular smooth muscle cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999
 17. Tromp G, Gatalica Z, Skunca M, Berguer R, Siegel T, Kline RA, Kuivaniemi H. Elevated expression of matrix metalloproteinase-13 in abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg.* 2004