



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Πρωτεομική ανάλυση της
ανευρυσματικής ανιούσας θωρακικής
αορτής μη συγγενούς αιτιολογίας για την
ανάδειξη διαγνωστικού δείκτη

Μπούπη Μαρία
Λάρισα 2016

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Δρ. Λεωνίδας Δημήτριος

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δρ. Βουγάζ Κωνσταντίνος

Ειδικός Λειτουργικός Επιστήμων Β' Βαθμίδας στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών
Ερευνών Ακαδημία Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ)

Δρ. Ψαρρά Άννα – Μαρία

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Περιεχόμενα

• Ευχαριστίες	5
• Abstract.....	6
• Περίληψη.....	7
1.Ανιούσα Θωρακική Αορτή.....	8
1.1 Ανατομία Αορτής.....	8
1.2 Ανεύρυσμα.....	10
1.3Ανεύρυσμα θωρακικής Αορτής.....	10
1.4 Κλινική εικόνα και Συμπτώματα	11
1.5 Αίτια	12
2.Βιοδείκτες	13
2.1 Γενετικοί δείκτες.....	13
2.2Παράγοντες φλεγμονώδης αντίδρασης ως Βιοδείκτες	16
2.3 Παράγοντες της εξωκυττάριας ουσίας ως Βιοδείκτες.....	18
2.4 Περισσότεροι δείκτες.....	20
3.Πρωτεομική Ανάλυση.....	21
3.1 Πρωτεομική τεχνολογία.....	21
3.2 Εφαρμογές Πρωτεομικής.....	22
4.Εργαστηριακές Μέθοδοι τεχνικές	24
4.1 Δείγματα.....	24
4.2 Ομεγενοποίηση ιστών.....	25
4.3 Μέτρηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης	25
4.4 Αποδιάταξη πρωτεϊνών	26
4.5 Πέψη των πρωτεϊνών με θρυψίνη	27
4.6 Ισοβαρείς ιχνηθέτες για σχετική και απόλυτη ποσοτικοποίηση (iTRAQ).....	27
4.7 RP-HPLC για την απομόνωση των πεπτιδίων	29
4.8 Nano-LC-ESI—MS/MS ανάλυση πεπτιδίων.....	30
4.9 Βιοπληροφορική ανάλυση	32
5. Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	33

5.1 Πρωτεϊνική συγκέντρωση των δειγμάτων	34
5.2 Χρωματογραφικός καθαρισμός των πεπτιδίων με την χρήση συστήματος RP-HPLC.....	35
5.3 Χρωματογραφικός καθαρισμός των πεπτιδίων με τη χρήση του συστήματος Nano-LC-ESI-MS/MS.....	36
5.4 Ανάλυση διαφορικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών.....	37
5.5 Βιοπληροφορική ανάλυση λειτουργικότητας πρωτεϊνών	42
5.6 Συζήτηση.....	45
6. Βιβλιογραφία	48

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εκπονήθηκε κατά το έτος 2016 στα πλαίσια της συνεργασίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας με το Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών, όπου και πραγματοποιήθηκε.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Δρ. Βουγά Κωνσταντίνο, που δέχτηκε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο ΠΒΕΑΑ και για την πολύπλευρη βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της εργασίας μου. Σε όλη τη διάρκεια της εργασίας μου υπήρξε δίπλα μου τις στιγμές που τον χρειάστηκα προσφέροντάς μου την πολύτιμη βοήθειά του.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της πτυχιακής μου εργασίας κ. Λεωνίδα Δημήτριο, Αναπληρωτή καθηγητή Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας.

Επίσης, θα ήταν μεγάλη παράλειψη να μην ευχαριστήσω τον κ. Ιερομόναχο Κωνσταντίνο, που δέχτηκε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο ΠΒΕΑΑ.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την εξαιρετική συνεργασία και τη δημιουργία ενός πραγματικά φιλικού κλίματος στο εργαστήριο. Νιώθω ιδιαίτερη τιμή που μου δόθηκε η ευκαιρία στα αρχικά αυτά στάδια της δραστηριότητάς μου σε εργαστηριακό χώρο, να γνωρίσω τόσο αξιόλογους ανθρώπους.

Abstract

Aneurysms of the ascending thoracic aorta are important factors of mortality and morbidity in the Western world. For this reason, a major area of research focuses on the diagnosis and prevention of aneurysms, especially in biomarker detection, providing in that way outlets both in early diagnosis and implementation of new methods of treatment. The pathophysiological mechanisms of aneurysms have been tested in various studies using immunohistochemical methods in which specifically preselected antigens were targeted.

In the last decade molecular techniques, including proteomic analysis, are applied in order to analyze protein complexes and to identify all the proteins in a system without prior knowledge of their existence.

This study has applied the technique by taking representative tissue of the wall of the normal ascending thoracic aorta and the wall of the aneurysmatic aorta. Proteins isolated from biological materials, digested with trypsin, separated by HPLC and further analyzed by spectrophotometry. The development of newer techniques of proteomic analysis allows the simultaneous measurement of hundreds of proteins. In this way the identification and quantification of proteins contained in the wall of the ascending thoracic aorta is possible. The main purpose of this study is to reveal new potential biomarkers or pathophysiological mechanisms that are responsible for the development of aneurysms of the ascending thoracic aorta.

Περίληψη

Τα ανευρύσματα της ανιούσας θωρακικής αορτής αποτελούν σημαντικούς παράγοντες θανάτου και νοσηρότητας στον Δυτικό κόσμο. Για τον λόγο αυτό η διάγνωση και η πρόληψη των ανευρυσμάτων αποτελούν ένα ιδιαίτερο πεδίο έρευνας, ειδικά στον τομέα εντοπισμού βιοδεικτών προσφέροντας ταυτόχρονα διεξόδους τόσο στη έγκαιρη διάγνωση όσο και στην εφαρμογή νέων μεθόδων θεραπείας. Οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί δημιουργίας των ανευρυσμάτων έχουν ελεγχθεί σε διάφορες μελέτες με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους όπου στοχοποιήθηκαν συγκεκριμένα προεπιλεγμένα αντιγόνα.

Την τελευταία δεκαετία μοριακές τεχνικές, μεταξύ των οποίων και η πρωτεομική ανάλυση, εφαρμόζονται με στόχο την ανάλυση πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων και την αναγνώριση όλων των σχετικών πρωτεϊνών εντός ενός συστήματος χωρίς προηγούμενη γνώση της ύπαρξής τους.

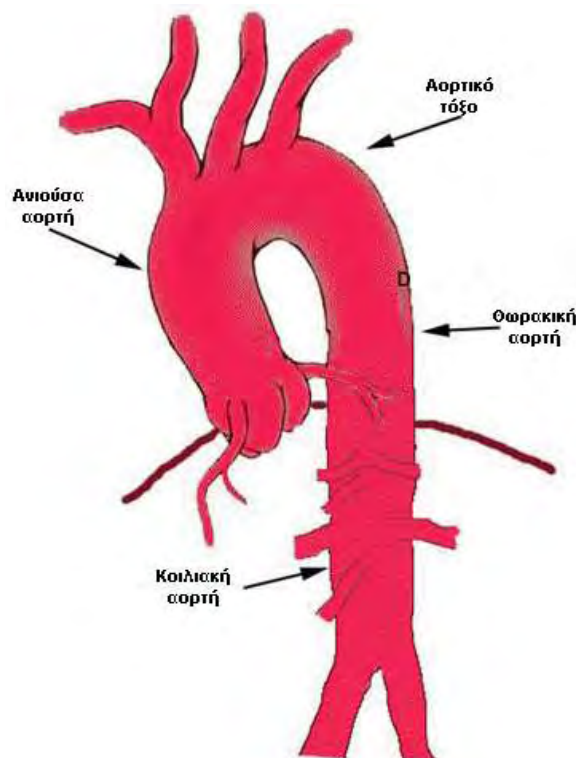
Στην παρούσα μελέτη εφαρμόσθηκε η τεχνική της λήψης αντιπροσωπευτικού ιστού από το τοίχωμα της φυσιολογικής ανιούσας θωρακικής αορτής και το τοίχωμα της ανευρυσματικής αορτής. Οι πρωτεΐνες που απομονώθηκαν από το βιολογικό υλικό, διασπάσθηκαν με τη χρήση της θρυψίνης, διαχωρίστηκαν με HPLC και αναλύθηκαν περαιτέρω με φασματομετρία. Η εξέλιξη νεότερων τεχνικών πρωτεομικής ανάλυσης επιτρέπει την ταυτόχρονη μέτρηση εκατοντάδων πρωτεϊνών. Με αυτό τον τρόπο επιτεύχθηκε η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών που περιέχονται στο τοίχωμα της ανιούσας θωρακικής αορτής. Απώτερο στόχο της μελέτης αποτέλεσε η ανάδειξη νέων βιοδεικτών ή παθοφυσιολογικών μηχανισμών ανάπτυξης ανευρυσμάτων της ανιούσας θωρακικής αορτής.

Εισαγωγή

1. Ανιούσα Θωρακική Αορτή

1.1 Ανατομία Αορτής

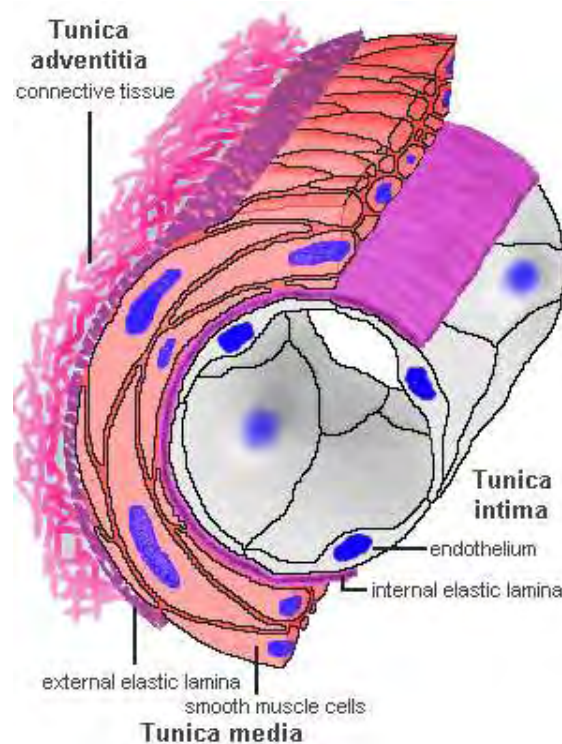
Η αορτή είναι η μεγαλύτερη αρτηρία στον ανθρώπινο οργανισμό, αποτελεί ένα αιμοφόρο αγγείο που μεταφέρει πλούσιο σε οξυγόνο αίμα. Η συγκεκριμένη αρτηρία εκτείνεται από την καρδιά, μέσω του θώρακα και της κοιλιάς ως τα κάτω άκρα και διαιρείται σε αγγεία που τροφοδοτούν με αίμα τα χέρια, πόδια, κάθε όργανο συμπεριλαμβανομένου και του εγκεφάλου μας. Στην ουσία αποτελεί ένα αυτοτελές όργανο με τη δική του πολύπλοκη ιδιαίτερη βιολογία και εξεζητημένες μηχανικές ιδιότητες. Στην πραγματικότητα συνεργάζεται με την αριστερή κοιλία της καρδιάς ώστε να καθορίσει τον όγκο παλμού. Η χάλαση και η σύσπαση της αορτής αυξάνει την αιμοδυναμική λειτουργία της αριστερής κοιλιάς της καρδιάς.¹



Εικόνα 1 Αορτή

Όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα, η αορτή χωρίζεται σε δύο μεγάλα τμήματα, τη θωρακική αορτή που βρίσκεται στη θωρακική κοιλότητα και την κοιλιακή αορτή εντός της κοιλίας. Η θωρακική αορτή διαιρείται σε τρία τμήματα, την ανιούσα αορτή, το αορτικό τόξο και την κατιούσα αορτή (εικόνα 1). Η ανιούσα αορτή αρχίζει από την αορτική βαλβίδα και κατευθύνεται προς τα πάνω για μήκος 5 cm, περιέχεται εντός του περικαρδίου σε άμεση γειτνίαση με την πνευμονική αρτηρία. Η μέση φυσιολογική διάμετρός της στον ενήλικα είναι 3 cm.¹

Τα τοιχώματα των αγγείων είναι πολύ ελαστικά. Για να προσαρμόζονται στις ανάγκες της ροής του αίματος, που παρέχεται κατευθείαν από τον καρδιακό μυ μπορούν κανονικά να εκτείνονται και να επανέρχονται πίσω στην αρχική τους θέση. Το τοίχωμά της αορτής αποτελείται από 3 χιτώνες (στιβάδες). Συγκεκριμένα από έσω προς τα έξω αποτελείται από: 1) ένα λεπτό στρώμα, τον έσω χιτώνα, που αποτελείται από ένα μονό στρώμα ενδοθηλιακών κυττάρων που εδράζονται στη βασική μεμβράνη που αποτελεί το έσω ελαστικό πέταλο, 2) ένα παχύ στρώμα, τον μέσο χιτώνα, πρόκειται για το παχύτερο στρώμα του αορτικού τοιχώματος και η βασική του μονάδα είναι η ελαστική μονάδα, η οποία αποτελείται από δύο ελαστικά πέταλα τα οποία περικλείουν λεία μυϊκά κύτταρα, κολλαγόνο και άμορφη θεμέλια ουσία και 3) ένα λεπτό εξωτερικό στρώμα, τον έξω χιτώνα, που αποτελείται κυρίως από ίνες κολλαγόνου και άλλα κύτταρα του συνδετικού ιστού (εικόνα 2).¹



Εικόνα 2 Οι τρεις χιτώνες των τοιχωμάτων των αγγείων

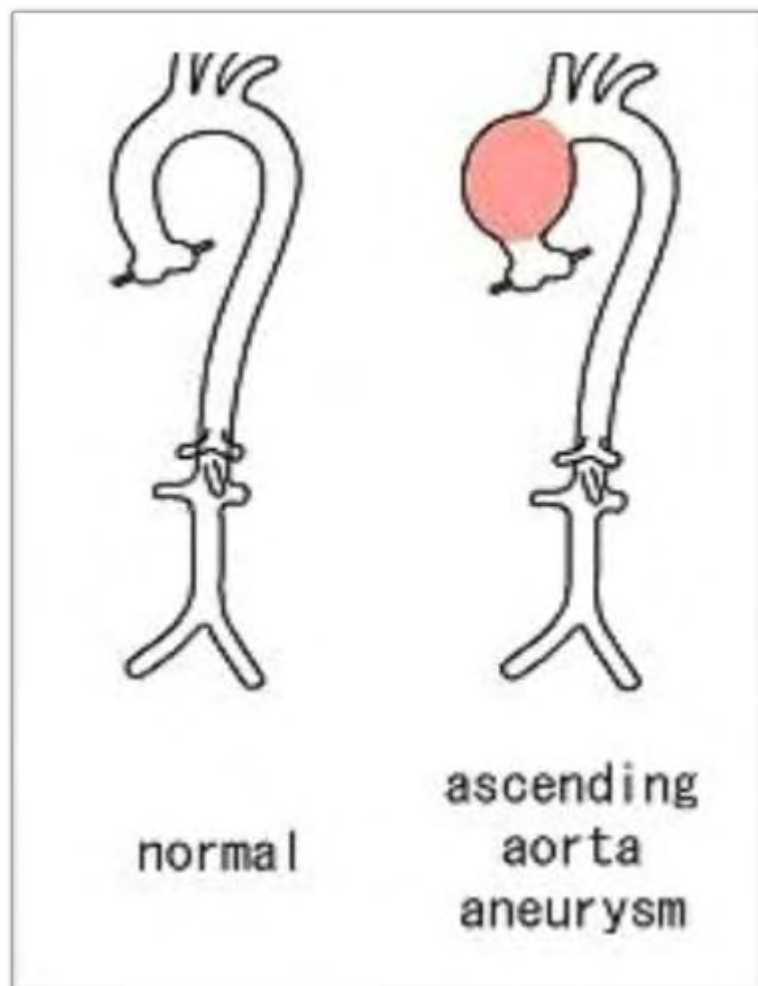
1.2 Ανεύρυσμα

Το ανεύρυσμα μπορεί να εκδηλώνεται σε οποιοδήποτε τμήμα της αορτής. Το ανεύρυσμα είναι μια διόγκωση στην αορτή, το οποίο εμφανίζεται όταν το τοίχωμα του αγγείου αποδυναμωθεί. Ένας πιο ακριβής ορισμός του ανευρύσματος αναφέρεται στο ότι η διάμετρος του προσβεβλημένου τμήματος της αορτής θα πρέπει να είναι το 150% της αναμενόμενης φυσιολογικής. Η πίεση αίματος είναι αυτή που ωθεί το τοίχωμα της αορτής στο να διογκωθεί. Η σοβαρότητα του ανευρύσματος εξαρτάται μεταξύ άλλων από τη διάμετρο της διόγκωσης και το μήκος της έκτασης της αορτής που καταλαμβάνει. Η αδυναμία του τοιχώματος που προκύπτει στο ανεύρυσμα δημιουργεί κίνδυνο ρήξης της αρτηρίας. Τέτοιου είδους ρήξη οδηγεί σε μη αναστρέψιμη αιμορραγία, που απειλεί άμεσα τη ζωή. Εκτός από τη ρήξη του ανευρύσματος υπάρχει και ο κίνδυνος δημιουργίας θρόμβων στο ανεύρυσμα. Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες και ασθένειες, που αδυνατίζουν τα τοιχώματα της αορτής. Οι καταστάσεις αυτές ταυτόχρονα με την αύξηση της ηλικίας φθείρουν και αδυνατίζουν την αορτή. Το αποτέλεσμα είναι ένα μέρος της αορτής να υφίσταται μόνιμη διάταση, δηλαδή ανεύρυσμα. ²

1.3 Ανευρύσματα θωρακικής αορτής

Τα ανευρύσματα της θωρακικής αορτής αποτελούν μία παθολογική εξεργασία η οποία συνοδεύεται από αυξημένη νοσηρότητα και θνητότητα λόγω του αυξημένου δυνητικού κινδύνου οξέος διαχωρισμού ή ρήξεως του αορτικού τοιχώματος. Τα ανευρύσματα της ανιούσας θωρακικής αορτής μπορεί να εκτείνονται έως το αορτικό τόξο και αποτελούν μία ξεχωριστή νόσο σε σχέση με τα ανευρύσματα της κατιούσας θωρακικής και κοιλιακής αορτής (εικόνα 3). Η παρακολούθηση της προόδου της νόσου από τον κλινικό ιατρό αποτελεί μία πραγματική πρόκληση λόγω της απρόβλεπτης και πολλές φορές σιωπηλής εξέλιξης η οποία απαιτεί στις περισσότερες περιπτώσεις μείζονες επεμβατικές μεθόδους που με τη σειρά τους συνδέονται και αυτές με υψηλά ποσοστά νοσηρότητας και θνητότητας. Η γνώση όσον αφορά στους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς ανάπτυξης των ανευρυσμάτων δεν είναι ολοκληρωμένη κυρίως λόγω της αλληλοεπίδρασης πολλαπλών αιτιολογικών παραγόντων στον αορτικό ιστό. Οι αδυναμίες και οι ατέλειες των απεικονιστικών μεθόδων, η γεωμετρική πολυπλοκότητα, αλλά και η εμφάνιση αορτικού διαχωρισμού σε μεγέθη μικρότερα, από τα συνήθη προτεινόμενα για

χειρουργική αντιμετώπιση, αναδεικνύουν την ανάγκη για μία πιο έγκαιρη και περισσότερο αξιόπιστη τεχνική διάγνωσης της πάθησης.³



Εικόνα 3 Φυσιολογική αορτή και ανευρσματική ανιούσα θωρακική αορτή

1.4 Κλινική εικόνα και Συμπτώματα

Δυστυχώς, η συντριπτική πλειοψηφία των ανευρσμάτων της θωρακικής αορτής παραμένει σιωπηλή, με τη ρήξη να αποτελεί σε πολλές περιπτώσεις το πρώτο σύμπτωμα. Μόνο ένα 5-10% των ασθενών βιώνουν συμπτώματα που προέρχονται από τα ανευρύσματά τους και θα βοηθήσουν στην πρόωμη διάγνυσή τους. Ο πόνος από την ανιούσα αορτή γίνεται κυρίως αντιληπτός οπισθοσθερνικά. Ο πόνος που οφείλεται σε ανεύρσμα είναι συχνά δύσκολο να διαχωριστεί από άλλου είδους

πόνους. Εκατομμύρια ασθενών υποφέρουν από πόνο στην πλάτη, αλλά μόνο ο πόνος του ανευρύσματος είναι κατά κανόνα ανεξάρτητος από τη θέση του σώματος και τη φυσική δραστηριότητα. Τα ανευρύσματα της ανιούσας θωρακικής αορτής μπορεί να προκαλέσουν καρδιακή ανεπάρκεια. Επίσης, τα ανευρύσματα της ανιούσας θωρακικής αορτής μπορεί να παραμορφώσουν ή και να αποφράξουν την τραχεία προκαλώντας συμπτώματα από το αναπνευστικό σύστημα, όπως βήχας και δύσπνοια. Πιο σπάνια μπορεί να εμφανίζονται συμπτώματα λόγω της συμπίεσης της άνω κοίλης φλέβας.⁴

1.5 Αίτια

Τα ανευρύσματα της θωρακικής αορτής και οι αορτικοί διαχωρισμοί αποτελούν σημαντικούς παράγοντες θνητότητας και νοσηρότητας στις ανεπτυγμένες χώρες του Δυτικού κόσμου. Κυριότερα αίτια θεωρούνται η εκφύλιση/αθηρωμάτωση του τοιχώματος και η γενετική προδιάθεση. Είναι χαρακτηριστικό πως >20% των ασθενών με ανεύρυσμα της ανιούσας θωρακικής αορτής έχουν έναν πρώτου βαθμού συγγενή με την ίδια πάθηση. Λιγότερο συχνά αίτια αποτελούν η φλεγμονή/λοιμώξεις και το τραύμα. Το κυριότερο πρόβλημα που αντιμετωπίζει ο κλινικός ιατρός είναι το γεγονός πως η διάγνωση συνήθως βασίζεται σε απεικονιστικές μεθόδους που διενεργούνται για μη σχετικές παθήσεις. Σε άλλη περίπτωση, όπως αναλύθηκε παραπάνω, η εξέλιξη της νόσου είναι κλινικά σιωπηλή μέχρι την εκδήλωση καταστροφικών επιπλοκών που συνήθως εκφράζονται με ρήξη ή διαχωρισμό της θωρακικής αορτής, απειλώντας όχι μόνο τη ζωή του ασθενή αλλά προκαλώντας συχνά σοβαρή και χρόνια αναπηρία. Για τους λόγους αυτούς η έγκαιρη πρόβλεψη και πρόληψη της νόσου αποτελούν κρίσιμα στοιχεία των μελετών που διενεργούνται στον τομέα αυτό. Στα πλαίσια αυτά, ο ρόλος των βιοδεικτών στο ανεύρυσμα της ανιούσας θωρακικής αορτής αλλά και η χρήση τους σε έναν συστηματικό προληπτικό έλεγχο και μία περιοδική παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου αποτελούν αντικείμενο διαρκούς έρευνας.⁵

2. Βιοδείκτες

Ο επίσημος ορισμός της έννοιας του βιοδείκτη σχετίζεται με οποιαδήποτε μετρίσιμη παράμετρο ενός βιολογικού δείγματος, η οποία μπορεί να συσχετιστεί ή να αποτελέσει αληθή μάρτυρα μίας βιολογικής κατάστασης. Στην κλινική χημεία, οι βιοδείκτες σχετίζονται αποκλειστικά με την έγκυρη διάγνωση και την παρακολούθηση των διάφορων ασθενειών. Τα βασικά χαρακτηριστικά ενός βιοδείκτη περιγράφονται με δύο έννοιες, την ευαισθησία (sensitivity) και την ειδικότητα ή ακρίβεια (specificity). Και οι δύο αυτές έννοιες εμπεριέχουν την κλινική αξία της διαγνωστικής παραμέτρου, καθώς η ευαισθησία έχει να κάνει με την δυνατότητα του δείκτη να ανιχνεύει τη νόσο σε ένα πληθυσμό πασχόντων από αυτή, ενώ η ειδικότητα σχετίζεται με την ιδιότητα του δείκτη να ανιχνεύει τη συγκεκριμένη παθολογική κατάσταση σε ένα πληθυσμό ασθενών από διάφορες ασθένειες.⁶

Στους διάφορους υπό μελέτη βιοδείκτες, σχετικά με το ανεύρυσμα της ανιούσας θωρακικής αορτής, περιλαμβάνονται κάποιοι ήδη αναγνωρισμένοι και κάποιοι σε διαδικασία ανάδειξης. Διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με την πιθανή αιτία πρόκλησης της ανευρυσματικής διάτασης.

2.1 Γενετικοί δείκτες

Στους γενετικούς δείκτες περιλαμβάνονται ο TGF-β1 και η φμπριλλίνη -1, των οποίων η αυξημένη έκφραση προκαλεί αποδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας συμβάλλοντας στην εμφάνιση τόσο σποραδικών ανευρυσμάτων της θωρακικής αορτής όσο και διαχωρισμών της αορτής, ενώ ενοχοποιούνται και στην εξέλιξη της νόσου σε οικογενείς συνδρομικές μορφές όπως το Marfan και το Loeys-Dietz. Πιο συγκεκριμένα ανακαλύφθηκε ότι το σύνδρομο Marfan, μια κατάσταση που συνδέεται με την ανάπτυξη ανευρύσματος, προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο της φμπριλλίνης -1, μια γλυκοπρωτεΐνη που αποτελεί ουσιώδες συστατικό του συνδετικού ιστού. Οι αλλοιώσεις γονιδίου φμπριλλίνη -1 αναγνωρίστηκαν και σε ασθενείς χωρίς το σύνδρομο Marfan. Επίσης, αναγνωρίστηκαν πολλές άλλες αλλοιώσεις γονιδίων όπως π.χ. 3p24-25, 5q13-14 και 11q23-2-24. Αρκετές γενετικές παραλλαγές έχουν συσχετισθεί με την ανάπτυξη του ανευρύσματος της θωρακικής αορτής, και έχει καταστεί σαφές ότι δυσλειτουργία σε ένα ή περισσότερα συστατικά του αορτικού

τοιχώματος, κυρίως στο επίπεδο του έσω χιτώνα, οδηγεί τελικά σε ανεύρυσμα και τις επιπλοκές που το ακολουθούν. Ο TGF - β είναι ένας αυξητικός παράγοντας που επιδρά στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω μεμβρανικών υποδοχέων (τύπους υποδοχέων TGF- β I και II). Η σύνδεση TGF - β 1 με τους υποδοχείς του, προκαλεί τη φωσφορυλίωση μιας οικογένειας πρωτεϊνών που μετάγει σήματα από τους υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων στον πυρήνα, όπου ρυθμίζουν τη μεταγραφή του γονιδίου TGF - β και επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη διαφοροποίηση και τον κυτταρικό θάνατο. Η αυξημένη δραστηριότητα του TGF- β 1, η οποία οδηγεί σε αύξηση της αποικοδόμησης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, οφείλεται σε ενισχυμένη παραγωγή ενεργοποιητών πλασμινογόνου και προωθεί την αποδυνάμωση του αορτικού τοιχώματος (Εικόνα 4) και την ανάπτυξη ανευρύσματος. Αυτό μπορεί να ενισχυθεί περαιτέρω από την αυξημένη δραστηριότητα της μεταλλοπρωτεϊνάσης (MMP) -2, τουλάχιστον σε ζωικά μοντέλα.⁵



Εικόνα 4 Πολύ εμφανής λέπτυνση του τοιχώματος της ανευρυσματικής ανιούσας αορτής

Στους υπό μελέτη γενετικούς δείκτες περιλαμβάνονται η φιβουλίνη -4, η θρομβοσπονδίνη -2 και η φιλαμίνη Α (εικόνα 5). Οι φιβουλίνες, που αποτελούν μια οικογένεια πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας, είναι απαραίτητες για τη συναρμολόγηση των ελαστικών ινών και τη σύνδεση της ελαστίνης στα λεία μυϊκά κύτταρα. Είναι ενδιαφέρον ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο EFEMP -2 που επηρεάζουν τη σταθερότητα ή την παραγωγή φιβουλίνης 4 συνδέονται στενά με πολύ πρόωμη εμφάνιση ανευρυσμάτων της θωρακικής αορτής. Επίσης, η δημιουργία ανευρύσματος στη θωρακική αορτή μπορεί να προωθηθεί από γενετικές μεταλλάξεις στη θρομβοσπονδίνη - 2, μια γλυκοπρωτεΐνη που μεσολαβεί στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρου και εξωκυττάριας ουσίας, αναστέλλει την ανάπτυξη του όγκου και την αγγειογένεση και ελέγχει την έκφραση της MMP- 2. Σχετικά με τις ενδοκυττάριας δομικές πρωτεΐνες, γενετικές μεταλλάξεις στις φιλαμίνες, μια κατηγορία ενδοκυττάριας πρωτεϊνών που φέρουν δύο νημάτια ακτίνης σταθεροποιώντας τα δίκτυα ακτίνης στο κύτταρο και συνδέοντας τα με την κυτταρική μεμβράνη, μπορεί να παίζει ένα ρόλο στην ανάπτυξη ανευρύσματος. Μέχρι σήμερα, γενετικές μεταλλάξεις στη φιλαμίνη Α έχουν συσχετιστεί με το ανεύρυσμα στο Ehlers-Danlos σύνδρομο. Ωστόσο, μια πρόσφατη πρωτεομική μελέτη που εκπονήθηκε σε ανεύρυσμα ανιούσας αορτής κατά το χρόνο της χειρουργικής επέμβασης έχει δείξει αυξημένο κατακερματισμό φιλαμίνης Α σε ασθενείς που πάσχουν από το σύνδρομο Marfan, προσφέροντας πρόσθετη απόδειξη ότι, στο εγγύς μέλλον, η φιλαμίνη Α θα μπορούσε να αποτελέσει έναν αξιόπιστο δείκτη για την έγκαιρη διάγνωση καρδιαγγειακών παθήσεων.⁵

Γονίδιο	Χρωμόσωμα	Σύνδρομο	Πρωτεΐνη	Τμήμα αορτής
EFEMP2	11q13	Aortic and arterial aneurysm	Fibulin-4	Ascending aorta
FLNA	Xq28	Vascular type Ehlers-Danlos	Filamin-A	Thoracic aorta

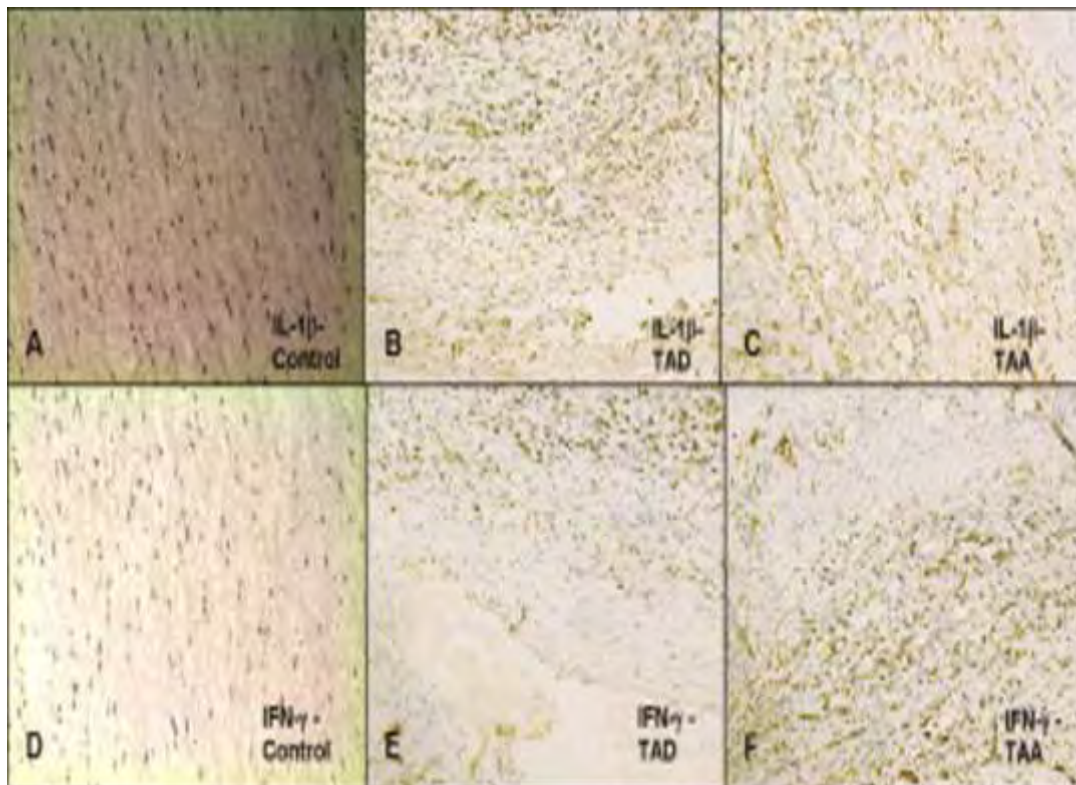
SMAD3	15q22.33	Aneurysm- osteoarthritis	Member of the TGF-β pathway	Ascending aorta
THBS2	6q27	Sporadic Thoracic aorta aneurysm	Thrombospondin 2	Thoracic aorta

Εικόνα 5 Σύνοψη των υπό μελέτη γενετικών δεικτών

2.2 Παράγοντες φλεγμονώδης αντίδρασης ως Βιοδείκτες

Η φλεγμονώδης εξεργασία, που έχει επίσης ενοχοποιηθεί ως γενεσιουργός αιτία δημιουργίας ανευρυσμάτων πιθανότατα μέσω μιας φλεγμονώδης εξεργασίας των τοιχωμάτων της ανιούσας αορτής, περιλαμβάνει έναν μηχανισμό διήθησης του έξω και του μέσου χιτώνα του τοιχώματος της αορτής από T και B λεμφοκύτταρα, μακροφάγα καθώς και τα προϊόντα τους, ιντερφερόνη γ, παράγοντες νέκρωσης-β (TNF-β), φετουίνη, ιντερλευκίνη 1β,-4,-6, κυστεινική πρωτεάση, TIMPS -1,-4 [20], MPO (μυελοπεροξειδάση), μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs -1, -2, -8, -9, -12 και -14) και τελικά την αποδόμηση του εξωκυττάριου ιστού.⁵

Οι κυττοκίνες που συμβάλλουν στην καταστροφή πρωτεϊνών της θεμέλιας εξωκυττάριας ουσίας του μέσου χιτώνα περιλαμβάνουν την ιντερλευκίνη (IL) -1β, IL-6 και ιντερφερόνη (INF) -γ. Μελέτες έχουν δείξει ότι μερικές κυττοκίνες, όπως η IL -6 μπορεί να αυξηθεί σε αορτικά ανευρύσματα. Αυτές οι τελευταίες μελέτες, ωστόσο, περιορίζονται από το γεγονός ότι διεξήχθησαν σε μία ομάδα αποτελούμενη από ασθενείς ίδιας εθνικότητας, από το μέγεθος του δείγματος και από την μη ένταξη ομάδας ελέγχου. Η διεξαγωγή επιπλέον πειραμάτων θα μπορούσαν να την καθιερώσουν ως έναν υποψήφιο προγνωστικό δείκτη αορτικών ανευρυσμάτων. Διάφορες μελέτες προτείνουν ότι, εντός του ανευρυσματικού θωρακικού αρτηριακού τοιχώματος, υπάρχει μια υπερέκφραση των κυττοκινών, συγκεκριμένα της IL-1β, και της INF -γ και ότι η έκφραση της IL-1β είναι μεγαλύτερη σε ανευρύσματα ανιούσας αορτής σε σχέση με αορτικούς διαχωρισμούς (εικόνα 6).⁷



Εικόνα 6 Ανοσοϊστοχημική χρώση της IL-1β και της INF-γ

Η C – αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) αποτελεί αντικείμενο μελέτης για τη χρήση της ως βιοδείκτης. Η CRP παράγεται από το ήπαρ και τα λιποκύτταρα σαν αντίδραση στη φλεγμονή, είναι οξειάς φάσης πρωτεΐνη και ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών των πεντραξινών. Τα επίπεδά της στο αίμα ανεβαίνουν σημαντικά κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδης αντίδρασης όπως π.χ. σε λοίμωξη, σε τραυματισμούς ιστών ή σε αυτοάνοσες νόσους. Η παραγωγή της γίνεται από την επίδραση της IL-6 και με τη συνεργό δράση της IL-1 στα ηπατικά κύτταρα. Οι IL-6 και IL-1 παράγονται κυρίως από τα μακροφάγα κύτταρα. Συνδέεται με υποδοχείς κυττάρων οι οποίοι εμφανίζονται μετά από την καταστροφή του ιστού ή με υποδοχείς φωσφοχολίνης των παθογόνων βακτηρίων με σκοπό την ενεργοποίηση της φαγοκυττάρωσης και του συμπληρώματος. Η CRP αυξάνεται δραματικά σε οξεία φλεγμονή. Αυξάνεται μέσα σε διάστημα 6 ωρών και η μέγιστη τιμή της επιτυγχάνεται μετά από 48 ώρες. Τα επίπεδα στο αίμα εξαρτώνται από το ρυθμό παραγωγής της άρα και από τη σοβαρότητα του παθογόνου παράγοντα. Η CRP χρησιμοποιείται σαν δείκτης φλεγμονής. Σε διάφορες νόσους ένα ή δύο αμινοξέα απελευθερώνονται και αφήνουν κενές θέσεις στο μόριο της CRP χωρίς να επηρεάζεται η δράση της. Ο τρόπος πρόσθεσης των σακχάρων είναι διαφορετικός σε κάθε νόσο αλλά είναι ο ίδιος

ανάμεσα στους ασθενείς με την ίδια νόσο. Στην περίπτωση του ανευρύσματος της ανιούσας αορτής δεν έχει διευκρινισθεί αν η αύξηση των επιπέδων της CRP ξεκινάει προ της επιπλοκής ή αποτελεί απόρροια αυτής. Σε προηγούμενες μελέτες σημαντικός αριθμός ασθενών παρουσίασε σχεδόν φυσιολογικά επίπεδα CRP κατά την εισαγωγή του σε νοσοκομείο, ενώ σε νεότερες αναφέρεται σημαντική αύξηση μέσα σε λίγες ώρες από την εμφάνιση των συμπτωμάτων. Όλα αυτά σε συνδυασμό με την δυσκολία στη διαφοροδιάγνωση μεταξύ του οξέος διαχωρισμού και άλλων οξέων καρδιαγγειακών επεισοδίων, όπως η πνευμονική εμβολή και το έμφραγμα του μυοκαρδίου έχουν περιορίσει σημαντικά την πρακτική χρήση της CRP ως δείκτη για διαγνωστικούς σκοπούς.^{5, 8}

2.3 Παράγοντες της εξωκυττάριας ουσίας ως Βιοδείκτες

Η εξωκυττάρια ουσία συνεισφέρει στη δύναμη και την αντοχή της αορτής στην πίεση του αίματος. Το αορτικό τοίχωμα έχει άφθονο περιεχόμενο σε ελαστίνη, κολλαγόνο τύπου I, III, IV, V, VI, φμπρονεκτίνης, φμπριλίνη-1 και πρωτεογλυκάνες. Η συχνότητα εμφάνισης ανευρυσμάτων θωρακικής αορτής και αορτικών συνδρόμων αυξάνεται με την ηλικία, πιθανώς επειδή οι ίνες ελαστίνης εκφυλίζονται, αλλάζει η δομή τους και μειώνεται σχετικά η συγκέντρωσή τους, ενώ οι ίνες κολλαγόνου αυξάνονται.⁵

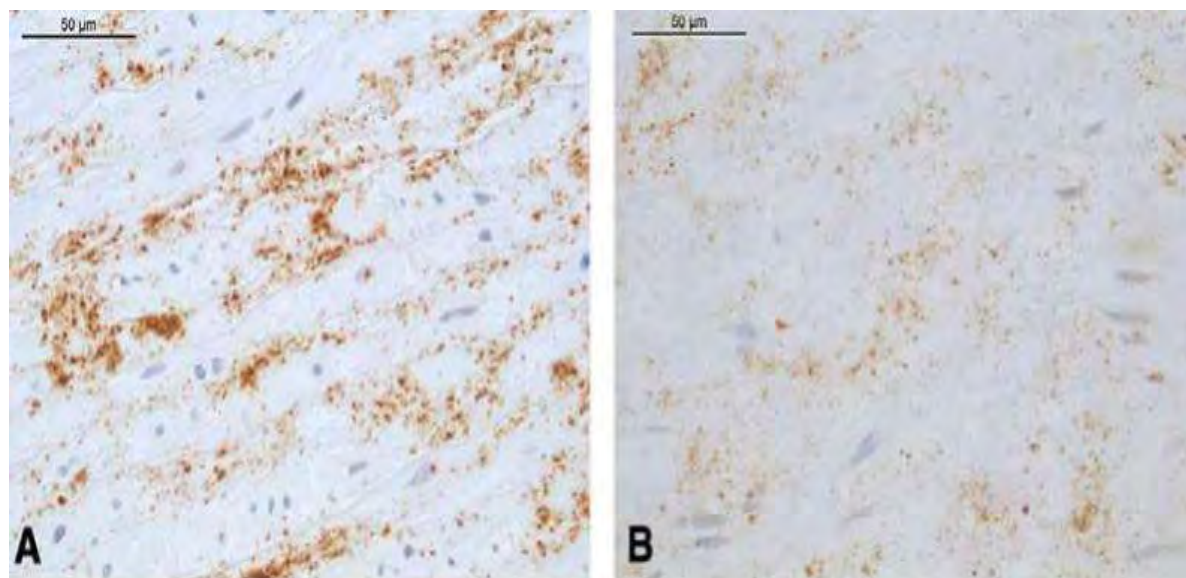
Περισσότερες πληροφορίες είναι διαθέσιμες για ένζυμα, των οποίων ο κύριος ρόλος είναι η αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας, κυρίως MMPs και των ιστικών αναστολέων τους (TIMPs). Αυτά τα ένζυμα παραμένουν φυσιολογικά αδρανοποιημένα και ελέγχονται από τους ιστικούς αναστολείς. Γίνεται αντιληπτό πώς αυξημένη δραστηριότητα των παραπάνω ενζύμων μπορεί να αποδυναμώσει σημαντικά το αορτικό τοίχωμα, ευνοώντας κατά αυτό τον τρόπο την ανάπτυξη ανευρυσμάτων της θωρακικής αορτής. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η περιεκτικότητα σε MMPs σε παθολογικές αορτές, και ανευρύσματα και διαχωρισμούς, είναι αυξημένη σε σχέση με τις φυσιολογικές αορτές, και αυτό έχει πρόσφατα μελετηθεί σε βάθος. Ένα παράδειγμα αποτελούν οι MMP-2 (ζελατινάση A) και MMP-9 (ζελατινάση B) που αυξάνονται, και η αύξηση αυτή είναι υψηλότερη στην περίπτωση οξέος διαχωρισμού της αορτής σε σχέση με τα ανευρύσματα. Βέβαια υπάρχουν διαφορές στην έκφραση των MMP ανάλογα με: (i) τα αίτια που οδηγούν στη δημιουργία των ανευρυσμάτων

(ii) τη θέση του ανευρύσματος (ανιούσα ή κατιούσα θωρακική αορτή), (iii) την παρουσία τριγλώχινας βαλβίδας, (iv) το μέγεθος του ανευρύσματος, με τη συγκέντρωση των MMPs να αυξάνει σε ανευρύσματα μεγαλύτερου μεγέθους, (v) το ρυθμός αύξησης του ανευρύσματος (τμήματα των ανευρυσμάτων που αυξάνονται ταχύτερα, π.χ. πρόσθιο και οπίσθιο τοίχωμα, δείχνουν αυξημένη περιεκτικότητα MMP) και (vi) το αν επρόκειτο για αορτικές περιοχές με πιο έντονες ιστοπαθολογικές ανωμαλίες.^{5,9}

Πρόσφατα, κάποιες ομάδες έχουν μετατοπίσει την προσοχή τους προς τα επίπεδα των MMPs στο πλάσμα, με στόχο τον εντοπισμό νέων δεικτών για την πρόβλεψη νοσημάτων της αορτής. Αυτό που προέκυψε είναι ότι τα επίπεδα MMP-9 στο πλάσμα αυξάνονται και σε χρόνια ανευρύσματα της θωρακικής αορτής, ενώ η συγκέντρωση MMP-2 είναι ουσιαστικά αμετάβλητη. Επιπλέον, σε υποψήφιους για ενδοαγγειακή αποκατάσταση του ανευρύσματος, βρέθηκε ότι τα επίπεδα MMP-3 και MMP-9 είναι αυξημένα, ενώ η συγκέντρωση TIMP-1 μειώνεται. Τα επίπεδα MMP-3 και MMP-9 επιστρέφουν στην αρχική τους κατάσταση μέσα σε 6 μήνες μετά από την επιτυχή ενδοαγγειακή διόρθωση, ενώ παραμένουν σε υψηλά επίπεδα, αν ακολουθήσει μια εσωτερική διαρροή. Τέλος, μια πρόσφατη πρωτεομική μελέτη σχετίζει την παρουσία των MMP-9 με την αποδόμηση της φιμπρονεκτίνης στην ανθρώπινη αορτή, παρέχοντας έτσι μια απόδειξη του κεντρικού ρόλου που κατέχουν οι MMPs στις παθήσεις που αφορούν την αορτή. Όλα τα στοιχεία που αφορούν MMPs, αν και ενδιαφέροντα, δεν είναι αρκετά για να επιτρέψουν την έγκριση οποιουδήποτε από αυτούς τους δείκτες ως προγνωστικό παράγοντα, δεδομένου ότι ο αριθμός των ασθενών είναι πολύ περιορισμένος. Πολλοί ερευνητές επικεντρώνονται στη μελέτη των MMPs -1, -2, -8, -9, -12 και -14 και στο ρόλο τους στη δημιουργία των ανευρυσμάτων μέσω της πιθανής αλληλεπίδρασης με τις φλεγμονώδεις οδούς, και στο ποια οδός ενεργοποιείται πρώτα.⁵

Έναν ακόμα υπό μελέτη βιοδείκτη αποτελεί η οστεοποντίνη. Η οστεοποντίνη είναι μια πολυλειτουργική γλυκοπρωτεΐνη γνωστή για τη ρυθμιστική λειτουργία της στην ανακατασκευή των οστών και στη σύνθεση των ινών κολλαγόνου κατά την αναδιαμόρφωση των ιστών. Μελέτες απέδειξαν ότι η οστεοποντίνη αυξάνεται στο πλάσμα των ασθενών με ανεύρυσμα της ανιούσας αορτής. Επιπλέον, ανοσοϊστοχημικές μελέτες έχουν δείξει αυξημένη ανοσολογική απόκριση για την

οστεοποντίνη σε ανευρυσματικούς ιστούς (Εικόνα 7). Με βάση τα παραπάνω, προτάθηκε ως ένας πιθανός δείκτης για την πρόγνωση ανευρυσμάτων της αορτής.¹⁰



Εικόνα 7 Α) Τμήμα ιστού από ανευρυσματική ανιούσα αορτή , Β) Φυσιολογικό τμήμα ιστού

2.4 Περισσότεροι δείκτες

Κάποιοι επιπλέον δείκτες, που δεν εντάσσονται σε καμία από τις προαναφερθείσες κατηγορίες, αποτελούν αντικείμενο μελέτης ως πιθανά διαγνωστικά εργαλεία σε ανευρύσματα της ανιούσας θωρακικής αορτής. Το NT-proBNP, ένα πεπτίδιο το οποίο χρησιμοποιείται κυρίως για να αποκλειστεί η περίπτωση καρδιακής ανεπάρκειας, είναι αποτελεσματικό για ένα μεγάλο εύρος διαγνωστικών και προγνωστικών εξετάσεων σε αρκετά καρδιαγγειακά νοσήματα. Έχει μελετηθεί τόσο σε αορτικούς διαχωρισμούς όσο και σε χρόνια ανευρύσματα της θωρακικής αορτής και βρέθηκε και στις δύο περιπτώσεις ότι τα επίπεδα αυτού του δείκτη είναι αυξημένα, αλλά καμία διαφορά δεν μπορεί να ανιχνευθεί μεταξύ οξείων και χρόνιων περιστατικών.⁵

Τέλος, μια άλλη ενδιαφέρουσα πτυχή της έρευνας στον τομέα των βιοδεικτών σε αορτικά νοσήματα, αν και ακόμα σε στάδιο ανάπτυξης, είναι η μελέτη των microRNAs. Θα μπορούσαν να βοηθήσουν στη διαφοροποίηση των ασθενών με

ανεύρυσμα αορτής από υγιή άτομα. Πρόσφατα στοιχεία έχουν επισημάνει τα microRNAs (miRNAs) ως πιθανούς προγνωστικούς παράγοντες για την ανάπτυξη των ανευρυσμάτων της θωρακικής αορτής.⁵

3. Πρωτεομική ανάλυση

3.1 Πρωτεομική τεχνολογία

Κύριος στόχος της Πρωτεομικής Ανάλυσης είναι η μελέτη των πρωτεομάτων, δηλαδή του συνόλου των πρωτεϊνών που απαρτίζουν ένα βιολογικό σύστημα (οργανισμός, όργανο, ιστός, κύτταρο κ.α.), των δομών τους, των αλληλεπιδράσεων τους με άλλες πρωτεΐνες, των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και πιο συγκεκριμένα αλλαγών στα επίπεδά τους ως συνέπεια διαφόρων ασθενειών ή και περιβαλλοντικών παραγόντων. Η πρωτεομική τεχνολογία διαχωρίζεται στους παρακάτω κλάδους, που ασχολούνται με τη δομή των πρωτεϊνών, τη λειτουργία τους και την έκφρασή τους:

- Δομική Πρωτεομική: Υψηλής απόδοσης κρυσταλλογραφία ακτινών X και φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)
- Λειτουργική Πρωτεομική: Διπλό Υβρίδιο στη ζύμη (Yeast Two-hybrid), Ανάλυση Μοτίβων (Motif Analysis), Ανάλυση Απαλοιφής (Deletion Analysis), Τσιπ Συνδετών (Ligand Chips)
- Αναλυτική Πρωτεομική: Ηλεκτροφόρηση, Πρωτεϊνικά τσιπ, DNA τσιπ, Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC), Φασματόμετρα μάζας (Mass Spectrometry).

Η κύρια διαφορά της Πρωτεομικής από τις υπόλοιπες τεχνικές ανάλυσης πρωτεϊνών είναι ότι δεν αναλύει τις πρωτεΐνες μία προς μία, αλλά με ένα όσο το δυνατόν αυτοματοποιημένο τρόπο σε μεγάλη κλίμακα. Στην παρούσα μελέτη οι

πρωτεΐνες απομονώνονται από το βιολογικό υλικό, διασπώνται με τη χρήση της θρυψίνης, διαχωρίζονται με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και αναλύονται περαιτέρω με φασματομετρία μάζας. Η εξέλιξη νεότερων τεχνικών πρωτεομικής ανάλυσης επιτρέπει την ταυτόχρονη μέτρηση χιλιάδων πρωτεϊνών. Στις μέρες μας η πρωτεομική ανάλυση εφαρμόζεται για τη μελέτη διαφόρων νοσημάτων προκειμένου να αναγνωριστούν ειδικοί βιοδείκτες για έγκαιρη διάγνωση και έλεγχο της εξέλιξης της εκάστοτε νόσου καθώς και για την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που τη διέπουν. Η πρωτεομική ανάλυση ήδη εφαρμόζεται στην μελέτη διαφόρων παθήσεων του καρδιαγγειακού συστήματος στην προσπάθεια για ανάλυση των βαθύτερων σε μοριακό επίπεδο μηχανισμών πρόκλησης τους αλλά και ανεύρεσης πιθανών βιοδεικτών για έγκαιρη διάγνωση.¹¹

3.2 Εφαρμογές πρωτεομικής ανάλυσης

Μεταξύ των αρχικών στόχων της εφαρμογής της πρωτεομικής ανάλυσης αποτέλεσε η διερεύνηση της αιτιοπαθογένειας της στένωσης της αορτικής βαλβίδας, όπου μελετήθηκαν διάφορα βιολογικά υλικά, που περιλάμβαναν κύτταρα, ιστό και βιολογικό υγρό (πλάσμα, ούρα). Το πλάσμα εμφανίζει πολλά πλεονεκτήματα στα οποία περιλαμβάνεται το χαμηλό κόστος, η εύκολη και μη επεμβατική πρόσβαση και κυρίως το γεγονός ότι αποτελεί μία πλούσια πηγή πρωτεϊνών και μεταβολιτών που αντανακλούν την κλινική κατάσταση του ασθενή. Αυτή ακριβώς η πολυπλοκότητα και το μέγεθος του πρωτεόματος καθιστούν πρόκληση τη μελέτη του. Παράλληλα με τον ορό, έχουν χρησιμοποιηθεί δείγματα ολόκληρου ιστού αλλά και μεμονωμένα κύτταρα (ινοβλάστες, μακροφάγα, λεμφοκύτταρα).¹²

Τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερο βάρος δίνεται στη χρήση της πρωτεομικής ανάλυσης στην ανάλυση της αιτιοπαθογένειας των αορτικών ανευρυσμάτων, κυρίως των κοιλιακών, ώστε να εντοπιστούν τα υψηλού κινδύνου ανευρύσματα για τα οποία απαιτείται έγκαιρη αντιμετώπιση. Στο παρελθόν οι αναλύσεις αυτές χρησιμοποιούσαν κυρίως ορό, τεχνική που παρουσιάζει το πλεονέκτημα της ευρείας εφαρμογής μίας ελάχιστα επεμβατικής μεθόδου ελέγχου σε μεγάλο αριθμό ασθενών. Οι νεότερες μέθοδοι πρωτεομικής ανάλυσης χρησιμοποιούν τον μέσο χιτώνα του αορτικού τοιχώματος ή ολόκληρο τον αγγειακό ιστό, μέθοδος ευκολότερη από τεχνικής άποψης, χωρίς τον κίνδυνο επιμόλυνσης των δειγμάτων με ορισμένους μόνο

περιορισμούς, γεγονός που οδήγησε στην ανάλυση διαφόρων τύπων ανευρύσματος κοιλιακής αορτής (ασυμπτωματικά, συμπτωματικά, ταχέως αναπτυσσόμενα ή μετά από ρήξη) ώστε να γίνει κατανοητή η παθογένεια.^{13,14}

Όσον αφορά τη μελέτη των ανευρυσμάτων της ανιούσας θωρακικής αορτής, η εμπειρία παραμένει περιορισμένη. Ορισμένες ερευνητικές ομάδες διερεύνησαν πρωτεομικά ορό ασθενών με ανεύρυσμα κοιλιακής ή θωρακικής αορτής προεγχειρητικά και μετεγχειρητικά όπου εντόπισαν διαφοροποίηση στα επίπεδα ορισμένων πρωτεϊνών, συγκεκριμένα της καλλιστατίνης (και σε κοιλιακά και θωρακικά ανευρύσματα) και της α-2-μακροσφαιρίνης (σε ασθενείς με πάθηση της θωρακικής αορτής).¹⁵

Παράλληλα η εξέλιξη νέων τεχνικών, στον τομέα αυτό, όπως το iTRAQ (ισοβαρείς ιχνηθέτες για σχετική και απόλυτη ποσοτικοποίηση) διευκόλυνε ακόμη περισσότερο την προσπάθεια ανεύρεσης βιοδεικτών και για άλλες παθήσεις του καρδιαγγειακού συστήματος όπως ο οξύς διαχωρισμός της θωρακικής αορτής και την διαφοροδιάγνωση από οξέα εμφράγματα του μυοκαρδίου. Η μελέτη του ορού στις περιπτώσεις αυτές ανέδειξε την παρουσία ορισμένων πρωτεϊνών, συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας του αορτικού ιστού, σε αυξημένες συγκεντρώσεις στον ορό όπως η καρβοξυπεπτιδάση, η λουμικάνη, η φμπρονεκτίνη, η σερουλοπλασμίνη και η θρομβοσπονδίνη -1.^{15,16}

Τέλος, σε ορισμένες μελέτες γίνεται προσπάθεια μέσω της πρωτεομικής ανάλυσης του μέσου χιτώνα σε ασθενείς με ανευρυσματική διάταση και τη χρήση Laser μικροδιχοτόμησης, να δοθεί επιπλέον φως στην παθογένεια της νόσου. Από τις πρωτεΐνες που απομονώθηκαν, 25 εμφανίσθηκαν για πρώτη φορά, η πλειοψηφία των οποίων σχετίζονται με τον κυτταρικό σκελετό ενώ αποτελούν και μέρος της θεμέλιας ουσίας κριτικής σημασίας για την ακεραιότητα του αορτικού τοιχώματος.¹⁷

Στην παρούσα μελέτη, η εφαρμογή της πρωτεομικής ανάλυσης περιλαμβάνει αρχικά τη λήψη αντιπροσωπευτικού ιστού από το τοίχωμα μη διατεταμένης (φυσιολογικής) ανιούσας θωρακικής αορτής και από το τοίχωμα της διατεταμένης. Πιο αναλυτικά, η μέθοδος περιλαμβάνει τη συλλογή δειγμάτων ιστού από το τοίχωμα της ανιούσας θωρακικής αορτής από 2 ασθενείς χωρίς διάταση ανιούσας αορτής

(<40cm) με προγραμματισμένη χειρουργική επέμβαση για στεφανιαία παράκαμψη ή αντικατάσταση αορτικής βαλβίδας. Το υλικό αυτό αφαιρείται σε μορφή ρουτίνας κατά την διάρκεια των επεμβάσεων αυτών. Επιπλέον λήφθηκαν δείγματα ιστού από 2 ασθενείς με διαγνωσμένο ανεύρυσμα ανιούσας αορτής (50-55 cm) και προγραμματισμένη χειρουργική επέμβαση, καθώς και από 2 ασθενείς με προγραμματισμένη χειρουργική επέμβαση για στεφανιαία παράκαμψη ή αντικατάσταση αορτικής βαλβίδας και συνυπάρχουσα διάταση ανιούσας αορτής χωρίς ένδειξη χειρουργικής παρέμβασης αυτής καθαυτής (40-50 cm) όπου η λήψη του υλικού έγινε όπως και στην πρώτη ομάδα.

Εξαιρέθηκαν ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη, με χρόνια διαχωρισμό, παρουσία δίπτυχης αορτικής βαλβίδας χωρίς διάταση αορτής καθώς και όσοι παρουσιάζουν γνωστή συνδρομική διάταση ανιούσας αορτής όπως το σύνδρομο Marfan, Ehlers - Danlos, Loeys - Dietz. Η λήψη πραγματοποιήθηκε από τον Ιατρό Κωνσταντίνο Ιερομόναχο στο Ωνάσειο Καρδιοχειρουργικό Κέντρο με τη συνεργασία των τμημάτων Καρδιοχειρουργικής Ενηλίκων.

4. Εργαστηριακές Μέθοδοι & Τεχνικές

4.1 Δείγματα

Η μέθοδος περιλαμβάνει τη συλλογή δειγμάτων ιστού από το τοίχωμα της ανιούσας θωρακικής αορτής από δύο υγιή άτομα (ομάδα Α) χωρίς διάταση ανιούσας αορτής (<40cm) με στόχο μέσω της πρωτεομικής ανάλυσης της ταυτοποίησης της πρωτεομικής σύνθεσης του φυσιολογικού αορτικού τοιχώματος. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ιστού από δύο ασθενείς (ομάδα Β) με διάταση ανιούσας αορτής χωρίς ένδειξη με βάση τα ισχύοντα κριτήρια χειρουργικής παρέμβασης αυτής καθαυτής (40-50 cm) καθώς και από δύο ασθενείς (ομάδα Γ) με διαγνωσμένο ανεύρυσμα ανιούσας αορτής (>50 cm) και χειρουργική ένδειξη (πίνακας 1).

Κατηγοριοποίηση Δειγμάτων	Χαρακτηριστικά Δειγμάτων
Ομάδα Α	Ιστοί από το τοίχωμα της ανιούσας θωρακικής αορτής από 2 υγιή άτομα χωρίς διάταση του τοιχώματος(<40cm)
Ομάδα Β	Ιστοί από 2 ασθενείς με διάταση ανιούσας αορτής (40-50 cm) και χωρίς ένδειξη χειρουργικής παρέμβασης αυτής
Ομάδα Γ	Ιστοί από 2 ασθενείς με διαγνωσμένο ανεύρυσμα ανιούσας αορτής (>50 cm) και χειρουργική ένδειξη

Πίνακας 1 Κατηγοριοποίηση των δειγμάτων με βάση τα χαρακτηριστικά τους

4.2 Ομογενοποίηση ιστών

Αρχικά οι ιστοί μεταφέρονται σε ειδικά σωληνάρια (safe lock Eppendorf). Σε κάθε δείγμα προστίθενται 150 μ L από το διάλυμα ομογενοποίησης, που αποτελείται από διττανθρακικό τριαιθυλαμμώνιο (0,5 M) και αποδιατακτικό SDS 0,05% (w/v). Η ομογενοποίηση πραγματοποιείται με τον ομογενοποιητή Bullet Blender homogenizer (Next Advance). Εν συντομία, με ειδική μεζούρα προστίθενται σε κάθε δείγμα ίση ποσότητα από σφαίρες από ανοξείδωτο ατσάλι (0,9-2 mm διαμέτρου) και στη συνέχεια τα δείγματα εισάγονται στον ομογενοποιητή. Χρησιμοποιούνται οι ακόλουθες συνθήκες ομογενοποίησης : Ταχύτητα: 12, Χρόνος: 5min. Ένα ακόμα βήμα ομογενοποίησης περιλαμβάνει μείωση της ταχύτητας στο 10 και του χρόνου στα 3 λεπτά. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 10 min σε 13,000 στροφές ανά λεπτό σε θερμοκρασία 4° C. Το υπερκείμενο περιλαμβάνει το διαλυτό κλάσμα των ολικών πρωτεϊνών των ιστών και μεταφέρεται σε καθαρά σωληνάρια όγκου 1,5 mL.

4.3 Μέτρηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

Η εύρεση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών που περιέχονται σε ένα διάλυμα γίνεται εύκολα με χρωματομετρικές μεθόδους, ή με τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων σε μήκος κύματος 280 nm. Τα τελευταία χρόνια ως μέθοδος εκλογής χρησιμοποιείται η μέθοδος Bradford, λόγω της ευκολίας και της ταχύτητας με την οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί. Η μέθοδος αυτή εξαρτάται από τη δέσμευση της χρωστικής Coomassie G-250, κυρίως στα βασικά αμινοξέα των πρωτεϊνών, αλλάζοντας ταυτόχρονα το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης

τους. Η δέσμευση είναι ανάλογη της ποσότητας των πρωτεϊνών. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης αγνώστου δείγματος χρησιμοποιείται πρότυπη καμπύλη, η οποία κατασκευάζεται με τη βοήθεια γνωστών συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης αλβουμίνης του βόειου ορού (Bovine Serum Albumin, BSA). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η πρότυπη πρωτεΐνη διαλύεται σε ίδιας σύστασης ρυθμιστικό διάλυμα, στο οποίο είναι διαλυμένες οι άγνωστες πρωτεΐνες.¹⁸

Αρχικά, κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης, η οποία δημιουργείται με το προσδιορισμό της BSA σε διάφορες συγκεντρώσεις: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 1.0 mg/mL. Αραιώνονται 10 μ L από καθένα από τα παραπάνω διαλύματα BSA σε 990 μ L αντιδραστήριο Bradford (Biorad protein assay), που είναι αραιωμένο 5 φορές με ddH₂O. Πραγματοποιείται ήπια ανάδευση, τα διαλύματα επωάζονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μετράται η απορρόφηση τους στα 595nm. Παράλληλα, ετοιμάζονται και τα δείγματα άγνωστης πρωτεϊνικής συγκέντρωσης. Αραιώνεται 1 μ L δείγματος σε 19 μ L ddH₂O και ακολούθως 10 μ L αραιώνονται σε 990 μ L αντιδραστήριο Bradford. Ένα ακόμη διάλυμα παρασκευάζεται, το τυφλό (10 μ L ddH₂O αραιώνονται σε 990 μ L BR), για το μηδενισμό του φωτομέτρου (Thermo, Biomate). Κατόπιν της επώασης, μηδενίζουμε με το τυφλό και μετράμε την απορρόφηση των δειγμάτων σε μήκος κύματος 595nm. Αν κάποια τιμή βρίσκεται εκτός του εύρους των αποδεκτών τιμών πραγματοποιείται διαφορετική αραιώση για το δείγμα και φωτομετρείται ξανά.

4.4 Αποδιάταξη πρωτεϊνών

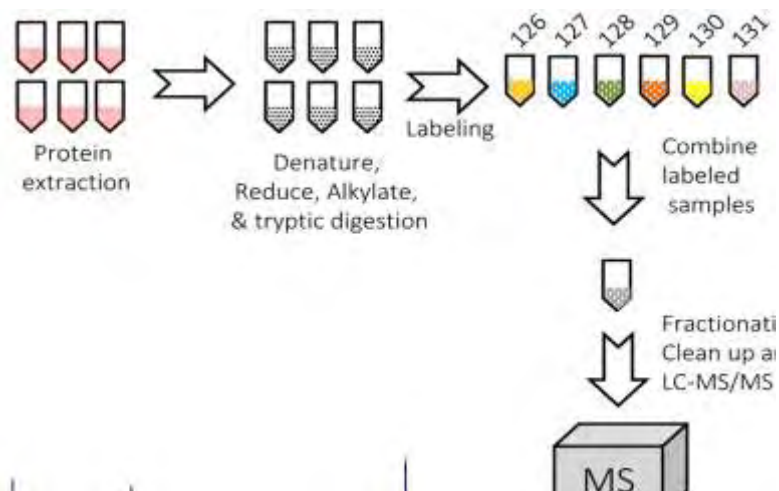
Για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών που περιέχονται στα δείγματα προστίθεται tris-2-carboxymethyl phosphine (TCEP) 50 mM και πραγματοποιείται ανάδευση. Τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία 60° C για 1ώρα. Στη συνέχεια, σε κάθε δείγμα προστίθεται methyl methanethiosulfonate (MMTS) 200mM διαλυμένο σε ισοπροπανόλη για να αποφευχθεί ο σχηματισμός δεσμών μεταξύ των σουλφυδρυλίων των κυστεϊνών. Πραγματοποιείται ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.

4.5 Πέψη των πρωτεϊνών με Θρυψίνη

Η θρυψίνη ανήκει στην οικογένεια των πρωτεασών σερίνης. Διασπά τις πρωτεΐνες αμέσως μετά από τα αμινοξέα αργινίνη ή λυσίνη. Στις περισσότερες πρωτεΐνες, αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μιας σειράς πεπτιδίων μήκους 5-75 αμινοξέων. Για την πέψη των πρωτεϊνών προστίθεται σε κάθε δείγμα νερό και θρυψίνη (500 ng/μL). Η πέψη πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι κατά τη διάρκεια της νύχτας.

4.6 Ισοβαρείς ιχνηθέτες για σχετική και απόλυτη ποσοτικοποίηση (iTRAQ)

Η φασματομετρία μάζας (MS) αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για την αξιολόγηση της αφθονίας πρωτεϊνών μεταξύ των βιολογικών δειγμάτων. Μία από τις πιο δημοφιλείς μεθόδους για σχετική ποσοτικοποίηση μέσω MS είναι η σήμανση με σταθερά ισότοπα των πρωτεϊνών σε δείγματα πριν από την ανάλυση. Στην ποσοτικοποίηση, που επιτυγχάνεται με ισοβαρείς ιχνηθέτες, σε κάθε δείγμα προστίθεται ένα διαφορετικό ισότοπο ενός ισοβαρούς ιχνηθέτη, και στη συνέχεια τα δείγματα συγκεντρώνονται όλα μαζί και αναλύονται ταυτόχρονα στο MS. Δεδομένου ότι οι ιχνηθέτες είναι ισοβαρείς, τα πεπτιδία ιχνηθετημένα με ισοτοπικές παραλλαγές του ιχνηθέτη εμφανίζονται ως μια ενιαία σύνθετη κορυφή στην ίδια τιμή m/z . Ο κατακερματισμός του τροποποιημένου πρόδρομου ιόντος κατά τη διάρκεια της δίδυμης φασματομετρίας μάζας MS / MS παράγει δύο τύπους ιόντων: (α) κορυφές ιόντων αναφοράς (reporter) και (β) κορυφές ιόντων θραυσμάτων πεπτιδίων. Η ποσοτικοποίηση επιτυγχάνεται με την απευθείας συσχέτιση της σχετικής έντασης (intensity) των ιόντων αναφοράς (reporter) με εκείνη των πεπτιδίων που συλλέγονται έπειτα από MS/MS. Οι κορυφές ιόντων θραυσμάτων με υψηλότερες τιμές m/z είναι ειδικές για την πεπτιδική αλληλουχία αμινοξέων και χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των πεπτιδίων, τα οποία τελικά προσδιορίζουν τις πρωτεΐνες που αντιπροσωπεύουν. Αυτή η τεχνολογία έχει αποδειχθεί ότι είναι επιτυχής σε πολλά πειράματα στο πλαίσιο της συγκριτικής ανάλυσης σε μια βιολογική διαταραχή.¹⁹



Εικόνα 8 Γενική ροή εργασιών ενός πειράματος με ισοβαρή ιχνηθέτηση

Τα αντιδραστήρια iTRAQ, που είναι διαθέσιμα από την AB Sciex αποτελούνται από 4-plex και 8-plex ιχνηθέτες που μπορούν να χρησιμοποιούνται για ιχνηθέτηση και να αντλούν ποσοτικές πληροφορίες για έως τέσσερα και οκτώ διαφορετικά βιολογικά δείγματα ταυτόχρονα. Τα 8-plex αντιδραστήρια, που χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία, έχουν μάζες ιόντων αναφοράς (reporter) σε m/z 113-119 και 121.¹⁹ Ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων για το συγκεκριμένο πείραμα ήταν 6, χρησιμοποιήθηκαν 2 δείγματα από την Ομάδα Α, 2 δείγματα από την ομάδα Β και 2 από την ομάδα Γ. Για την ιχνηθέτηση των παραπάνω δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν 6 αντιδραστήρια (6-plex), αφού προηγήθηκε η απομόνωση του πρωτεϊνικού υλικού, η αποδιάταξη των πρωτεϊνών και η πέψη τους με θρυψίνη (εικόνα 8). Ο τρόπος με τον οποίο έγινε η ιχνηθέτηση συνοψίζεται παρακάτω πίνακα:

Sample code	iTRAQ label
Ομάδα Α(4 cm)	113
Ομάδα Α(4 cm)	114
Ομάδα Β(4-5 cm)	115
Ομάδα Β(4-5 cm)	116
Ομάδα Γ(>5 cm)	117
Ομάδα Γ(>5cm)	118

Πίνακας 2 Ιχνηθέτηση των δειγμάτων με τα αντιδραστήρια iTRAQ

Σε κάθε φιαλίδιο που περιέχει το αντιδραστήριο iTRAQ προστέθηκε ισοπροπανόλη. Ακολούθως, μεταφέρεται το περιεχόμενο κάθε φιαλιδίου στο αντίστοιχο δείγμα και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Μετά το δώρο, το περιεχόμενο των δειγμάτων μεταφέρεται σε ένα tube των 1,5 mL (iTRAQ mix) και αποξεραίνεται το περιεχόμενο του (Eppendorf concentrator 5301).

4.7 RP-HPLC υψηλού pH για την απομόνωση των πεπτιδίων

Η RP-HPLC (υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης) ανήκει στις χρωματογραφικές τεχνικές. Ο διαχωρισμός με LC χρησιμοποιείται στην αναλυτική πρωτεομική και βασίζεται κυρίως στις φυσικοχημικές ιδιότητες των πρωτεϊνών. Οι κυριότερες από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των πρωτεϊνών, οι οποίες λαμβάνονται υπόψη στην υγρή χρωματογραφία είναι το μέγεθος, το φορτίο, η υδροφοβικότητα και οι βιοχημικές ιδιότητες. Στην RP-HPLC ο διαχωρισμός οφείλεται στην προσρόφηση υδρόφοβων μορίων σε υδρόφοβη στατική φάση, υπό την ροή κινητής φάσης αυξημένης πολικότητας. Η έκλουση των προσροφημένων μορίων από τη χρωματογραφική στήλη επιτυγχάνεται με τη μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης κατά την αύξηση του περιεχόμενου σε αυτή ποσοστού του οργανικού διαλύτη. Η μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης ελαττώνει την υδρόφοβη αλληλεπίδραση μεταξύ των προσροφημένων μορίων και της στατικής φάσης: είναι προφανές ότι όσο πιο άπολο είναι ένα διαχωριζόμενο μόριο, τόσο περισσότερο χρόνο θα αλληλεπιδράσει με την άπολη στατική φάση και τόσο υψηλότερη θα είναι η συγκέντρωση του οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση, που θα απαιτείται για να επιτευχθεί η αποδέσμευσή του. Ως αποτέλεσμα επιτυγχάνεται η εκλεκτική έκλουση των άπολων μορίων από τη χρωματογραφική στήλη. Η χρωματογραφία RP-HPLC είναι η πιο κοινώς χρησιμοποιούμενη μορφή της HPLC. Περισσότερες εφαρμογές στο διαχωρισμό μικρών μορίων με RP-HPLC βρίσκουν οι στήλες C18.²⁰

Πιο αναλυτικά για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιούνται:

- Σύστημα HPLC : Dionex, P680 HPLC Pump, PDA- 100 photodiode Array Detector
- Στήλη : Waters, XBridge C18, 150x4.6 mm, 3.5 μm, 130 Å

Η προετοιμασία της κινητής φάσης περιλαμβάνει:

- Παρασκευή 0,5 L κινητής φάσης A, η οποία αποτελείται από H₂O και 0,05% (v/v) Υδροξείδιο του αμμωνίου και έχει pH=9,5
- Παρασκευή 0,5 L κινητής φάσης B, η οποία αποτελείται από Ακετονιτρίλιο και 0,05% (v/v) Υδροξείδιο του αμμωνίου

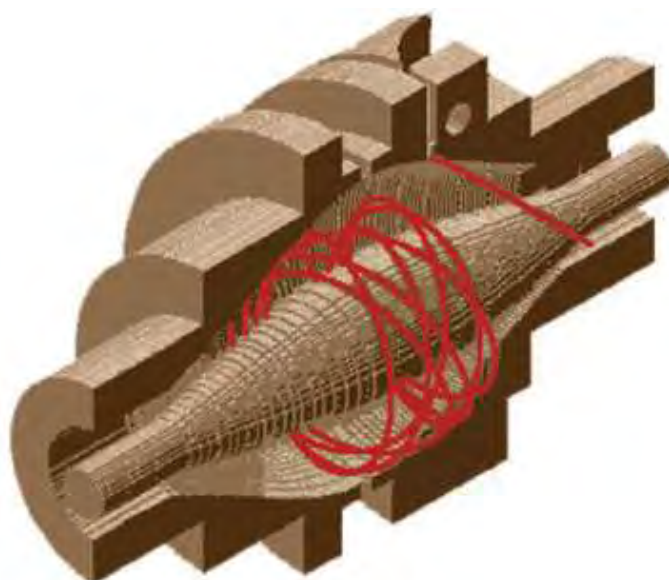
Η στήλη ξεπλένεται με αναλογία A:B=95:5 για τουλάχιστον 40 λεπτά με ροή 0,4 mL/min και τη θερμοκρασία ρυθμισμένη στους 30° C. Παράλληλα, στο φιαλίδιο που περιέχεται το iTRAQ mix επαναιωρείται σε 250 μL κινητής φάσης A. Το διάλυμα διαλύεται με τη χρήση υδατόλουτρου υπερύχων και φιλτράρεται με ειδικά φίλτρα διαμέτρου 13 mm. Το δείγμα εισάγεται στο χρωματογράφο με τη χρήση βελόνας Hamilton και τη βαλβίδα να βρίσκεται στη θέση φόρτωσης. Η συλλογή των πεπτιδίων ξεκινά μετά από 20 περίπου λεπτά και η συλλογή τους γίνεται σε φιαλίδια όγκου 1,5 mL. Τα πεπτίδια εκλούνται υπό δεκάλεπτη βαθμιδωτή αύξηση της φάσης B από 5% σε 35%. Τα πεπτίδια που συλλέγονται αποξεραίνονται και αποθηκεύονται σε θερμοκρασία -20° C.

4.8 Nano-LC-ESI-MS/MS ανάλυση των πεπτιδίων

Η φασματομετρία μάζας αποτελεί μια αναλυτική τεχνική ταυτοποίησης και προσδιορισμού μιας ένωσης από τις πληροφορίες που παρέχει το φάσμα μάζας της. Το υπό ανάλυση δείγμα εισάγεται στην πηγή ιοντισμού του οργάνου μέσα στην οποία τα μόρια του δείγματος ιοντίζονται. Αυτό γίνεται γιατί τα ιόντα είναι ευκολότερα στον χειρισμό τους σε σχέση με τα ουδέτερα μόρια. Τα δημιουργούμενα ιόντα οδηγούνται στον αναλυτή μάζας και διαχωρίζονται σύμφωνα με το λόγο μάζα/φορτίο (m/z ratio). Τα διαχωριζόμενα ιόντα ανιχνεύονται με τη μορφή ηλεκτρικού/ψηφιακού σήματος. Ο αναλυτής και ο ανιχνευτής του φασματογράφου, συνήθως και η πηγή ιοντισμού βρίσκονται υπό συνθήκες υψηλού κενού ώστε να αποφεύγεται η σύγκρουση των αέριων ιόντων – αναλυτών με μόρια του αέρα.²⁰

Πιο αναλυτικά, ο ιοντισμός των δειγμάτων επιτυγχάνεται μέσω Ηλεκτροψεκασμού - Electrospray Ionization (ESI). Ο ιοντισμός του δείγματος γίνεται μέσα σε διάλυμα και η μεταφορά του στην αέρια φάση επιτυγχάνεται με ψεκασμό από ειδική βελόνα σε ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο. Όταν το ESI γίνεται σε ροές

μικρότερες του 1μL/min τότε καλείται νανο-ηλεκτροψεκασμός, nano-ESI. Με το nano-ESI έχει επιτευχθεί βελτίωση της ευαισθησίας της μεθόδου. Στη συνέχεια, τα ιόντα οδηγούνται στο LTQ- Orbitrap (τροχιακή παγίδα ιόντων). Το OT είναι αναλυτής πολύ μεγάλης διακριτικής ικανότητας και εξαιρετικής ακρίβειας. Το OT σχηματίζεται γύρω από ένα ηλεκτρόδιο, το οποίο βρίσκεται έγκλειστο σε ένα μεταλλικό κέλυφος για το σχηματισμό ηλεκτροστατικού πεδίου (εικόνα 9). Η εξάρτηση της ταλάντωσης των ιόντων από το λόγο m/z είναι η αρχή που επιτρέπει το συσχετισμό της παγίδευσης των ιόντων με το διαχωρισμό τους από τον αναλυτή. Η ανίχνευση των ιόντων γίνεται με ανάλυση του εικονικού εναλλασσόμενου ρεύματος που δημιουργεί η κίνηση τους και μετατροπή του κατά Φουριέ σε φάσμα μάζας. Για την καταγραφή του φάσματος μάζας το ιοντικό σήμα πρέπει να μετατραπεί σε ηλεκτρικό. Ο ανιχνευτής, που φέρει το MS, είναι ηλεκτρονικός πολλαπλασιαστής. Η διαδοχική φασματομετρία μάζας ή απλούστερα MS/MS αναφέρεται στη λήψη φάσματος μάζας από ένα ιόν, τη θραύση του και την καταγραφή του νέου φάσματος που προκύπτει από τα προϊόντα θραύσης. Η θραύση των πεπτιδίων πραγματοποιείται από την σύγκρουσή τους με άτομα ηλίου. Τα φάσματα MS/MS των πεπτιδίων παρέχουν δεδομένα για την πρωτοταγή δομή των πεπτιδίων παρέχοντας τις απαραίτητες πληροφορίες για την ταυτοποίηση μίας πρωτεΐνης.²⁰



Εικόνα 9 Αναλυτής μάζας - Orbitrap

Όλα τα πειράματα LC-MS διεξήχθησαν με το σύστημα Dionex Ultimate 3000 UHPLC σε συνδυασμό με το φασματογράφο μάζας υψηλής ανάλυσης nano-ESI Orbitrap-Elite (Thermo Scientific). Τα κλάσματα πεπτιδίων που συλλέχθηκαν κατά την RP- HPLC υψηλού pH επαναδιαλύθηκαν σε υδατικό διάλυμα φόρτωσης 50 μ L που περιείχε 0.1% (v/v) μυρμηκικό οξύ. Ένας όγκος 5 μ L ενέθηκε και φορτώθηκε στην Acclaim PEPMAP 100, 100 μ m X 2 εκ C18, 5 μ m, 100 Å στήλη παγίδευσης, με την μέθοδο ulPickUp και την αντλία φόρτωσης να λειτουργεί σε ταχύτητα ροής 5 μ L/min. Ο διαχωρισμός των πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε μέσω ανάμειξης 2 κινητών φάσεων A και B στη στήλη Acclaim PEPMAP RSLC, 75 μ m x 50 cm, nanoViper, C18, 2 μ m, 100 Å, η οποία τοποθετήθηκε με σύστημα βαλβίδας μετά τη στήλη παγίδευσης. Η στήλη κατέληγε σε ειδική νανο-βελόνα PicoTip με την οποία πραγματοποιήθηκε ο ηλεκτροψεκασμός των πεπτιδίων στο φασματογράφο μάζας. Η κινητή φάση (A) αποτελείται από υδατικό διάλυμα 0,1% (v/v) μυρμηκικό οξύ και η κινητή φάση (B) αποτελείται από ακετονιτρίλιο και 0.1% (v/v) μυρμηκικό οξύ. Τα πεπτίδια εκλούστηκαν υπό βαθμιδωτή αύξηση διάρκειας 315 λεπτών της φάσης B από 2% προς 33%. Ο ρυθμός ροής ήταν 300 nL / min και η θερμοκρασία της στήλης ορίστηκε στους 35 ° C. Ο ηλεκτροψεκασμός επιτεύχθηκε με εφαρμογή τάσης 2,5 kV. Για κάθε κύκλο σάρωσης του φασματογράφου μάζας τα 10 πρόδρομα ιόντα ισχυρότερου σήματος με λόγο m/z (μάζα/ φορτίο) μεταξύ 300 και 2200 υποβλήθηκαν σε θρυμματισμό HCD (High Collision Dissociation). Τα θραύσματα τους καταγράφηκαν από το λογισμικό του συστήματος.

4.9 Βιοπληροφορική Ανάλυση

Η επεξεργασία των δεδομένων γίνεται από το εξειδικευμένο λογισμικό Proteome Discoverer 1.4 το οποίο αναγνωρίζει και ποσοτικοποιεί τις πρωτεΐνες με ελεγχόμενη στάθμη εμπιστοσύνης 99%. Η περαιτέρω επεξεργασία των αποτελεσμάτων προκειμένου οι πρωτεΐνες να ενταχθούν σε συστηματικές λειτουργικές κατηγοριοποιήσεις γίνεται μέσω του προγράμματος DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) και της βάσης δεδομένων Gene Ontology. Ενώ στο παρελθόν κάθε προϊόν γονιδίου μελετούνταν μεμονωμένα για προσδιοριστούν οι λειτουργίες και ο ρόλος του σε βιολογικές διεργασίες, τώρα υπάρχουν εργαλεία με τα οποία αυτή η διαδικασία έχει αυτοματοποιηθεί. Με τη συγκέντρωση και τη διάδοση

του πλούτου των πρωταρχικών γνώσεων σχετικά με τα ήδη γνωστά γονίδια, η βάση δεδομένων Gene Ontology επιτρέπει στους ερευνητές να απονέμουν γνωρίσματα σε ομάδες γονιδίων που προκύπτουν από τα πειράματα ή τις αναλύσεις τους. Η βάση δεδομένων Gene Ontology παρέχει «λεξιλόγια» των καθορισμένων όρων που αντιπροσωπεύουν τις ιδιότητες των γονιδιακών προϊόντων. Αυτά καλύπτουν τρεις τομείς:

A) Κυτταρικά συστατικά, τα μέρη ενός κυττάρου ή το εξωκυτταρικό του περιβάλλον,

B) Μοριακές λειτουργίες, οι στοιχειώδεις λειτουργίες ενός γονιδιακού προϊόντος σε μοριακό επίπεδο, όπως δέσμευση ή κατάλυση και

Γ) Βιολογικές διεργασίες, οι εργασίες ή σύνολα μοριακών γεγονότων με καθορισμένη αρχή και τέλος, που σχετίζονται με τη λειτουργία των ολοκληρωμένων μονάδων διαβίωσης: κύτταρα, ιστοί, όργανα και οργανισμούς.

Η βάση δεδομένων Gene Ontology είναι δομημένη με τέτοιο τρόπο ώστε κάθε όρος έχει καθορισμένες σχέσεις με έναν ή περισσότερους άλλους όρους στον ίδιο τομέα, και μερικές φορές σε άλλους τομείς. Το λεξιλόγιο GO έχει σχεδιαστεί για να είναι «αναγνώστης ειδών», και περιλαμβάνει όρους που ισχύουν για προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα, και μονοκύτταρους και πολυκύτταρους οργανισμούς.²¹

5. Αποτελέσματα – Συζήτηση

Όπως αναφέραμε προτύτερα, τα πειράματα που διεξήχθησαν είχαν στόχο την πρωτεομική ανάλυση του τοιχώματος της φυσιολογικής και ανευρυσματικής ανιούσας αορτής με σκοπό τον εντοπισμό και ανάλυση του πρότυπου έκφρασης των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον παθοφυσιολογικό μηχανισμό ανάπτυξης του ανευρύσματος. Κοινός στόχος όλων των πειραμάτων ήταν η απομόνωση του πρωτεϊνικού υλικού και η περαιτέρω ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση του συνόλου των πρωτεϊνών που περιέχονται στα τοιχώματα της φυσιολογικής και ανευρυσματικής αορτής.

5.1 Πρωτεϊνική συγκέντρωση των δειγμάτων

Με τη μέθοδο Bradford έγινε η εύρεση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών που περιέχονται στα δείγματα μας. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Δείγμα	Συγκέντρωση(mg/mL)
Ομάδα Α	0,362
Ομάδα Α	0,243
Ομάδα Β	0,212
Ομάδα Β	0,146
Ομάδα Γ	0,417
Ομάδα Γ	0,439

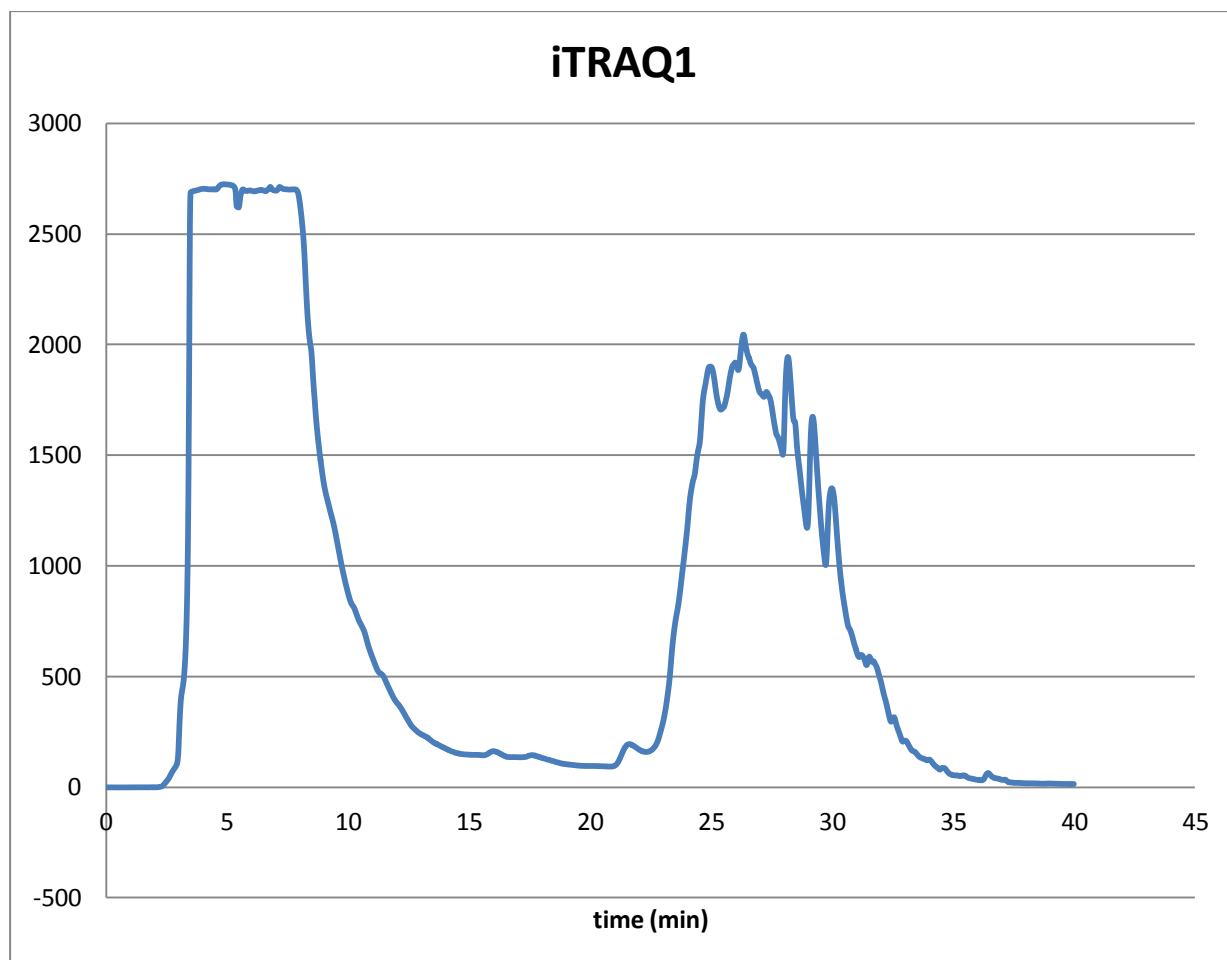
Πίνακας 3 Πρωτεϊνική συγκέντρωση των δειγμάτων

Η υψηλή συγκέντρωση του αορτικού τοιχώματος σε πρωτεΐνες το καθιστά κατάλληλο για την εφαρμογή πρωτεομικής ανάλυσης. Η εφαρμογή πρωτεομικής ανάλυσης στον μέσο χιτώνα του αορτικού τοιχώματος ή σε ολόκληρο στον αγγειακό ιστό αποτελεί μια μέθοδο ευκολότερη από τεχνικής άποψης σε σύγκριση με τη χρήση ορού, χωρίς τον κίνδυνο επιμόλυνσης των δειγμάτων. Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένοι περιορισμοί, όπως η λήψη του τμήματος της αορτής που γίνεται στα πλαίσια χειρουργικής επέμβασης. Με τον τρόπο αυτό θα μπορούσε να επιτευχθεί η ανάλυση διαφόρων τύπων ανευρύσματος ανιούσης αορτής, όπως ασυμπτωματικά, συμπτωματικά ή ταχέως αναπτυσσόμενα και να γίνει κατανοητή η παθογένεια της νόσου.

5.2 Χρωματογραφικός καθαρισμός των πεπτιδίων με τη χρήση του συστήματος RP-HPLC (Reversed phase-High Performance Liquid Chromatography)

Οι συνήθεις πληροφορίες που αντλούνται από ένα χρωματογράφημα είναι οι ακόλουθες: α) Ο αριθμός των κορυφών που εμφανίζονται στο χρωματογράφημα προσφέρει μία πρώτη εκτίμηση για την πολυπλοκότητα του δείγματος. β) Η θέση των κορυφών σε σχέση με το χρόνο έκλουσης των πεπτιδίων παρέχει πληροφορίες σχετικά με την ποιοτική σύσταση του δείγματος (σε συσχέτιση με πρότυπα). γ) Η περιοχή που καταλαμβάνει μία κορυφή μπορεί να δώσει πληροφορίες για την σχετική συγκέντρωση των συστατικών του δείγματος. δ) Αν το όλο σύστημα είναι συνδεδεμένο με φασματογράφο μάζας τότε είναι δυνατό να επιτευχθεί και αναγνώριση των πρωτεϊνών.

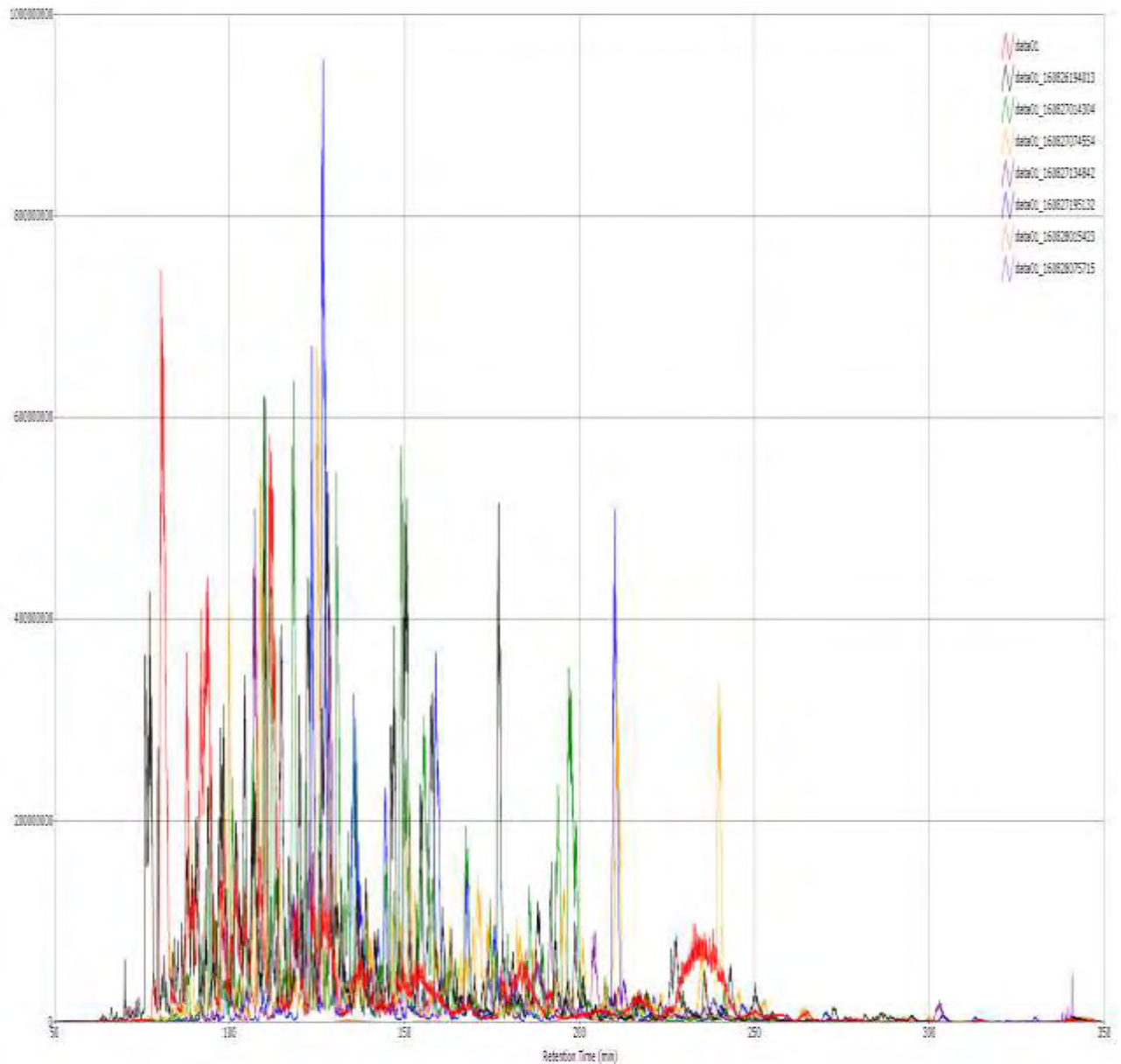
Για την απομόνωση και καθαρισμό των ιχνηθετημένων πεπτιδίων με τελικό στόχο την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση του πρωτεόματος των δειγμάτων ακολουθήθηκε η διαδικασία που προαναφέρθηκε. Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα που συλλέχθηκε από την ομογενοποίηση των ιστών ύστερα από κατάλληλη επεξεργασία χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των πεπτιδίων. Όπως προαναφέρθηκε, η έκλυση των πεπτιδίων ξεκινά έπειτα από δεκάλεπτη βαθμιδωτή αύξηση της φάσης B από 5% σε 35%. Μετά το πέρας 20 λεπτών ξεκινά η απομόνωση και έκλυση των κλασμάτων των πεπτιδίων (εικόνα 10). Κατά τη βαθμιδωτή αύξηση της φάσης B συλλέχθηκαν οχτώ κλάσματα 0,8 mL το καθένα σε 8 φιαλίδια των 1,5 mL. Επιπλέον, όπως φαίνεται και στο χρωματογράφημα αρχικά εκλούνται παραπροϊόντα που σχηματίζονται κατά την ιχνηθέτηση των δειγμάτων με τους ισοβαρείς ιχνηθέτες (iTRAQ).



Εικόνα 10 Χρωματογράφημα στήλης RPC18

5.3 Χρωματογραφικός καθαρισμός των πεπτιδίων με τη χρήση του συστήματος Nano-LC-ESI-MS/MS

Τα κλάσματα πεπτιδίων που συλλέχθηκαν κατά την RP- HPLC επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα φόρτωσης 50 μ L που περιείχε 0.1% (v/v) μυρμηκικό οξύ. Όπως προαναφέρθηκε, τα πεπτίδια εκλούστηκαν υπό βαθμιδωτή αύξηση διάρκειας 315 λεπτών της φάσης B από 2% προς 33% (εικόνα 11). Στη συνέχεια, ο ιοντισμός των δειγμάτων επιτυγχάνεται μέσω ESI και τα δημιουργούμενα ιόντα οδηγούνται στο LTQ- Orbitrap.



Εικόνα 11 Χρωματογράφημα LC-ESI-MS/MS

5.4 Ανάλυση διαφορικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών

Επόμενο βήμα ήταν η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που περιέχονται στα δείγματα.. Η ανάλυση των δειγμάτων με φασματομετρία μάζας που προηγουμένως έχουν ιχνηθετηθεί με ισοβαρείς ιχνηθέτες επιτρέπει την ποσοτικοποίηση των

πρωτεϊνών και παρουσιάζονται οι διαφορές στα πρότυπα έκφρασης μεταξύ των τριών ομάδων.

. Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται οι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν από την ανάλυση με φασματομετρία μάζας, οι οποίες μεταβάλλονται στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ατόμων των ομάδων Α και Β. Πιο συγκεκριμένα αναγράφονται:

α) το όνομα του γονιδίου,

β) το όνομα της πρωτεΐνης

γ) ο λογάριθμος με βάση το 2 του λόγου των επιπέδων μιας πρωτεΐνης ανάμεσα σε 2 καταστάσεις (π.χ. ομάδα Α και Β) και

δ) η πιθανότητα η πρωτεΐνη να μην μεταβάλλεται στατιστικά σημαντικά ($p\text{-value} < 0,05$ αντιστοιχεί σε στατιστικά σημαντική μεταβολή)

Gene name	Protein name	Log ₂ ratio	P-value
TENM2	Teneurin-2	-1,151794588	0,001421674
TEKT3	Tektin-3	-1,120171109	0,001918131
MFN2	Mitofusin-2	-1,065671068	0,003160593
VILL	Villin-like protein	-1,052390034	0,003558189
PYGM	Glycogen phosphorylase, muscle form	-0,996595427	0,005773999
MIB2	E3 ubiquitin-protein ligase	2,176648703	1,65149E-09
NOTCH2	Neurogenic locus notch homolog protein 2	1,945296519	7,12312E-08
RPL10A	60S ribosomal protein L10a	1,603098469	8,98648E-06

DYNC2H1	Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1	1,587825926	1,09291E-05
FEZF2	Fez family zinc finger protein 2	1,559992855	1,55442E-05

Πίνακας 4 Πρωτεΐνες που μεταβάλλονται στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ομάδων A και B

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, από τις παραπάνω πρωτεΐνες η DYNC2H1 που βρέθηκε να μεταβάλλεται έχει συνδεθεί με την ινωμυϊκή δυσπλασία (Fibromuscular dysplasia, FMD). Η FMD είναι μια μη αθηρωματική αγγειακή νόσος που οδηγεί σε στένωση, ανεύρυσμα και διαχωρισμό, κυρίως των νεφρικών αρτηριών.²² Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν την πιθανότητα συμμετοχής της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στον εκφυλισμό της ανιούσας θωρακικής αορτής. Ωστόσο, στη βιβλιογραφία δεν εντοπίστηκε σύνδεση των υπόλοιπων διαφορετικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών με το ανεύρυσμα. Η μεταβολή των πρωτεϊνών αυτών είναι στατιστικά σημαντική και η περαιτέρω μελέτη τους θα μπορούσε να αποσαφηνίσει τη διαφορά των επιπέδων τους μεταξύ φυσιολογικής και ανευρυσματικής ανιούσας αορτής, καθώς και του ρόλου που μπορεί να κατέχουν στη διάταση του αορτικού τοιχώματος. Επιπλέον το ένζυμο φωσφολιπάση A2 (sPLA2) παρουσίαζε σημαντική μεταβολή μεταξύ των ατόμων αυτών των 2 ομάδων. Συμμετέχει στη ρύθμιση του μεταβολισμού των φωσφολιπιδίων σε βιομεμβράνες και δρα ως πρόσδεμα για τις ιντεγκρίνες, τις οποίες κα ενεργοποιεί. Το ένζυμο sPLA2 βρέθηκε αυξημένο στον ορό ανδρών με ανεύρυσμα της κοιλιακής αορτής αλλά δεν εντοπίστηκε συμμετοχή αυτού στη διάταση της αορτής.²³

Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται οι πρωτεΐνες που μεταβάλλονται στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ομάδων B και Γ, δηλαδή ατόμων με διάταση του αορτικού τοιχώματος 4-5 cm και ατόμων με διάταση >5 cm αντίστοιχα.

Gene name	Protein name	Log ₂ ratio	Pvalue
RAB36	Ras-related protein Rab-36	-1,695972069	2,18131E-08
NA	Ig lambda chain V-III region SH	-1,537127077	3,92094E-07

FAM83E	Protein FAM83E	-1,242606809	4,11734E-05
IGLL5	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	-1,185183399	9,18051E-05
TMPRSS11A	Transmembrane protease serine 11A	-1,057062116	0,000485797
IGHG1	Ig gamma-1 chain C region	-0,911667012	0,002624182
VILL	Villin-like protein	1,415308405	3,00122E-06
KRT77	Keratin, type II cytoskeletal 1b	1,088405762	0,000328267
FBXO15	F-box only protein 15	0,907684937	0,002739949
TEKT3	Tektin-3	0,854909492	0,004782448

Πίνακας 5 Πρωτεΐνες που μεταβάλλονται στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ομάδων Β και Γ

Στον Πίνακα 6 καταγράφονται οι πρωτεΐνες, οι οποίες ταυτοποιήθηκαν και παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων τους μεταξύ των ατόμων των ομάδων Α και Γ, δηλαδή ατόμων χωρίς διάταση του τοιχώματος της αορτής και ατόμων με διαγνωσμένο ανεύρυσμα > 5 cm.

Gene name	Protein name	Log ₂ ratio	Pvalue
DST	Dystonin	-1,388120541	7,35767E-05
DNHD1	Dynein heavy chain domain-containing protein 1	-1,242339324	0,000388068
OR1M1	Olfactory receptor 1M1	-1,230524141	0,000440874
IDH3A	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	-1,044328864	0,002858497

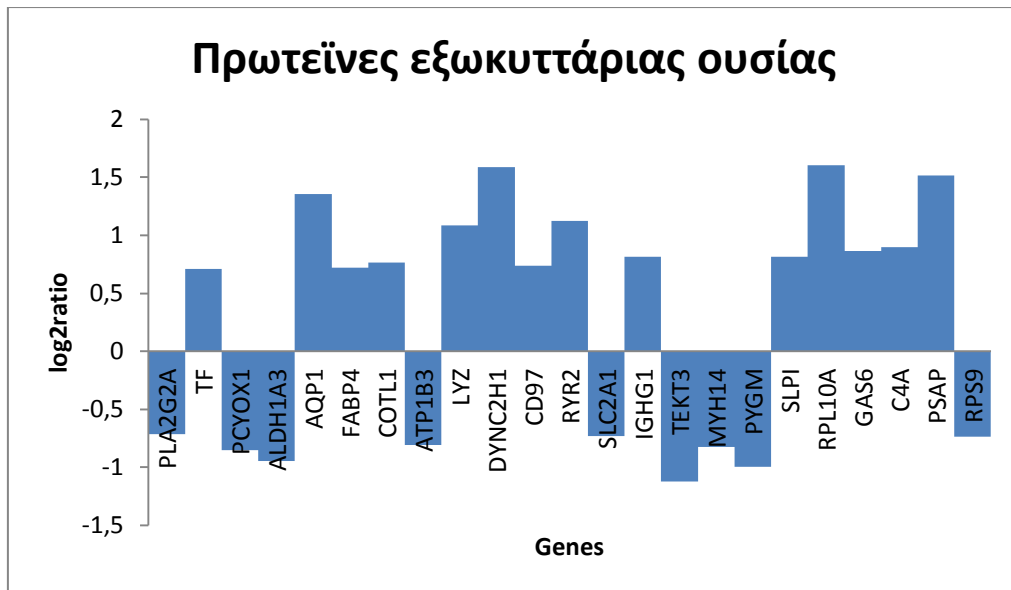
NA	Ig lambda chain V region 4A	-0,9587934	0,006176274
FEZF2	Fez family zinc finger protein 2	2,14212371	9,48675E-10
NOTCH2	Neurogenic locus notch homolog protein 2	2,012408667	9,0651E-09
MIB2	E3 ubiquitin-protein ligase MIB2	1,886742444	7,10654E-08
RPL10A	60S ribosomal protein L10a	1,63589984	2,98193E-06
AQP1	Aquaporin-1	1,587022052	5,82986E-06

Πίνακας 6 Πρωτεΐνες που μεταβάλλονται στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ομάδων Α και Γ

Οι παραπάνω πρωτεΐνες παρουσιάζουν σημαντική μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης τους μεταξύ των ατόμων χωρίς διάταση του αορτικού τοιχώματος, των ατόμων με διαγνωσμένο ανεύρυσμα ανιούσας αορτής αλλά χωρίς ένδειξη χειρουργικής επέμβασης και ατόμων με διαγνωσμένο ανεύρυσμα και ένδειξη χειρουργικής επέμβασης. Πιο συγκεκριμένα, μεταξύ των ομάδων Α και Β και των ομάδων Α και Γ παρατηρείται σημαντική μεταβολή των FEZF2, NOTCH2, MIB2, PL10A. Η μελέτη των πρωτεϊνών αυτών θα μπορούσε να προσδιορίσει το ρόλο τους στο μηχανισμό ανάπτυξης του ανευρύσματος της ανιούσας θωρακικής αορτής, εξηγώντας την μεταβολή των επιπέδων τους. Η μεταβολή των πρωτεϊνών αυτών θα μπορούσε να αποτελέσει ένδειξη της διάτασης του φυσιολογικού τοιχώματος της ανιούσας αορτής. Όπως αναμενόταν, μεταξύ των πρωτεϊνών αυτών, υπήρχαν αρκετές δομικές πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας (collagen, keratin), πρωτεΐνες του συμπληρώματος (complement C1q, C4, C3, complement factor H), πρωτεάσες (Transmembrane protease serine 11A), διάφορα άλλα ένζυμα (Glycogen phosphorylase) και κυττοκίνες (C-C chemokine receptor type 7). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ένα μέρος των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν αποτελούν πρωτεΐνες που ανήκουν στην κατηγορία των συστατικών των κυτταρικών μεμβρανών, οι οποίες συμμετέχουν στην κυτταρική προσκόλληση και επικοινωνία.

5.5 Βιοπληροφορική ανάλυση λειτουργικότητας πρωτεϊνών

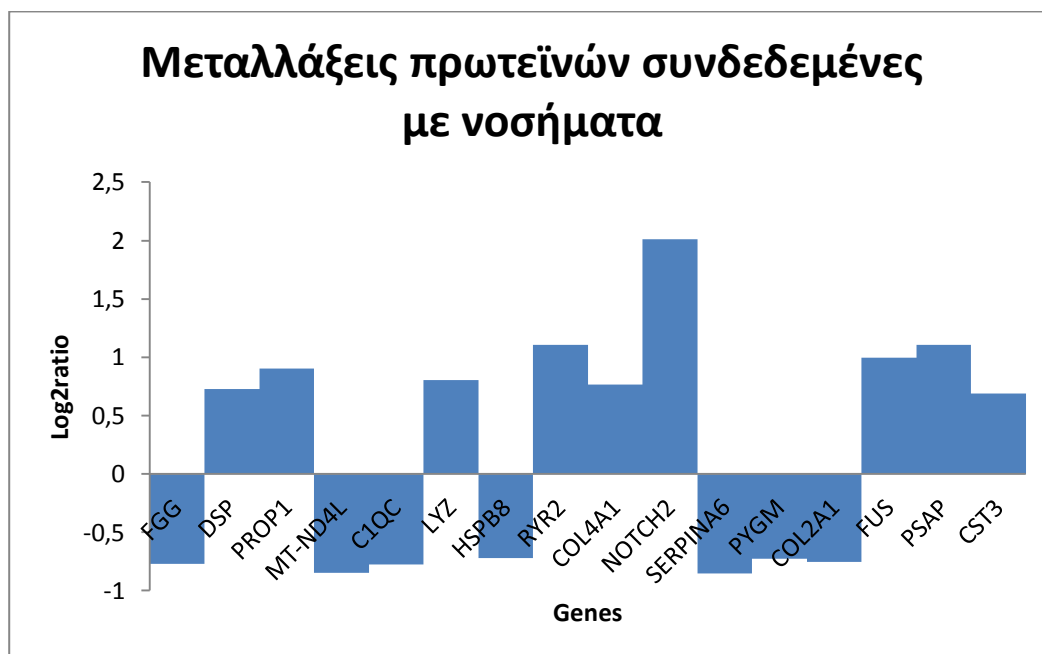
Η περαιτέρω επεξεργασία των αποτελεσμάτων προκειμένου οι διαφορεικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν να ενταχθούν σε συστηματικές λειτουργικές κατηγοριοποιήσεις επιτεύχθηκε μέσω του προγράμματος DAVID και της βάσης δεδομένων Gene Ontology. Μεταξύ των ατόμων των ομάδων A και B (άτομα χωρίς διάταση της αορτής και άτομα με διάταση της αορτής 4-5 cm) από τις 61 πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν και παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική μεταβολή, οι 21 πρωτεΐνες αποτελούν συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (εικόνα 12). Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται οι διαφορεικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες μεταξύ των ομάδων A και B, οι οποίες περιέχονται στην εξωκυττάρια ουσία. Στις πρωτεΐνες αυτές συγκαταλέγονται πρωτεάσες, αναστολείς πρωτεασών και πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας ουσίας. Επίσης, παρατηρείται υπερέκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών του αίματος, όπως της σεροτρανσφερίνης(TF). Όπως, έχουμε ήδη αναφέρει η εξωκυττάρια ουσία συνεισφέρει στη δύναμη και την αντοχή της αορτής στην πίεση του αίματος. Οι μεταβολές των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας μεταξύ ατόμων χωρίς διάταση του αορτικού τοιχώματος και ατόμων με διάταση της ανιούσας αορτής υποδεικνύει τη συμμετοχή τους στην ανάπτυξη του ανευρύσματος της ανιούσας θωρακικής αορτής.



Εικόνα 12 Μεταβολές στα επίπεδα πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας μεταξύ των ομάδων Α και Β

Μεταξύ των ατόμων χωρίς διάταση της ανιούσας θωρακικής αορτής (ομάδα Α) και των ατόμων με διαγνωσμένο ανεύρυσμα μεγαλύτερο των 5 cm (ομάδα Β) από τις 58 πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν ότι παρουσιάζουν διαφοροποίηση στην έκφραση τους, οι 16 από αυτές αποτελούν πρωτεΐνες όπου μεταλλάξεις τους έχουν συσχετισθεί με νοσήματα που έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ανευρυσμάτων και γενικότερα καρδιαγγειακών παθήσεων (εικόνα 13). Πιο συγκεκριμένα, η desmoplakin, που βρέθηκε να μεταβάλλεται σε άτομα της ομάδας Β, έχει συνδεθεί με το σύνδρομο Carvajal. Το σύνδρομο Carvajal, το οποίο προκαλείται από υπολειπόμενες μεταλλάξεις στην desmoplakin οδηγεί σε καρδιομυοπάθειες με ιδιαίτερα παθολογικά χαρακτηριστικά.²⁴ Η μελέτη των μεταλλάξεων στην πρωτεΐνη αυτή θα μπορούσε να φανερώσει τη συμμετοχή της στην ανάπτυξη των ανευρυσμάτων. Επιπλέον, μεταλλάξεις στο γονίδιο COL4A1, το οποίο βρέθηκε να είναι διαφοροποιημένο μεταξύ των ομάδων Α και Β, έχουν συσχετιστεί με το σύνδρομο HANAC (Κληρονομική Αγγειοπάθεια, Νεφροπάθεια, Ανευρύσματα, και Κράμπες).²⁵ Η Cystatin C (CT3), που διαφοροποιείται μεταξύ των ομάδων Α και Β, είναι ένα φυσικός αναστολέας της κυστεϊνικής πρωτεάσης σε ανθρώπους. Ανεπάρκεια Cystatin C στον ορό ανθρώπων έχει συνδεθεί με την αθηροσκλήρωση και τα αορτικά ανευρύσματα. Η πρωτεΐνη αυτή έχει βρεθεί επίσης σε χαμηλά επίπεδα στον ορό ασθενών με τη νόσο Kawasaki. Η Cystatin C έχει προταθεί για τη διάγνωση μεγάλου εύρους ασθενειών, όπως της αθηροσκλήρωσης, της νόσου του Alzheimer, των αγγειακών ανευρυσμάτων και άλλων νευροεκφυλιστικών

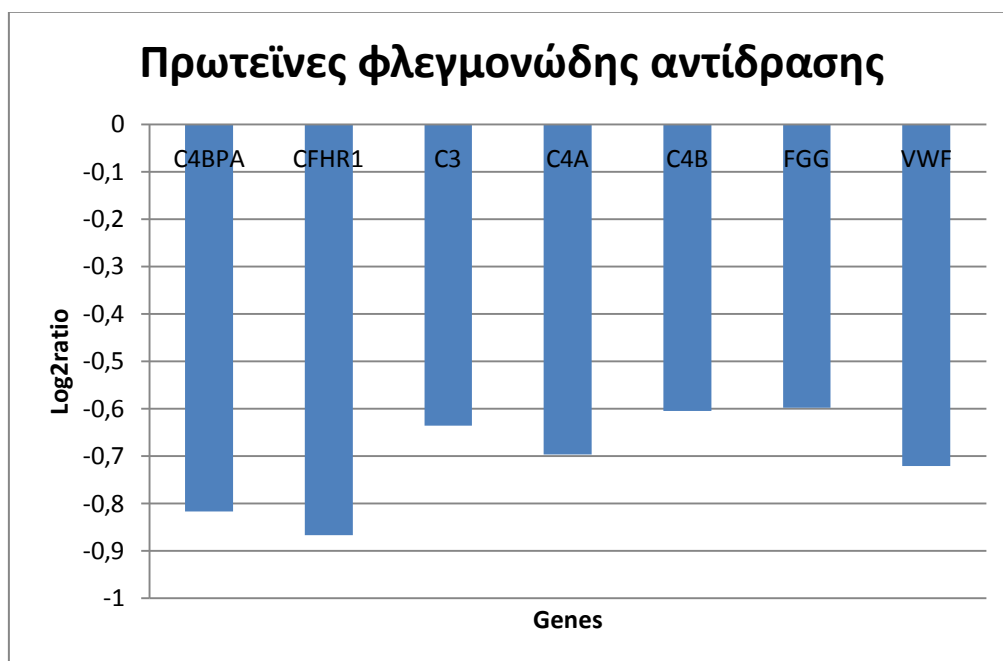
ασθενειών.²⁶ Η αναλυτικότερη μελέτη αυτών των πρωτεϊνών και των μεταλλαγμάτων τους θα αποσαφηνίσει το ρόλο τους ως έναυσμα για την ανάπτυξη των ανευρυσμάτων και γενικότερα των καρδιαγγειακών παθήσεων.



Εικόνα 13 Πρωτεΐνες που μεταβάλλονται στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ομάδων Α και Γ και οι μεταλλάξεις των πρωτεϊνών αυτών σχετίζονται με διάφορα νοσήματα

Τέλος, μεταξύ των ατόμων των ομάδων Β και Γ από τις 55 πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν και παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική μεταβολή, οι 9 πρωτεΐνες συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των πρωτεϊνών της οξείας φλεγμονώδης αντίδρασης και στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος (εικόνα 14). Σε άτομα με ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής, η αύξηση των επιπέδων IgG1, 2, και 3 μπορεί να είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση του συμπληρώματος μέσω της κλασικής οδού. Δεδομένου ότι το σύστημα συμπληρώματος είναι ένας από τους σημαντικότερους ενεργοποιητές της φλεγμονής, η παρουσία των υποτάξεων IgG μαζί με την αυξημένη C3 στο τοίχωμα του ανευρύσματος μπορεί να είναι ένας σημαντικός μηχανισμός προώθησης της πρωτεόλυση της εξωκυττάριας ουσίας σε ανευρυσματική κοιλιακή αορτή.²⁸ Στα άτομα της ομάδας Γ παρατηρείται καταστολή της έκφρασης των συστατικών του συμπληρώματος (C4BPA, C3, C4A, C4B), σε αντίθεση με τα άτομα της ομάδας Β, όπου το αορτικό τοίχωμα υφίσταται φλεγμονώδης εξεργασία μέσω της ενεργοποίησης της από τις πρωτεΐνες του συμπληρώματος. Οι μεταβολές στα επίπεδα

των πρωτεϊνών του συμπληρώματος μεταξύ ατόμων με διάταση αορτής >5 cm (ομάδα Γ) και ατόμων με διάταση στο αορτικό τοίχωμα 4-5 cm (ομάδα Β) υποδεικνύει τη φλεγμονώδη αντίδραση ως γενεσιουργό αιτία δημιουργίας ανευρυσμάτων μέσω φλεγμονώδης εξεργασίας των τοιχωμάτων της ανιούσας αορτής, που έχουν ως αποτέλεσμα τον εκφυλισμό του αορτικού τοιχώματος.



Εικόνα 14 Μεταβολές στα επίπεδα πρωτεϊνών της φλεγμονώδης αντίδρασης μεταξύ των ατόμων των ομάδων Β και Γ

5.6 Συζήτηση

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως τα ανευρύσματα της ανιούσας θωρακικής αορτής αποτελούν σημαντικούς παράγοντες θανάτου και νοσηρότητας στον Δυτικό κόσμο. Οι αδυναμίες και οι ατέλειες των απεικονιστικών μεθόδων, η γεωμετρική πολυπλοκότητα, αλλά και η εμφάνιση αορτικού διαχωρισμού σε μεγέθη μικρότερα, από τα συνήθη προτεινόμενα για χειρουργική αντιμετώπιση αναδεικνύουν την ανάγκη για μία πιο έγκαιρη και περισσότερο αξιόπιστη τεχνική διάγνωσης της πάθησης, η οποία επίσης θα παρέχει μία προσέγγιση στη διαπίστωση των παθογενετικών μηχανισμών. Για το σκοπό αυτό, εφαρμόστηκε η μέθοδος της

πρωτεομικής ανάλυσης σε δείγματα ιστών που λήφθηκαν από το τοίχωμα της ανιούσας θωρακικής αορτής.

Στην παρούσα μελέτη για τη μέθοδο της πρωτεομικής ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε τμήμα ιστού από το αορτικό τοίχωμα. Ο αγγειακός ιστός αποτελεί πλούσια πηγή πρωτεϊνών που αντανακλούν την κλινική κατάσταση του ασθενή. Στο μέλλον η χρήση αγγειακού ιστού για πρωτεομική ανάλυση θα συντελέσει στην κατανόηση των μηχανισμών πρόκλησης των καρδιαγγειακών παθήσεων και την ανεύρεση πιθανών βιοδεικτών για έγκαιρη διάγνωση.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε επέτρεψε την συγκριτική ανάλυση του πρωτεόματος των τριών ομάδων που μελετήθηκαν. Επιτεύχθηκε η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση πολλών πρωτεϊνών που παρουσίαζαν σημαντικές στατιστικά μεταβολές μεταξύ των τριών ομάδων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μεταβολή των FEZF2, NOTCH2, MIB2, PL10A μεταξύ των ομάδων Α και Β και μεταξύ των Α και Γ. Πολλές από τις πρωτεΐνες που παρουσιάζουν διαφορές στα επίπεδα έκφρασής τους αποτελούν πρωτεΐνες του συμπληρώματος, επιβεβαιώνοντας τη συμμετοχή της φλεγμονώδης αντίδρασης στον παθογενετικό μηχανισμό του ανευρύσματος. Επιπλέον, πολλές από τις διαφορεικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες αποτελούσαν συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, υποδεικνύοντας ότι η διατήρηση της είναι κρίσιμης σημασίας για τη διατήρηση του αορτικού τοιχώματος. Στατιστικά σημαντικές μεταβολές εντοπίστηκαν και σε πρωτεΐνες, των οποίων οι μεταλλάξεις έχουν συνδεθεί με νοσήματα που οδηγούν σε καρδιοαγγειακές παθήσεις.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα μελέτη, με την μεθοδολογία που περιγράφηκε, επιτεύχθηκε η διερεύνηση του πρωτεόματος του αορτικού τοιχώματος και η επαλήθευση των μεταβολών στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών μεταξύ της φυσιολογικής και της ανευρυσματικής ανιούσας θωρακικής αορτής. Η εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθόδου σε μεγαλύτερο εύρος δειγμάτων θα έχει ως αποτέλεσμα την ανεύρεση βιοδεικτών για την έγκαιρη διάγνωση και παρακολούθηση της διάτασης της ανιούσας αορτής, καθώς και των μηχανισμών που συντελούν στη γένεση και αύξηση του ανευρύσματος.

Βιβλιογραφία

1. Μπαλτόπουλος Π., Ιατρικές εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης, Ανατομική του ανθρώπου, Δομή και Λειτουργία
2. J Eleftheriades Thoracic aortic aneurysms. Reading the enemy's playbook. *Yale Journal of Biology and Medicine* 81(2008) 175-186.
3. El-Hamamsy I, Yacoub MH. Cellular and molecular mechanisms of thoracic aortic aneurysms. *Nat Rev Cardiol.* 2009 Dec; 6(12):771-86. doi: 10.1038/nrcardio.2009.191. Epub 2009 Nov 3.
4. Papathanasiou A, Milionis H, Toumpoulis IK, Kalantzi K, Katsouras C, Pappas K, Michalis LK, Goudevenos J. Smoking cessation reduces long-term mortality and the need of repeat interventions after coronary artery bypass grafting. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation*, 2007;14:448-450.
5. Alessandro Parolaria, Elena Tremolic, Paola Songiab, Alberto Pilozzia, Roberto Di Bartolomeoe, Francesco Alamannia,d, Carlos A. Mestresf and Davide Pacinie Biological features of thoracic aortic diseases. Where are we now, where are we heading to: established and emerging biomarkers and molecular pathways? *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 44 (2013) 9–23.
6. What are Biomarkers? Kyle Strimbu and Jorge A. Tavel, M.D. Division of Clinical Research, National Institute of Allergy and Infectious Diseases National Institutes of Health, Bethesda, MD.
7. Lei Zhang, Ming-fang Liao, Lei Tian, Si-li Zou, Qing-sheng Lu, Jun-min Bao, Yi-fei Pei, Zai-ping Jing, Overexpression of interleukin-1b and interferon-g in type I thoracic aortic dissections and ascending thoracic aortic aneurysms: possible correlation with matrix metalloproteinase-9 expression and apoptosis of aortic media cells.
8. Wim K. Lagrand , Cees A. Visser , Willem T. Hermens , Hans W.M. Niessen, Freek W.A. Verheugt, Gert-Jan Wolbing and C. Erik Hack C-reactive protein as a cardiovascular risk factor: more than an epiphenomenon. *Circulation.* 1999; 100:96-102.
9. Nagase H, Woessner JF Jr: Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 21491-494.
10. Tuija Huusko, MSc,a Tuire Salonurmi, PhD,a Panu Taskinen, MD, PhD,b Johanna Liinamaa, MD, PhD,c Tatu Juvonen, MD, PhD,d Markku Savolainen, MD, PhD,a and Sakari Kakko, MD, PhD, Elevated messenger RNA expression and plasma protein levels of osteopontin and matrix metalloproteinase types 2 and 9 in patients with ascending aortic aneurysms
11. Fountoulakis, M. (2004) Application of proteomics technologies in the investigation of the brain. *Mass Spectrom Rev* 23, 231-258.
12. Veenstra T.D., Conrads, T.P., Hood, B.L., Avellino, A.M., Ellenbogen, R.G. (2005) Biomarkers: Mining the Biofluid Proteome. *Molecular & Cellular Proteomics*, Vol. 4, No. 4, pp. 409-418.

13. Nordon IM, Brar R, Hinchliffe RJ, Cockerill G, Thompson MM. Proteomics and pitfalls in the search for potential biomarkers of abdominal aortic aneurysms. *Vascular*. 2010; 8(5):264–268.
14. Blanco-Colio LM, López JA, Martínez-Pinna Albar R, Egido J, Martín-Ventura JL. Vascular proteomics, a translational approach: from traditional to novel proteomic techniques. *Expert Rev Proteomics*. 2009; 6(5):461–464.
15. Kazumi Satoh,¹ Tomoko Maniwa,¹ Teiji Oda,² and Ken-ichi Matsumoto corresponding author¹. Proteomic profiling for the identification of serum diagnostic biomarkers for abdominal and thoracic aortic aneurysms Quantitative Proteomics Analysis by Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation Identified Lumican as a Potential Marker for Acute Aortic Dissection *Proteome Sci*. 2013; 11: 27
16. J. H. Peters, M. N. Grote, N. E. Lane, and R. J. Maunder, “Changes in plasma fibronectin isoform levels predict distinct clinical outcomes in critically III patients,” *Biomarker Insights*, vol. 6, pp. 59–68, 2011.
17. Muge Serhatli, Kemal Baysal, Ceyda Acilan, Eylem Tuncer, Seldag Bekpinar,|| and Ahmet Tarik Baykal, Proteomic Study of the Microdissected Aortic Media in Human Thoracic Aortic Aneurysms. *J Proteome Res*. 2014 Sep 29.
18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*; 72: 248-54, 1976.
19. Isobaric Labeling-Based Relative Quantification in Shotgun Proteomics, Navin Rauniyar and John R. Yates, III, Department of Chemical Physiology, The Scripps Research Institute, 10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037.
20. Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications, John R. Yates, Cristian I. Ruse, and Aleksey Nakorchevsky, Department of Chemical Physiology and Cell Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, California 92037.
21. The Gene Ontology Consortium (2004), ‘The Gene Ontology (GO) database and informatics resource’, *Nucleic Acids Res.*, Vol. 32, pp.D258–261.
22. Exome sequencing in seven families and gene-based association studies indicate genetic heterogeneity and suggest possible candidates for fibromuscular dysplasia, Kiando SR¹, Barlassina C, Cusi D, Galan P, Lathrop M, Plouin PF, Jeunemaitre X, Bouatia-Naji N.
23. Serum secreted phospholipase A2 is associated with abdominal aortic aneurysm presence but not progression, Golledge J¹, Mallat Z, Tedgui A, Norman PE.
24. Structural and molecular pathology of the heart in Carvajal syndrome, Kaplan SR¹, Gard JJ, Carvajal-Huerta L, Ruiz-Cabezas JC, Thiene G, Saffitz JE.

25. Novel COL4A1 mutations associated with HANAC syndrome: a role for the triple helical CB3[IV] domain, Plaisier E¹, Chen Z, Gekeler F, Benhassine S, Dahan K, Marro B, Alamowitch S, Paques M, Ronco P.
26. Decreased levels of cystatin C, an inhibitor of the elastolytic enzyme cysteine protease, in acute and subacute phases of kawasaki disease, Gupta-Malhotra M¹, Levine DM, Cooper RS, Zabriskie JB.
27. Kuby, Thomas J. Kindt/Richard A. Goldsby/Barbara A. Osborne, Επιμέλεια ελληνικής έκδοσης: Αικατερίνη Γαϊτανάκη, Κωνσταντίνος Μπαξεβάνης. Εκδόσεις Πασχαλίδης, Ανοσολογία
28. Complement activation and subclassification of tissue immunoglobulin G in the abdominal aortic aneurysm, Capella JF¹, Paik DC, Yin NX, Gervasoni JE, Tilson MD.
29. Brown T.A. Γονιδιώματα. Εκδόσεις Πασχαλίδης 2010, Επιμέλεια ελληνικής έκδοσης Παπαβασιλείου Α., Σταματόπουλος Γ., Ανάγνου Ν.