



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

Διευθύντρια: Καθηγήτρια Ασπασία Τσέζου



ΑΓΓΕΙΟΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: Καθηγητής Αθανάσιος Δ. Γιαννούκας

Διδακτορική Διατριβή

**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΑΝΕΥΡΥΣΜΑΤΟΣ
ΚΟΙΛΙΑΚΗΣ ΑΟΡΤΗΣ»**

υπό

ΕΥΑΝΘΙΑΣ ΜΟΥΡΜΟΥΡΑ

Μοριακή Βιολόγος

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2016

© 2016 Ευανθία Μουρμούρα

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν. 5343/1932).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (14^η/20-07-2016 ΓΣΕΕΣ):

- 1^{ος} Εξεταστής**
(Επιβλέπουσα) Δρ. Ασπασία **Τσέζου**
Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2^{ος} Εξεταστής** Δρ. Αθανάσιος **Γιαννούκας**
Καθηγητής Αγγειοχειρουργικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 3^{ος} Εξεταστής** Δρ. Μαρία **Τζέτη**
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών
- 4^{ος} Εξεταστής** Δρ. Κωνσταντίνος **Μαλίζος**
Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 5^{ος} Εξεταστής** Δρ. Φίλιππος **Τρυποσκιάδης**
Καθηγητής Καρδιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 6^{ος} Εξεταστής** Δρ. Κωνσταντίνος **Δήμας**
Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 7^{ος} Εξεταστής** Δρ. Βαρβάρα **Τραχανά**
Επίκουρος Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας σε συνεργασία με την Αγγειοχειρουργική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

Για την περάτωση της διδακτορικής μου διατριβής οφείλω να ευχαριστήσω ολόψυχα την επιβλέπουσα Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής κυρία Ασπασία Τσέζου, για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ μαζί της, για την άρτια επιστημονική καθοδήγηση και εμπιστοσύνη που μου έδειξε, αλλά και για την κατανόηση και υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Αγγειοχειρουργικής κύριο Αθανάσιο Γιαννούκα για την άψογη συνεργασία μας και τη συμβολή του στην εργασία. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής κυρία Μαρία Τζέτη για την επίβλεψη της διατριβής.

Επίσης οφείλω να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ιατροδικαστικής-Τοξικολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης κύριο Μιχαλοδημητράκη Εμμανουήλ για την άψογη συνεργασία μας στη συλλογή δειγμάτων φυσιολογικής κοιλιακής αορτής, καθώς επίσης και τον Επίκουρο Καθηγητή Ιατροδικαστικής-Τοξικολογίας κύριο Παύλο Παυλίδη του τμήματος Ιατρικής του Δημοκριτείου Πανεπιστημίου Θράκης για την άψογη συνεργασία μας στη συλλογή δειγμάτων αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής.

Οφείλω επιπλέον να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Φαρμακολογίας κυρία Άννα Βασιλάκη του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την καθοδήγησή της στα πειράματα των ανοσοϊστοχημικών μελετών, καθώς επίσης και την Καθηγήτρια κυρία Κοκκώνα Κουζή-Κολιάκου του Εργαστηρίου Ιστολογίας-Εμβρυολογίας και Ανθρωπολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης για την ιστολογική εκτίμηση των δειγμάτων ανευρυσματικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής: τον Καθηγητή Ορθοπαιδικής κύριο Κωνσταντίνο Μαλίζο, τον Καθηγητή Καρδιολογίας κύριο Φίλιππο Τρυποσκιάδη, την Επίκουρο Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας κυρία Βαρβάρα Τραχανά και τον Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακολογίας κύριο Κωνσταντίνο Δήμα, για την πρόθυμη συμμετοχή τους στην κρίση της διδακτορικής μου διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά όλους τους συναδέλφους Βιολόγους του Εργαστηρίου Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας με τους οποίους συνεργάστηκα αρμονικά όλα αυτά τα χρόνια και ιδιαίτερα τους: Ιωάννα Παπαθανασίου, Φωτεινή Κωστοπούλου, Τιμόκλεια Ορφανίδου, Παλιανοπούλου Μαρία, Βασίλη Παπανικολάου και Βασιλική Γκρέτση. Επίσης ευχαριστώ θερμά και όλους τους συνεργάτες της Αγγειοχειρουργικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας για την άψογη συνεργασία μας στη συλλογή των δειγμάτων.

Τις μεγαλύτερες ευχαριστίες μου εκφράζω στους γονείς μου Δημήτρη και Μαρία και στον αδερφό μου Βασίλη, για την αμέριστη συμπαράσταση και τη συνεχή υποστήριξη και ενθάρρυνση καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής.

Ευανθία Μουρμούρα

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

ΕΥΑΝΘΙΑ ΜΟΥΡΜΟΥΡΑ

Προσωπικές πληροφορίες

Ημερομηνία γέννησης: 29 Οκτωβρίου 2015

Τόπος γέννησης: Λάρισα

Διεύθυνση: Μακρυγιάννη 35, Λάρισα

Τηλέφωνο επικοινωνίας: +30 694 702 2917

Email: e.mourmoura@hotmail.com

Εκπαίδευση

Δεκέμβριος 2010 – σήμερα: Υποψήφια Διδάκτωρ του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θέμα διατριβής: «Γενετική διερεύνηση ανευρύσματος κοιλιακής αρτηρίας».

2009 - 2010: Δίπλωμα Μεταπτυχιακών Σπουδών, εξειδίκευσης «Βιολογία της Αναπαραγωγής» του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Γενικός βαθμός «Άριστα»

Διπλωματική εργασία: «Γονίδια που ενέχονται στην εμφύτευση στην εξωσωματική».

Εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Ασπασία Τσέζου, Καθ.Ιατρικής Γενετικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

2003 - 2009: Πτυχίο Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης. Γενικός βαθμός «Λίαν Κακώς»

Πτυχιακή εργασία: «Προσδιορισμός των επιπέδων sVCAM σε διαβητικούς ασθενείς».

Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Δημοκρετίου Πανεπιστημίου Θράκης. Επιβλέπων καθηγητής: Κωνσταντίνος Αναγνωστόπουλος, Αν.Καθ. Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Δημοκρετίου Πανεπιστημίου Θράκης.

Εργαστηριακή εμπειρία

Σεπτέμβριος 2010 – σήμερα: Εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας.

2006 – 2008: Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Δημοκριτείου Πανεπιστημίου Θράκης.

Γνώσεις τεχνικών Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής

- Επεξεργασία αορτικού ιστού – Διαχωρισμός στοιβάδων αορτής
- Καλλιέργειες κυττάρων (κύτταρα από συμπαγή ιστό, κύτταρα από περιφερικό αίμα και μυελό των οστών)
- Εκχύλιση DNA, RNA και πρωτεϊνών από περιφερικό αίμα, κύτταρα σε καλλιέργεια, φρέσκο ιστό.
- Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) και Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)
- Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) και σχεδιασμός εκκινητών PCR
- Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western Blot)
- Ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσροφητική μέτρηση (ELISA)
- Τεχνικές ανοσοϊστοχημείας και ανοσοφθορισμού
- Γονιδιακή αποσιώπηση με τη χρήση μικρών παρεμβατικών μορίων RNA
- Χειρισμός κρουτόμου
- Χειρισμός οπτικού μικροσκοπίου και μικροσκοπίου φθορισμού
- Παρασκευή και ανάλυση χρωμοσωμάτων
- Φθορίζων in situ υβριδισμός (FISH)

Συμμετοχή σε Ερευνητικά Προγράμματα

Ιούλιος 2013 – Μάιος 2015: «Πρόγραμμα προσυμπτωματικού ελέγχου (screening) για ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής (ΑΚΑ) στον πληθυσμό της κεντρικής Ελλάδας».

Επιστημονικός Υπεύθυνος: Αθανάσιος Δ. Γιαννούκας, Καθ. Αγγειοχειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Φεβρουάριος 2015 – Οκτώβριος 2015: «Κρήπις: Μελέτη γενετικών παραγόντων που ενέχονται σε παθήσεις αγγείων και σκελετού». Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης, Ινστιτούτο Έρευνας και Τεχνολογίας Θεσσαλίας, Τομέας Βιοϊατρικής

Ιανουάριος 2016 – Αύγουστος 2016: «Εσωτ. Έργο Υποστήριξης Έρευνας PAR: Παθήσεις αγγείων και σκελετού». Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης, Ινστιτούτο Έρευνας και Τεχνολογίας Θεσσαλίας, Τομέας Βιοϊατρικής

Επιστημονικός Υπεύθυνος: Μαλίζος Κωνσταντίνος, Καθ. Ορθοπαιδικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ανακοινώσεις

- Αναρτώμενη ανακοίνωση: «Ανεύρησμα κοιλιακής αορτής: παθοφυσιολογία και χαρακτηρισμός των λείων μυϊκών κυττάρων του ανευρύσματος». Κελεσίδου Β, **Μουρμούρα Ε**, Γιαννούκας Α, Τσέζου Α. 20^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδας (2014)
- Αναρτώμενη ανακοίνωση: «Toll- Like Receptors And Susceptibility To Bone Infections». Fotini Kostopoulou, Ioanna Papathanasiou, Lydia Anastasopoulou, Chrisovalantis Aidarinis, **Evanthia Mourmoura**, Konstantinos Malizos, Aspasia Tsezou 34th Annual Meeting of the European Bone and Joint Infection Society, Estoril, Portugal (2015)
- Αναρτώμενη ανακοίνωση: «MicroRNAs as Biomarkers for Early Detection of Bacterial Periprosthetic Joint Infections». **Mourmoura Evanthia**, Malizos Konstantinos, Varitimidis Sokratis, Stephanou Nikolaos, Papathanasiou Ioanna, Ntoumou Eleni, Anastasopoulou Lydia, Tsezou Aspasia 35th Annual Meeting of the European Bone and Joint Infection Society, Oxford (2016)

Δημοσιεύσεις

- «Evidence of deregulated Cholesterol Efflux in Abdominal Aortic Aneurysm» **Evanthia Mourmoura**, Anna Vasilaki, Athanasios Giannoukas, Emmanouel Michalodimitrakis, Pavlos Pavlidis, Aspasia Tsezou *Acta Histochemica. 2016. Mar;118(2):97-108*

Ξένες γλώσσες – Η/Υ

- Αγγλικά επιπέδου Proficiency
- Γερμανικά επιπέδου B2 Zertifikat
- Γνώση στατιστικού πακέτου SPSS και GraphPad Prism
- Microsoft Word, Excel, Access, Powerpoint, Photoshop
- Χειρισμός προγραμμάτων ανάλυσης εικόνων μικροσκοπίου (Image J, Ikaros, Isis)
- Εξοικείωση με τις βάσεις δεδομένων: NCBI, EMBL, GenBank και Swiss-Prot

**"ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ
ΑΝΕΥΡΥΣΜΑΤΟΣ ΚΟΙΛΙΑΚΗΣ ΑΟΡΤΗΣ"**

ΕΥΑΝΘΙΑ ΜΟΥΡΜΟΥΡΑ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2016

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Δρ. Ασπασία Τσέζου**, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας- **(Επιβλέπουσα)**,
2. **Δρ. Αθανάσιος Γιαννούκας**, Καθηγητής Αγγειοχειρουργικής, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Δρ. Μαρία Τζέτη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής (ΑΚΑ) αποτελεί εκφυλιστική νόσο της αορτής και ορίζεται ως η εντοπισμένη αύξηση της διαμέτρου αυτής κατά 50% σε σύγκριση με τη φυσιολογική της διάμετρο. Αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα υγείας δεδομένου ότι συνδέεται με υψηλά ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας. Επιδημιολογικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η νόσος πλήττει το 4-8% του πληθυσμού ηλικίας άνω των 60 ετών, ενώ το ποσοστό θνησιμότητας λόγω ρήξης του ανευρύσματος ανέρχεται στο 85-90%. Πρόκειται για πολυπαραγοντική ασθένεια, με την προχωρημένη ηλικία, το φύλο και το κάπνισμα να συγκαταλέγονται μεταξύ των βασικότερων παραγόντων κινδύνου για την εμφάνιση και εξέλιξή της. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν δεδομένα τα οποία αναδεικνύουν τη γενετική συνιστώσα ως σημαντικό επιβαρυντικό παράγοντα στην εμφάνιση του ΑΚΑ, καθώς φαίνεται ότι το 15-20% των ατόμων με ΑΚΑ παρουσιάζει οικογενειακό ιστορικό ανευρύσματος.

Μέχρι σήμερα η θεραπεία του ΑΚΑ περιορίζεται στη χειρουργική του αντιμετώπιση, η οποία περιλαμβάνει την ανοιχτή εκτομή του ανευρύσματος και την ενδαγγειακή του αποκατάσταση με τοποθέτηση συνθετικού μοσχεύματος. Συνεπώς καθίσταται επιτακτική η ανάγκη για ανεύρεση προγνωστικών δεικτών που θα δώσει το έναυσμα για την ανάπτυξη πιθανών θεραπευτικών βιολογικών προσεγγίσεων με σκοπό την αναστολή της εξέλιξης της νόσου.

Όσο αφορά στην παθογένεια του ΑΚΑ πρόκειται για μία πολύπλοκη διαδικασία, ενώ οι μηχανισμοί που ενέχονται στην ανάπτυξή του παραμένουν μέχρι σήμερα αδιευκρίνιστοι σε μεγάλο βαθμό. Έρευνες υποστηρίζουν ότι στον παθοφυσιολογικό μηχανισμό της νόσου ενέχεται αφενός η χρόνια φλεγμονή με επακόλουθη συσσώρευση φλεγμονωδών κυττάρων στο αορτικό τοίχωμα και αφετέρου η αποικοδόμηση του κολλαγόνου και της ελαστίνης, δομικών στοιχείων που συμβάλλουν στην ελαστικότητα και τη δυναμική του τοιχώματος της αορτής, ως αποτέλεσμα της ενίσχυσης πρωτεολυτικών μηχανισμών. Σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του ανευρύσματος φαίνεται να διαδραματίζει και η απόπτωση των λείων μυϊκών κυττάρων (ΛΜΚ), που εντοπίζονται στο μεσαίο χιτώνα της αορτής, η οποία σε συνδυασμό με τη φλεγμονή και την αποδόμηση του κολλαγόνου και της ελαστίνης, έχει ως αποτέλεσμα την τοπική λέπτυνση του αορτικού τοιχώματος, όπου με τη ροή του αίματος αυτό διογκώνεται και δημιουργείται το ανεύρυσμα.

Επιπροσθέτως ενδιαφέρον παρουσιάζουν βιβλιογραφικά δεδομένα τα οποία αναδεικνύουν την ύπαρξη και ρήξη της αθηρωματικής πλάκας ως έναν άλλο πιθανό παθογενετικό μηχανισμό του ανευρύσματος. Η συγκεκριμένη υπόθεση αποτέλεσε το

εναρκτήριο λάκτισμα και έστρεψε το ενδιαφέρον ερευνητικών ομάδων στη σχέση μεταξύ ανευρυσματικής και αθηρωματικής νόσου. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές φαίνεται ότι οι δύο παθήσεις παρουσιάζουν κοινά στοιχεία καθώς διαθέτουν κοινούς προδιαθεσικούς παράγοντες, ενώ επίσης έρευνες έχουν δείξει ότι συχνό εύρημα του αορτικού τοιχώματος ασθενών με ΑΚΑ αποτελεί η ύπαρξη αθηρωματικών αλλοιώσεων. Η παθοφυσιολογία της αθηρωμάτωσης είναι συνυφασμένη με διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων, οι οποίες οδηγούν στο σχηματισμό ή/και ρήξη της αθηρωματικής πλάκας. Η διαταραχή του μεταβολισμού των λιπιδίων καθώς και του μηχανισμού εξόδου της χοληστερόλης έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση λιπιδίων και αφρωδών κυττάρων στο αορτικό τοίχωμα καθώς επίσης και τη φαινοτυπική διαφοροποίηση των ΛΜΚ διαδραματίζοντας με αυτόν τον τρόπο σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη της αθηρωματικής νόσου. Λαμβάνοντας υπ' όψιν τον παραλληλισμό των δύο παθήσεων, γονίδια που ενέχονται στους παραπάνω μηχανισμούς προσελκύουν το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας αναφορικά με την παθογένεια του ανευρύσματος.

Τα μέχρι σήμερα δεδομένα υποστηρίζουν ότι χαμηλά επίπεδα της λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (HDL) και υψηλά επίπεδα της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL) και σφιγγολιπιδίων στον ορό του αίματος έχουν συσχετιστεί με την παρουσία ανευρύσματος, ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι στατίνες χρησιμοποιούνται ευρέως για την αντιμετώπιση του ΑΚΑ καθώς σταθεροποιούν τα επίπεδα της χοληστερόλης στον ορό ασθενών. Οι παραπάνω μελέτες υποδεικνύουν ότι ο μεταβολισμός των λιπιδίων σχετίζεται με την παρουσία ανευρύσματος, χωρίς όμως μέχρι στιγμής να έχουν διαλευκανθεί οι μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων συμβάλλει στην παθογένεση αυτού.

Αντικείμενο της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η διερεύνηση του ρόλου των γονιδίων που ενέχονται στο μηχανισμό εκροής της χοληστερόλης στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής, καθώς και πιθανοί μηχανισμοί επιγενετικής ρύθμισης αυτών και τέλος η συμβολή του μηχανισμού εξόδου της χοληστερόλης στην παθογένεια της νόσου.

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής, τα οποία ελήφθησαν από ασθενείς που υπεβλήθησαν σε ανοιχτή χειρουργική επέμβαση αποκατάστασης του ανευρύσματος. Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν δείγματα φυσιολογικής κοιλιακής αορτής χωρίς ιστορικό ανευρύσματος και αθηρωματικών αλλοιώσεων, καθώς επίσης χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής ως θετικά δείγματα ελέγχου. Τα δείγματα της

ομάδας ελέγχου ελήφθησαν κατά τη νεκροψία εντός 12 ωρών από την ώρα θανάτου χωρίς χημική επεξεργασία.

Από τα δείγματα με ΑΚΑ και από τα δείγματα αορτής της ομάδας ελέγχου διερευνήθηκαν:

- η μεταγραφική έκφραση των γονιδίων των δύο υποτύπων του πυρηνικού υποδοχέα **LXR**, **LXRα** και **LXRβ**, καθώς και του γονιδίου-στόχου του LXR, της **ABCA1**, στο σύνολο του αορτικού τοιχώματος ανευρυσματικής, φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής (μέθοδος ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου, Real Time PCR).
- η μεταγραφική και πρωτεϊνική έκφραση των γονιδίων **LXRα** και **LXRβ**, καθώς και τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου **ABCA1** στον υποενδοθηλιακό χώρο (έσω και μεσαίος χιτώνας) του αορτικού τοιχώματος ανευρυσματικής, φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής (μέθοδος ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου, Real Time PCR και ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών, Western Blot).
- η ιστολογική κατανομή της έκφρασης των γονιδίων **LXRα**, **ABCA1** και **ΑροΑΙ** στους επιμέρους χιτώνες του αορτικού τοιχώματος των υπό μελέτη ιστών (σήμανση με αντισώματα έναντι των LXRα, ABCA1 και ΑροΑΙ).
- η εναπόθεση λιπιδίων στο αορτικό τοίχωμα (χρώση των τομών με τολουϊδίνη, TBO και Oil Red O).
- η παρουσία αφρωδών κυττάρων στο τοίχωμα της αορτής (χρώση των τομών με Oil Red O και σήμανση με αντισώματα έναντι της **CD68** και α-ακτίνης λείου μυϊκού τύπου, **α-SM**, χαρακτηριστικών πρωτεϊνών των μακροφάγων και λείων μυϊκών κυττάρων, αντιστοίχως).
- ο φαινότυπος των λείων μυϊκών κυττάρων στο τοίχωμα ανευρυσματικής, φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής με ανοσοανίχνευση της α-ακτίνης λείου μυϊκού τύπου και της βιμεντίνης (σήμανση των τομών με αντισώματα έναντι της α-SM και βιμεντίνης, χαρακτηριστικών πρωτεϊνών του συσταλτικού και συνθετικού φαινοτύπου, αντιστοίχως).
- η έκφραση του **miR-10b** στον υποενδοθηλιακό χώρο (έσω και μεσαίος χιτώνας) του αορτικού τοιχώματος ανευρυσματικής και φυσιολογικής κοιλιακής αορτής (μέθοδος ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου, Real Time PCR).
- ο ρόλος του **miR-10b** στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων **LXRα** και **ABCA1** σε λεία μυϊκά κύτταρα ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής (επίδραση με

τον αναστολέα του miR-10b σε καλλιέργειες λείων μυϊκών κυττάρων και ακολούθως μέθοδος ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου, Real Time PCR).

- ο ρόλος του miR-10b στο φαινότυπο των λείων μυϊκών κυττάρων ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής (επίδραση με τον αναστολέα του miR-10b σε καλλιέργειες λείων μυϊκών κυττάρων και ακολούθως μέθοδος ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών, Western Blot).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι **τα λιπίδια συσσωρεύονται στο αορτικό τοίχωμα κοιλιακής αορτής με ΑΚΑ**, ενώ δεν παρατηρούνται σε ιστούς φυσιολογικής κοιλιακής αορτής. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν εναποθέσεις λιπιδίων στον έσω και μεσαίο χιτώνα της ανευρυσματικής αορτής, γεγονός που παρέχει τις πρώτες ενδείξεις για διαταραχή του μεταβολισμού των λιπιδίων στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής.

Διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων στο τοίχωμα της αορτής σχετίζονται αφενός με το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων και αφετέρου με τη φαινοτυπική διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων από τον συσταλτικό στο συνθετικό φαινότυπο.

Σε ένα πρώτο στάδιο της μελέτης βασισμένοι στα ευρήματα σχετικά με την εναπόθεση λιπιδίων στο ΑΚΑ, διερευνήθηκε η παρουσία αφρωδών κυττάρων σε αυτό. Χρώση διαδοχικών τομών ανευρυσματικού αορτικού τοιχώματος με τη λιποδιαλυτή χρωστική Oil Red O και επακόλουθη σήμανσή τους με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών CD68 και α-ακτίνης λείου μυϊκού τύπου (α-SM) **έδειξε συσσώρευση λιπιδίων σε μακροφάγα και ΛΜΚ του ΑΚΑ**, αντιστοίχως, υποδηλώνοντας τη μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα όπως παρατηρείται και στην αθηρωμάτωση. Η παρουσία ΛΜΚ-αφρωδών κυττάρων στο ΑΚΑ παρότρυνε να γίνει προσδιορισμός του φαινοτύπου αυτών στην ανευρυσματική και φυσιολογική κοιλιακή αορτή. Τα αποτελέσματα της ιστολογικής μελέτης έδειξαν ότι σε ΛΜΚ του έσω και μεσαίου χιτώνα της αορτής με ανεύρυσμα, ομοίως με την αθηρωμάτωση, παρατηρήθηκε έκφραση της α-SM και της βιμεντίνης, χαρακτηριστικών πρωτεϊνών του συσταλτικού και συνθετικού φαινοτύπου αντιστοίχως, γεγονός που υποδεικνύει ότι **τη φαινοτυπική διαφοροποίηση των ΛΜΚ στην ανευρυσματική νόσο**. Αντιθέτως, δεν παρατηρήθηκε έκφραση της βιμεντίνης σε ιστούς φυσιολογικής αορτής υποδηλώνοντας ότι **σε φυσιολογική κατάσταση τα ΛΜΚ της κοιλιακής αορτής διατηρούν το συσταλτικό τους φαινότυπο**.

Ακολουθήσε μελέτη της μεταγραφικής έκφρασης γονιδίων που ενέχονται στο μηχανισμό εξόδου της χοληστερόλης και συγκεκριμένα των δύο υποτύπων του

πυρηνικού υποδοχέα LXR, LXRα και LXRβ, καθώς και του γονιδίου-στόχου του LXR, ABCA1. Παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασής τους μεταξύ ολόκληρου του αορτικού τοιχώματος ανευρυσματικής, φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής. Επίσης σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν και στα μεταφραφικά επίπεδα έκφρασης των ανωτέρω γονιδίων και μεταξύ των επιμέρους χιτώνων του αορτικού τοιχώματος. Αναλυτικότερα παρατηρήθηκαν σημαντικά **μειωμένα mRNA επίπεδα των γονιδίων LXRα, LXRβ και ABCA1 στον υποενδοθηλιακό χώρο (έσω και μεσαίος χιτώνας) της ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής συγκριτικά με αυτά της αθηρωματικής και φυσιολογικής κοιλιακής αορτής.**

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης των γονιδίων LXRα, ABCA1 και ApoA1 σε διαδοχικές τομές του αορτικού τοιχώματος και διαπιστώθηκε **μειωμένη πρωτεϊνική έκφραση του LXRα και της ABCA1 στο μεσαίο χιτώνα αορτής με ΑΚΑ** σε σχέση με το μεσαίο χιτώνα της φυσιολογικής και αθηρωματικής κοιλιακής αορτής, ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η **έκφραση των LXRα και ABCA1 ήταν δραματικά μειωμένη στον έσω χιτώνα της ανευρυσματικής αορτής σε σύγκριση με το μεσαίο χιτώνα αυτής.** Αντιθέτως, παρατηρήθηκαν **αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της ApoA1 στο αορτικό τοίχωμα αορτής με ΑΚΑ** συγκριτικά με τη φυσιολογική αορτή και ιδιαίτερος σε περιοχές όπου παρατηρήθηκαν οι εναποθέσεις των λιπιδίων. Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν **διαταραχή του μηχανισμού εξόδου της χοληστερόλης στο ΑΚΑ** και αποτελούν μια πιθανή εξήγηση της συσσώρευσης των λιπιδίων και της παρουσίας αφρωδών κυττάρων που παρατηρήθηκε στο τοίχωμα αορτής με ανεύρυσμα.

Στη συνέχεια στα πλαίσια διερεύνησης ενός πιθανού μηχανισμού ρύθμισης της έκφρασης των LXR και ABCA1, διερευνήθηκε η επιγενετική ρύθμιση τους μέσω μικρών μη κωδικών μορίων RNA (microRNA). Συγκεκριμένα διερευνήθηκε η έκφραση του miR-10b στον υποενδοθηλιακό χώρο (έσω και μεσαίος χιτώνας) ανευρυσματικής και φυσιολογικής αορτής, δεδομένου ότι στους συγκεκριμένους χιτώνες παρατηρήθηκε και η συσσώρευση λιπιδίων στο ανεύρυσμα. Επιπροσθέτως εξετάστηκε περαιτέρω ο ρόλος του συγκεκριμένου microRNA στην πάθηση ελέγχοντας αφενός την επίδραση του στην έκφραση των γονιδίων LXRα και ABCA1 που ενέχονται στην έξοδο της χοληστερόλης και αφετέρου στο φαινότυπο των λείων μυϊκών κυττάρων. Διαπιστώθηκε **αυξημένη έκφραση του miR-10b στον υποενδοθηλιακό χώρο του ανευρύσματος,** ενώ η χρήση του αναστολέα του miR-10b

σε καλλιεργημένα ΑΚΑ-ΛΜΚ επέφερε αύξηση της έκφρασης του γονιδίου ABCA1 καθώς και της α -SM, χαρακτηριστικής πρωτεΐνης των συσταλτικών ΛΜΚ, ενώ μειωμένα βρέθηκαν τα επίπεδα της βιμεντίνης, δείκτη του παθολογικού συνθετικού φαινοτύπου.

Συμπερασματικά στην παρούσα διατριβή αναδείχθηκαν για πρώτη φορά τα κάτωθι:

- διαταραχές στην έκφραση των γονιδίων, LXR, ABCA1 και ApoA1, που ενέχονται στο μηχανισμό εκροής της χοληστερόλης στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής επάγουν τη συσσώρευση λιπιδίων και τη μετατροπή ορισμένων μακροφάγων και ΛΜΚ σε αφρώδη κύτταρα.
- απορρύθμιση της εξόδου των λιπιδίων φαίνεται να σχετίζεται και με τη φαινοτυπική διαφοροποίηση των ΛΜΚ προς τον παθολογικό συνθετικό φαινότυπο συμβάλλοντας στην παθογένεια της νόσου.
- αναδείχθηκε πιθανός ρόλος του miR-10b στη ρύθμιση του γονιδίου ABCA1 καθώς και των γονιδίων που σχετίζονται με το φαινότυπο των ΛΜΚ (α -ακτίνη λείου μυϊκού τύπου, α -SM και βιμεντίνη) στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής αναδεικνύοντας το miR-10b ως πιθανό μοριακό στόχο για την αναστολή της εξέλιξης του ανευρύσματος.

ABSTRACT

Abdominal aortic aneurysm (AAA) is a degenerative disease of the abdominal aorta and it is defined as the localized increase of the aortas' diameter by 50% of its normal diameter. AAA is considered to be a major health problem as it has been associated with high morbidity and mortality rates. Epidemiological studies report that AAA primarily affects 4-8% of the population above 60 years of age and it is associated with nearly 85-90% mortality in the event of its rupture. AAA is a multifactorial disease in which advanced age, sex and smoking in combination with the genetic predisposition are among the strongest risk factors contributing to aneurysms' onset and progression.

To date, AAA treatment is limited to surgical repair through an open incision of the aneurysm or EVAR (endovascular aneurysm repair) using synthetic grafts, making, therefore, the development of novel prognostic, diagnostic and therapeutic interventions of ultimate importance.

Abdominal aortic aneurysms' development is a complex and multifactorial process and affects all layers of the aortic wall. Prominent pathological features of AAA tissue are the chronic inflammation characterized by the extensive infiltration of inflammatory cells in the AAA tissue, as well as upregulation of proteolytic pathways leading to degradation of collagen and elastin which contribute to the flexibility and dynamics of the aortic wall. Furthermore, apoptosis of smooth muscle cells (SMCs), the major cell type of the media aortic layer in combination with inflammation and degeneration of the aortic wall induce localized thinning of the aorta, making the aortic wall more susceptible to blood pressure and mechanical wall stress and contributing thus to AAA formation.

Moreover, interesting is the fact that a number of studies have reported that the presence and/or rupture of atherosclerotic plaque in AAA tissue is possibly related to the development of aneurysm. More specifically, it has been proposed that the two diseases share risk factors and the presence of atherosclerosis comprises a common finding of the wall of aneurysm. Due to the significant role of cholesterol transport and lipid metabolism in the pathophysiology of atherosclerosis, genes involved in these pathways are also of interest in AAA pathology. Deregulation of lipid metabolism in atherosclerosis is associated with lipid accumulation, foam cell formation, as well as phenotype switch of SMCs in the aortic wall of atherosclerotic tissues.

Even though few studies point to the direction that lipids may be associated with AAA presence, they have led to controversial results. A limited number of studies revealed an association between low serum high-density lipoprotein (HDL), high serum low-density lipoprotein (LDL) and shingolipids with AAA presence suggesting that HDL may be important in AAA development, while other studies failed to reproduce the above findings. It has also been suggested that lipid-lowering drugs might have an impact on AAA progression, as their routine use in AAA patients appears to be associated with beneficial effects. All above findings point towards the involvement of cholesterol efflux and lipid metabolism in AAA initiation. However the molecular mechanisms involved is still unclear.

The purpose of the present thesis is the investigation of the role of genes involved in cholesterol efflux mechanism in AAA and its contribution to aneurysm's pathology, as well as the epigenetic regulation of cholesterol efflux related genes through microRNAs.

Full thickness AAA segments were collected from patients undergoing open repair operation. Normal abdominal aortic specimens free of atherosclerotic disease, as well as non-aneurysmal atherosclerotic abdominal aortic tissues used as atherosclerotic controls, were collected within 12h from death without any chemical treatment. The experimental part of the thesis included the following:

- evaluation of mRNA expression levels of the two subtypes of nuclear receptor LXR, **LXR α** and **LXR β** , as well as their target gene **ABCA1** in **whole aneurysmal, normal and atherosclerotic non-aneurysmal aortic wall** (Real Time PCR).
- evaluation of mRNA and protein expression levels of **LXR α** and **LXR β** , as well as **ABCA1** mRNA expression levels in the **intima-media layer** of aneurysmal, atherosclerotic and normal aortic tissues (Real Time PCR and Western Blot).
- immunohistochemical investigation and evaluation of the LXR α , ABCA1 and ApoAI** expression pattern within the different aortic layers (Staining of tissue sections with antibodies for LXR α , ABCA1 and ApoAI).
- lipid accumulation study in the aortic wall** (Tissue sections stained with Toluidine O Blue, TBO and Oil Red O).
- the presence of foam cells in the aortic wall** (Tissue sections stained with Oil Red O and co-stained with antibodies for CD68 and α -SM, markers for macrophages and smooth muscle cells, respectively).

- **investigation and characterization of the phenotype status of smooth muscle cells (SMCs) in the aortic wall** (Tissue sections stained with antibodies for α -SM and vimentin, markers for contractile and synthetic phenotype, respectively),
- **evaluation of expression levels of miR-10b in the intima-media layer** of aneurysmal and normal aortic tissues (Real Time PCR).
- **role of miR-10b** in the regulation of cholesterol efflux related genes, LXRA and ABCA1, as well as on SMCs phenotype status (Transfection of cultured smooth muscle cells with the antagonist of miR-10b and subsequently, Real Time PCR and Western Blot).

In the present study, histochemical analysis revealed **excessive accumulation of lipids in the intima and media layers of the AAA wall**, while no lipid deposition was observed in normal aortic tissues. The above findings provide evidence of a possible deregulation of cholesterol efflux pathway in AAA tissues.

It is well established that dysfunction of cholesterol efflux in atherosclerosis is associated with foam cell formation derived from SMCs and macrophages, as well as the phenotype switch of SMCs from contractile to synthetic form.

Histochemical analysis with co-staining using Oil Red O with CD68 and α -smooth muscle actin (α -SM) revealed the **presence of lipid droplets in macrophages and SMCs of the AAA wall** designating their transformation into foam cells. In order to examine the phenotypic status of SMCs in AAA and normal tissues, we proceeded with double immunostaining for α -SM and vimentin, markers for the contractile and synthetic phenotype of SMCs, respectively. We observed positive α -SM-IR and lack of vimentin-IR in normal media tissue, whereas in AAA tissue a number of intimal and medial SMCs were positively stained for α -SM and vimentin indicating that SMCs undergo phenotypic modulation in AAA.

We next evaluated the expression levels of Liver X receptors (LXR α and LXR β) and ATP-binding-cassette transporter A1 (ABCA1) expression levels in human aneurysmal (AAA), atherosclerotic (ATH) and normal abdominal aortic tissues. We found significant differences in LXR α , LXR β and ABCA1 mRNA expression levels between AAA, ATH and normal whole aortic tissues and also within the AAA "intima-media", ATH "intima-media" and normal media layers. Specifically, LXR α , LXR β and ABCA1 mRNA levels were decreased in AAA compared to ATH-whole tissues, as well as in AAA "intima-media" compared to ATH and normal "intima-media" layers.

Moreover, immunohistochemical evaluation revealed that LXR α and ABCA1 immunoreactivities (IR) were reduced in the AAA media compared to the normal and ATH media layers and that they were also reduced in the intima layer of AAA and ATH tissues, whereas ApoA1-IR was increased in the AAA and ATH aortic walls compared to normal. This designates that the cholesterol efflux mechanism is deregulated in AAA and provides a possible explanation for the observed extensive lipid accumulation in the aneurysmal aortic wall.

Finally, in an effort to investigate a possible epigenetic regulation of LXR α and ABCA1, we investigated the role of miR-10b in the regulation of cholesterol efflux related genes expression, as well as in the phenotypic status of AAA-SMCs. We found that miR-10b expression levels were significantly increased in the AAA “intima-media” compared to normal “intima-media” layers and that introduction in AAA-SMCs of antisense oligonucleotides directed against miR-10b resulted in increased ABCA1 expression levels, as well as in increased α -SM protein levels, marker for the contractile SMCs.

In conclusion the present thesis provides novel data for impaired expression of genes, LXRs, ABCA1, ApoA1, involved in cholesterol efflux in AAA tissue. This could be explained by the observed lipid accumulation and presence of foam cells derived from macrophages and SMCs, as well as by switch of the SMCs phenotype from contractile to synthetic. Moreover, we provide novel evidence for the involvement of epigenetic regulation of ABCA1 and SMCs phenotype related genes in AAA through microRNAs. We found that miR-10b is a potential molecular target aiming at abdominal aortic aneurysm inhibition.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A.1 Ανεύρυσμα Κοιλιακής Αορτής	24
A.1.1 Φυσιολογία της αορτής.....	24
A.1.2 Γενικά στοιχεία.....	25
A.1.3 Ταξινόμηση Ανευρυσμάτων.....	26
A.1.4 Επιδημιολογία Ανευρυσμάτων Κοιλιακής Αορτής	27
A.1.5 Παράγοντες κινδύνου ΑΚΑ	29
A.1.5.1 Ηλικία	29
A.1.5.2 Φύλο	30
A.1.5.3 Κάπνισμα και λοιποί παράγοντες	32
A.1.5.4 Γενετική Προδιάθεση	33
A.2 Δομή αορτικού τοιχώματος	38
A.3 Λεία μυϊκά κύτταρα.....	39
A.3.1 Γενικά στοιχεία.....	39
A.3.2 Φαινοτυπική πλαστικότητα λείων μυϊκών κυττάρων.....	41
A.3.2.1 Φαινότυποι των λείων μυϊκών κυττάρων	42
A.4 Παθογένεια ανευρύσματος κοιλιακής αορτής	47
A.4.1 Φλεγμονή και ανοσολογικές αντιδράσεις στην παθογένεια του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής.....	48
A.4.2 Πρωτεολυτική αποδόμηση του συνδετικού ιστού στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής	49
A.4.3 Ο ρόλος των λείων μυϊκών κυττάρων στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής.....	50
A.5 Ανεύρυσμα Κοιλιακής Αορτής και Αθηρωμάτωση	52
A.6 Ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής και μεταβολισμός λιπιδίων	53
A.6.1 Ο μεταβολισμός των λιπιδίων σε κυτταρικό επίπεδο	53
A.6.2 Ανάστροφη μεταφορά της χοληστερόλης	56
A.6.3 Σχέση μεταβολισμού των λιπιδίων και λείων μυϊκών κυττάρων	59
A.6.4 Σχέση του μεταβολισμού των λιπιδίων με το ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής	61
A.7 Επιγενετικές τροποποιήσεις στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής	64
A.7.1 microRNAs: Λειτουργία και Βιογένεση	64
A.7.2 Τα microRNAs στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής	66

B.1.9.1 Βασικές αρχές της μεθόδου.....	90
B.1.9.2 Πρωτόκολλο ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blot).....	91
B.1.10 Ανοσοϊστοχημικές Τεχνικές.....	93
B.1.10.1 Ιστολογικό υλικό και προετοιμασία δειγμάτων για τομές σε κρουτόμο	93
B.1.10.2 Ιστολογικές Χρώσεις.....	94
B.1.10.3 Ανοσοϊστοχημεία	96
B.1.11 Μικροσκοπία	102
B.1.12 Ανάλυση και επεξεργασία εικόνων μικροσκοπίου	102
B.1.13 Αποσιώπηση της έκφρασης γονιδίων με τη χρήση της τεχνολογίας των μικρών μη κωδικών αλληλουχιών RNA (microRNAs).....	105
B.1.14 Στατιστική ανάλυση	106
B.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	107
B.2.1 Ιστολογική ανάλυση δειγμάτων ανευρυσματικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής.....	107
B.2.2 Συσσώρευση λιπιδίων στο τοίχωμα ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής	108
B.2.3 Παρουσία αφρωδών κυττάρων στο τοίχωμα ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής ...	110
B.2.3.1 Εντοπισμός των λείων μυϊκών κυττάρων στο αορτικό τοίχωμα ανευρυσματικής και φυσιολογικής κοιλιακής αορτής.....	110
B.2.3.2 Παρουσία αφρωδών κυττάρων προερχόμενων από λεία μυϊκά κύτταρα στο τοίχωμα ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής	112
B.2.3.3 Παρουσία αφρωδών κυττάρων προερχόμενα από μακροφάγα στο τοίχωμα ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής	114
B.2.4 Φαινότυπος των λείων μυϊκών κυττάρων στο αορτικό τοίχωμα ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής.....	115
B.2.5 Μελέτη της μεταγραφικής έκφρασης των γονιδίων LXRα, LXRβ και ABCA1 στο σύνολο του αορτικού τοιχώματος ανευρυσματικής, φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής	117
B.2.6 Μελέτη της μεταγραφικής έκφρασης των γονιδίων LXRα, LXRβ και ABCA1 στον υποενδοθηλιακό χώρο (έσω και μεσαίοσχιώνα) ανευρυσματικής, αθηρωματικής μη ανευρυσματικής και φυσιολογικής κοιλιακής αορτής.....	118

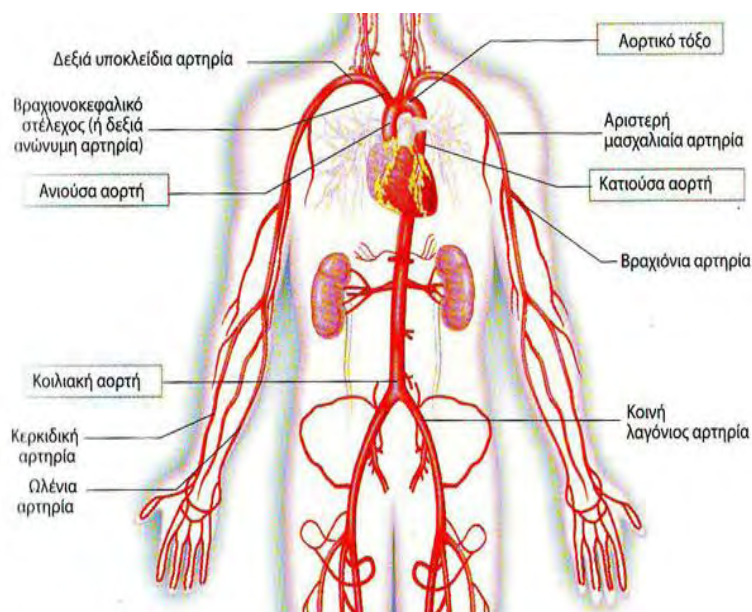
B.2.7 Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης των γονιδίων LXRα και LXRβ στον υποενδοθηλιακό χώρο (έσω και μεσαίο χιτώνα) ανευρυσματικής, αθηρωματικής μη ανευρυσματικής και φυσιολογικής κοιλιακής αορτής	119
B.2.8 Ανοσοϊστοχημική μελέτη των γονιδίων LXRα, ABCA1 και ApoAI στο αορτικό τοίχωμα ανευρυσματικής, φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής.....	120
B.2.8.1 Ανοσοϊστοχημική μελέτη του LXRα στο αορτικό τοίχωμα ανευρυσματικής, φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής.....	121
B.2.8.2 Ανοσοϊστοχημική μελέτη της ABCA1 στο αορτικό τοίχωμα ανευρυσματικής, φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής.....	123
B.2.8.3 Ανοσοϊστοχημική μελέτη της ApoAI στο αορτικό τοίχωμα ανευρυσματικής, φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής.....	126
B.2.9 Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης του miR-10b στον υποενδοθηλιακό χώρο ανευρυσματικής και φυσιολογικής κοιλιακής αορτής.....	128
B.2.10 Επιβεβαίωση της απομόνωσης και καλλιέργειας ανευρυσματικών λείων μυϊκών κυττάρων	129
B.2.11 Ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων που ενέχονται στην έξοδο της χοληστερόλης από το miR-10b μέσω της επίδρασης του αναστολέα του (anti-miR-10b) στα ανευρυσματικά λεία μυϊκά κύτταρα.....	129
B.2.12 Προσδιορισμός του φαινοτύπου των ανευρυσματικών λείων μυϊκών κυττάρων μετά από επίδραση με τον αναστολέα του miR-10b.....	131
B.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	133
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	147

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A.1 Ανεύρυσμα Κοιλιακής Αορτής

A.1.1 Φυσιολογία της αορτής

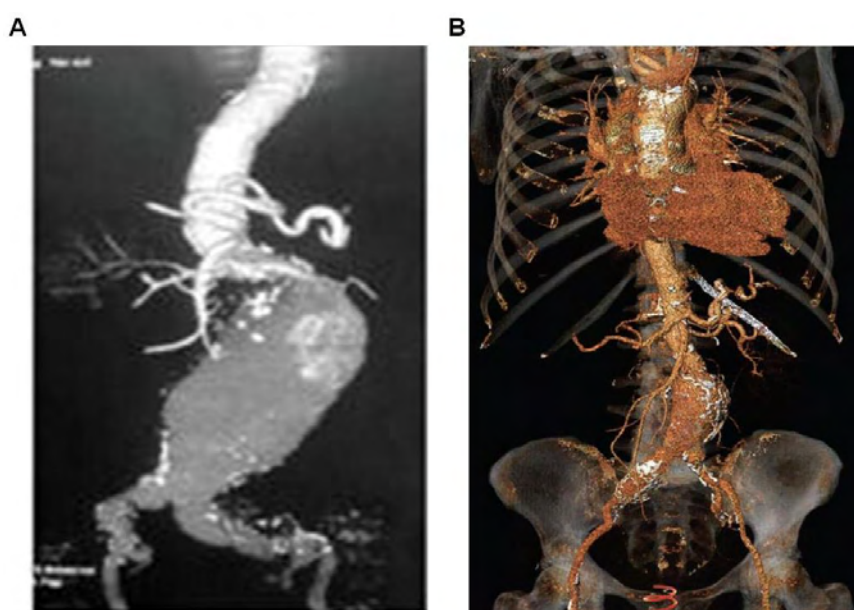
Η αορτή αποτελεί τη μεγαλύτερη και βασικότερη αρτηρία του ανθρωπίνου σώματος η οποία μεταφέρει οξυγονωμένο αίμα από την καρδιά προς όλα τα σημεία του σώματος. Εκφύεται από το ανώτερο τμήμα της αριστερής κοιλίας της καρδιάς και κάτω χωρίζεται σε δύο μεγάλα τμήματα: την ενδοθωρακική και κοιλιακή αορτή [1-2]. Η ενδοθωρακική αορτή εντοπίζεται στη θωρακική κοιλότητα και αποτελείται από την ανιούσα αορτή, το αορτικό τόξο και την κατιούσα θωρακική αορτή μέχρι το διάφραγμα. Συγκεκριμένα η αορτή μετά την έκφυσή της στρέφεται προς τα πάνω (ανιούσα αορτή) και στη συνέχεια σχηματίζει το αορτικό τόξο όταν φτάσει πίσω από το δεύτερο δεξιό πλευρικό χόνδρο. Έπειτα η αορτή ακολουθεί καθοδική πορεία σχηματίζοντας την κατιούσα θωρακική αορτή. Η κοιλιακή αορτή, που αποτελεί συνέχεια της θωρακικής, εντοπίζεται στην κοιλιακή χώρα με όριο μετάπτωσης το αορτικό τμήμα του διαφράγματος. Στο κάτω τμήμα της κοιλιακής χώρας η αορτή διχάζεται στις δύο κοινές λαγόνιες αρτηρίες οι οποίες μεταφέρουν αίμα στα κάτω άκρα (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση των κλάδων της αορτής [1-2].

A.1.2 Γενικά στοιχεία

Το ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής (ΑΚΑ) συνιστά το συχνότερο τύπο αρτηριακού ανευρύσματος που απαντάται στον οργανισμό. Πρόκειται για μια τοπική μη αναστρέψιμη διεύρυνση της αορτής η οποία δημιουργείται σε μια εξασθενημένη περιοχή αυτής. Ως ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής ορίζεται η μόνιμα εντοπισμένη διάταση της αορτής τουλάχιστον κατά 50% της φυσιολογικής της διαμέτρου (>3εκ.) [3-4] (Εικόνα 2). Στην πλειονότητά τους (95%) τα ΑΚΑ περιλαμβάνουν μόνο το υπονεφρικό τμήμα της αορτής, ενώ μόλις το 5% αυτών εκτείνονται άνωθεν των νεφρικών αρτηριών καθώς επίσης ένα ποσοστό της τάξεως του 25% περιλαμβάνουν και τις λαγόνιες αρτηρίες.



Εικόνα 2: Απεικόνιση με την τεχνική της (Α) αξονικής αγγειογραφίας [Koutsias. et al., Case Rep Vasc Med. 2013] και (Β) τρισδιάστατης αξονικής τομογραφίας [Nordon. et al., Nat RevCardiol. 2011] ανευρύσματος κοιλιακής αορτής.

Το ΑΚΑ έχει αναδειχθεί σε σημαντικό πρόβλημα υγείας δεδομένου ότι έχει συσχετιστεί με υψηλά ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας, ενώ επιδημιολογικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι ο επιπολασμός της ανευρυσματικής νόσου υπολογίζεται στο 4-8% του πληθυσμού ηλικίας άνω των 60 ετών. Η ρήξη του ΑΚΑ συνιστά μια δραματική επιπλοκή η οποία έχει συσχετιστεί με υψηλό ποσοστό θνησιμότητας το οποίο ανέρχεται στο 85-90% [7-9]. Στις Ηνωμένες Πολιτείες η ρήξη του ανευρύσματος αποτελεί την 13^η αιτία θανάτου και σε άνδρες ηλικίας άνω των 55 την 10^η αιτία θανάτου [10], ενώ επίσης ετησίως περίπου 15.000 άτομα παγκοσμίως πεθαίνουν εξαιτίας ρήξης ανευρύσματος κοιλιακής αορτής.

Στην πλειονότητά τους τα ΑΚΑ είναι συνήθως ασυμπτωματικά και η διάγνωσή τους αποτελεί τυχαίο εύρημα σε απεικονιστικό έλεγχο. Καθώς όμως τα ανευρύσματα διατείνονται, πολλοί ασθενείς περιγράφουν συμπτώματα όπως κοιλιακό πόνο, αίσθημα παλμών στην κοιλιακή χώρα και έντονο πόνο στην πλάτη, ενώ σε περιπτώσεις δημιουργίας θρόμβου έχει αναφερθεί και η δημιουργία εμβολής.

Αναφορικά με τη θεραπευτική προσέγγιση του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής, αυτή εξαρτάται από το μέγεθος του ΑΚΑ καθώς και το ρυθμό διάτασης της αορτής. Συγκεκριμένα σε μικρά ανευρύσματα με διάμετρο αορτής κάτωθι των 3εκ. χορηγείται φαρμακευτική αγωγή με αντιυπερτασικά και υπολιπιδαιμικά (στατίνες) φάρμακα για τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και των επιπέδων χοληστερόλης του ασθενούς, αντιστοίχως. Παρόλη την ισχύουσα φαρμακευτική παρακολούθηση δεν υπάρχει ακόμα αποτελεσματική φαρμακοθεραπεία ώστε να επιτευχθεί η αναστροφή ή η αναστολή της εξέλιξης της νόσου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ασθενείς με μεγάλοι μεγέθους ανευρύσματα, στα οποία η διάμετρος της αορτής υπερβαίνει τα 5εκ., να καταλήγουν σε χειρουργικές παρεμβάσεις για την αντιμετώπιση του προβλήματος.

Η πιο διαδεδομένη θεραπεία που εφαρμόζεται σε μεγάλα μη ραγέντα ΑΚΑ είναι η ανοιχτή χειρουργική επέμβαση η οποία περιλαμβάνει εκτομή του ανευρύσματος και αποκατάσταση της κοιλιακής αορτής με τη συρραφή συνθετικού μοσχεύματος. Η εναλλακτική μέθοδος χειρουργικής αποκατάστασης του ανευρύσματος συνίσταται στην ενδαγγειακή αποκατάσταση αυτού. Πρόκειται για μία λιγότερο επεμβατική τεχνική την οποία πρώτος εισήγαγε και εφάρμοσε το 1991 ο Αργεντίνιος αγγειοχειρουργός Juan Carlos Parodi [11]. Στη συγκεκριμένη τεχνική πραγματοποιείται ενδοαυλική τοποθέτηση ενδομοσχευμάτων μέσα στον ανευρυσματικό σάκο προκειμένου να αποκλειστεί το ανεύρυσμα από τη συστηματική κυκλοφορία.

A.1.3 Ταξινόμηση Ανευρυσμάτων

Τα ανευρύσματα είναι δυνατόν να ταξινομηθούν με βάση αιτιολογικά κριτήρια καθώς επίσης τη μορφολογία και τον εντοπισμό τους. Ως εκ τούτου, με βάση τη μορφολογία τους διακρίνονται σε ψευδή και γνήσια. Τα ανευρύσματα χαρακτηρίζονται ως γνήσια όταν ο σχηματισμός τους περιλαμβάνει και τις τρεις στοιβάδες του αορτικού τοιχώματος. Αντιθέτως, στην κατηγορία των ψευδών ανευρυσμάτων ανήκουν εκείνα στα οποία το τοίχωμα της αορτής αποτελείται από περιαγγειακούς ιστούς και όχι από τις στοιβάδες του αορτικού τοιχώματος. Συνήθως τα ψευδοανευρύσματα προκαλούνται από πλήρη τραυματική ρήξη του τοιχώματος

ως αποτέλεσμα αγγειακής επέμβασης, αναστομωτικής διάσπασης ή αμβλέος ή διατρητικού τραύματος με αποτέλεσμα τη δημιουργία εξωαυλικού τοιχώματος.

Ένα επιπλέον κριτήριο για την κατηγοριοποίηση των ανευρυσμάτων αποτελεί η εξωτερική τους μορφολογία. Η πιο κοινή μορφολογία ανευρυσμάτων είναι τα ατρακτοειδή τα οποία εντοπίζονται συνηθέστερα λίγο μετά τις νεφρικές αρτηρίες και καταλήγουν στον αορτικό διχασμό. Στα ατρακτοειδή ανευρύσματα παρατηρείται συμμετρική περιφερική διεύρυνση που περιλαμβάνει όλες τις επιμέρους στοιβάδες του αορτικού τοιχώματος. Επίσης η εξωτερική μορφολογία διακρίνει τα ανευρύσματα σε σακοειδή και διαχωριστικά. Τα σακοειδή παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο ρήξης, ενώ επίσης χαρακτηρίζονται από εκφυλισμό ενός μόνο τμήματος της αρτηριακής περιμέτρου. Στα διαχωριστικά ανευρύσματα παρατηρείται διάσπαση του τοιχώματος της αορτής λόγω αδυναμίας του έσω χιτώνα, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενδοτοιχωματικού αιματώματος.

Επιπροσθέτως, τα ανευρύσματα διακρίνονται σε κατηγορίες με βάση τον εντοπισμό τους ως προς τις νεφρικές και σπλαχνικές αρτηρίες. Συνεπώς διακρίνονται σε υπονεφρικά, διανεφρικά, παρανεφρικά, υπερνεφρικά, καθώς επίσης και σε παρααναστομωτικά και θωρακοκοιλιακά. Αναφορικά με την αιτιοπαθογένειά τους το ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής διακρίνεται σε φλεγμονώδες, σε μυκωτικό, σε συφιλιδικό και σε μετατραυματικό. Επιπλέον η παθολογία των ανευρυσμάτων τα ταξινομεί και σε ανευρύσματα που σχετίζονται με διαταραχές του συνδετικού ιστού όπως το σύνδρομο Marfan και το σύνδρομο Ehlers-Danlos, καθώς και σε αρτηριοσκληρυντικά (ή εκφυλιστικά) τα οποία συνιστούν και το συχνότερο τύπο ΑΚΑ.

A.1.4 Επιδημιολογία Ανευρυσμάτων Κοιλιακής Αορτής

Στοιχεία που προέρχονται από νεκροτομικές και πληθυσμιακές μελέτες καθώς και προγράμματα προσυμπτωματικού ελέγχου (screening) ασυμπτωματικών ανευρυσμάτων παρέχουν σαφή εικόνα όσο αφορά στην επιδημιολογία του ΑΚΑ. Επιπλέον επιδημιολογικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η ανευρυσματική νόσος πλήττει κυρίως τους άνδρες καθώς η συχνότητα εμφάνισής της είναι 2 με 6 φορές μεγαλύτερη στους άρρενες συγκριτικά με τις γυναίκες [6,12-16]. Επιπροσθέτως δεδομένα που προέρχονται από προγράμματα προσυμπτωματικού ελέγχου υποστηρίζουν ότι η επίπτωση της νόσου στο γενικό πληθυσμό είναι 3-117 άτομα ανά 100.000 άτομα ετησίως [17-18] και συγκεκριμένα κυμαίνεται σε ποσοστό 4-8% των ατόμων ηλικίας άνωθεν των 60 ετών [14,19-21], ενώ μελέτη που διεξήχθη σε 464 άρρενες με μικρού μεγέθους ανεύρυσμα έδειξε ότι τα ποσοστά αυτής αυξάνονται

δραματικά κυρίως σε άρρενες ηλικίας άνω των 50 ετών όπου η επίπτωση ανέρχεται στα 3 άτομα ανά 1000 άτομα ετησίως [22]. Επιπλέον στοιχεία από πληθυσμιακές μελέτες έδειξαν ότι η επίπτωση της πάθησης σε Καυκάσιους στο δυτικό κόσμο ανέρχεται σε ποσοστό 0.4-0.67% [23-25], ενώ η συχνότητα εμφάνισης ανευρύσματος είναι χαμηλότερη σε πληθυσμούς Ασιατικής καταγωγής [26]. Ανοδική τάση παρουσιάζουν τα ποσοστά στη Μεγάλη Βρετανία όπου ο επιπολασμός της νόσου κυμαίνεται από 1.3% έως 12.7%, ενώ στις Ηνωμένες Πολιτείες ανέρχεται στο 2.4% ετησίως.

Η ανευρυσματική νόσος της κοιλιακής αορτής θεωρείται μία πάθηση απειλητική για τη ζωή του ανθρώπου δεδομένου ότι έχει συσχετιστεί με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας σε περίπτωση ρήξης του ανευρύσματος. Η ολική θνητότητα μπορεί να ανέλθει στο 90% [7-9], ενώ έχει διατυπωθεί ότι παγκοσμίως περίπου 15.000 άτομα πεθαίνουν λόγω της ρήξης του ΑΚΑ. Πιο συγκεκριμένα η ρήξη του ΑΚΑ έχει ως αποτέλεσμα 8.000 θανάτους ετησίως στη Μεγάλη Βρετανία, ενώ πολύ υψηλότερα είναι τα ποσοστά στις Ηνωμένες Πολιτείες (ΗΠΑ) όπου οι θάνατοι ανέρχονται στους 15.000 ανά έτος αναδεικνύοντας το ΑΚΑ ως την 13^η αιτία θανάτου [10]. Πληθυσμιακή μελέτη από τη Σουηδία έδειξε ότι η πιθανότητα ρήξης του ΑΚΑ στο χρονικό διάστημα 1971-1986 κυμαινόταν στο 5.6 ανά 100.000 άτομα ετησίως, ενώ στο διάστημα 2000-2004 η πιθανότητα αυξήθηκε στο 10.6 ανά 100.000 άτομα ετησίως [27]. Ο κίνδυνος ρήξης του ανευρύσματος σχετίζεται με τη διάμετρο αυτού και μάλιστα αυξάνει με γεωμετρικό ρυθμό (Πίνακας 1) [15].

Πίνακας 1: Συσχέτιση μεγέθους ανευρύσματος με το κίνδυνο ρήξης.

Διάμετρος Ανευρύσματος (εκατοστά)	Κίνδυνος Ρήξης
3.0 – 3.9	0%
4.0 -4.9	1%
5.0 – 5.9	1.0 – 11%
6.0 – 6.9	10 – 22%
> 7.0	30 – 33%

Moll. et. Al., Eur J Vasc Endovasc Surg. 2011

Η υψηλή θνητότητα που σχετίζεται με ενδεχόμενη ρήξη του ανευρύσματος κατέστησε επιτακτική την ανάγκη του προληπτικού ελέγχου με σκοπό την έγκαιρη

διάγνωση αυτού και ιδιαίτερα σε ομάδες του πληθυσμού που παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΑΚΑ όπως άτομα με ιστορικό καπνίσματος και άτομα με οικογενειακό ιστορικό ανευρύσματος. Η διεξαγωγή προγραμματών προληπτικού ελέγχου (screening) δείχνουν ότι η έγκαιρη διάγνωση του ανευρύσματος συμβάλλει στη μείωση της θνητότητας που σχετίζεται με τη νόσο. Σε αυτό συνηγορούν και τα αποτελέσματα μεγάλης μελέτης η οποία διεξήχθη σε 67.800 ασθενείς και υπέδειξε ότι έγκαιρη διάγνωση είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του κινδύνου θανάτου από ανευρυσματική νόσο της κοιλιακής αορτής κατά 42% [19].

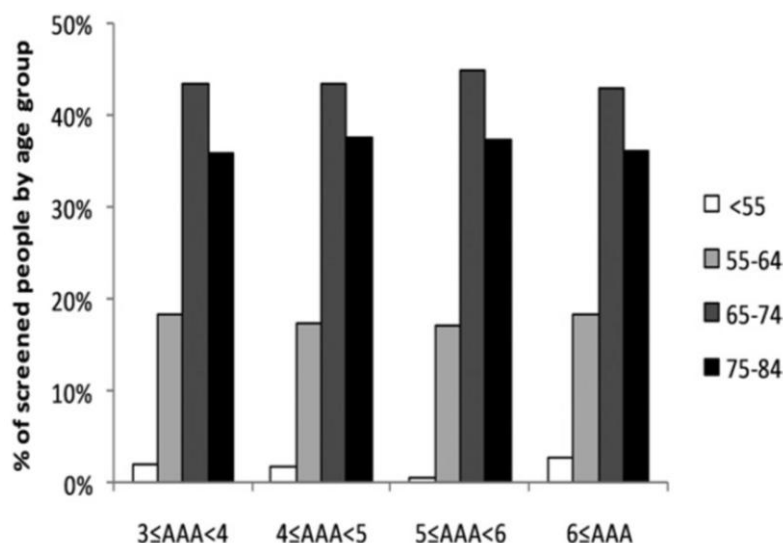
A.1.5 Παράγοντες κινδύνου ΑΚΑ

Μεγάλης κλίμακας επιδημιολογικές μελέτες έχουν αναδείξει μια σειρά παραγόντων κινδύνου οι οποίοι σχετίζονται με την ανάπτυξη, εξέλιξη και ρήξη του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής. Οι παραπάνω μελέτες έχουν αναδείξει το ΑΚΑ ως μία πολυπαραγοντική πάθηση όπου ένα σύμπλεγμα περιβαλλοντικών παραγόντων σε αλληλεπίδραση με γενετικούς παράγοντες καθορίζουν την εμφάνιση, την πορεία εξέλιξης της νόσου καθώς και τη βαρύτητα αυτής. Μεταξύ των παραγόντων κινδύνου συγκαταλέγονται η προχωρημένη ηλικία, το ανδρικό φύλο, το κάπνισμα, ενώ μελέτες υποστηρίζουν ότι και η γενετική προδιάθεση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο την εκδήλωση του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής.

A.1.5.1 Ηλικία

Η ηλικία αποτελεί έναν από τους ισχυρότερους παράγοντες κινδύνου για ανάπτυξη του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής καθώς η επίπτωση της νόσου αυξάνει με την πρόοδο της ηλικίας [14,19-21]. Συγκεκριμένα έχει δειχθεί ότι απαντάται σε 4-8% των ατόμων ηλικίας άνω των 65 ετών, ενώ σπάνια είναι η εμφάνισή του σε άτομα ηλικίας κάτω των 40 ετών. Μελέτη η οποία διεξήχθη σε 3.000.000 άτομα έδειξε ότι η επίπτωση της νόσου ανέρχεται στο 43.62% σε ηλικίες 65-74 ετών, ενώ το ποσοστό αυτό παρουσιάζει μικρή μείωση σε άτομα ηλικίας 75-84 ετών όπου η συχνότητα εμφάνισης του ανευρύσματος έχει εκτιμηθεί να είναι 36.35% [28]. Πολύ μικρότερα είναι τα ποσοστά σε άτομα του γενικού πληθυσμού ηλικίας κάτω των 55 ετών καθώς και στις ηλικίες 55-64 ετών όπου η επίπτωση της νόσου κυμαίνεται μεταξύ 1.83% και 18.13%, αντιστοίχως επιβεβαιώνοντας ότι η ανευρυσματική νόσος πλήττει κυρίως άτομα προχωρημένης ηλικίας (Εικόνα 3) [28]. Επιπροσθέτως τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης υποδεικνύουν ότι παρόλη τη συσχέτιση της ηλικίας με την

ανάπτυξη του ανευρύσματος, η κατανομή αυτής φαίνεται να μην συνδέεται με το διαφορετικό μέγεθος της αορτικής διαμέτρου (Εικόνα 3).

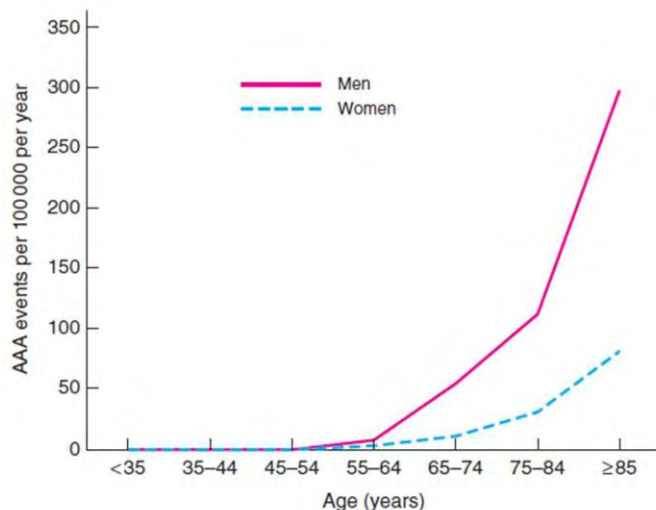


Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση συσχέτισης ηλικίας με τη συχνότητα εμφάνισης του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής (AAA) καθώς και το μέγεθος αυτού [Kent. et al., J Vasc Surg. 2010].

Ο μηχανισμός με τον οποίο η ηλικία ενέχεται στη δημιουργία της ανευρυσματικής νόσου πιθανότατα σχετίζεται με την επίδραση της ηλικίας στη δυναμική του τοιχώματος της αορτής. Είναι γενικά αποδεκτό ότι η γήρανση προκαλεί αύξηση των εκφυλιστικών διαδικασιών που μπορεί να λαμβάνουν χώρα στην αορτή έχοντας ως αποτέλεσμα την προοδευτική αποδόμηση των ινών ελαστίνης. Συνέπεια είναι η μείωση της ελαστικότητας του αορτικού τοιχώματος, η οποία φαίνεται να επιδεινώνεται ακόμα περισσότερο με την αύξηση της ηλικίας, καθιστώντας το αορτικό τοίχωμα πιο ευάλωτο στην επίδραση άλλων περιβαλλοντικών παραγόντων καθώς και μηχανικών καταπονήσεων. Η ανελαστικότητα της αορτής που παρατηρείται με τη γήρανση πιθανότατα σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την ανάπτυξη του ΑΚΑ.

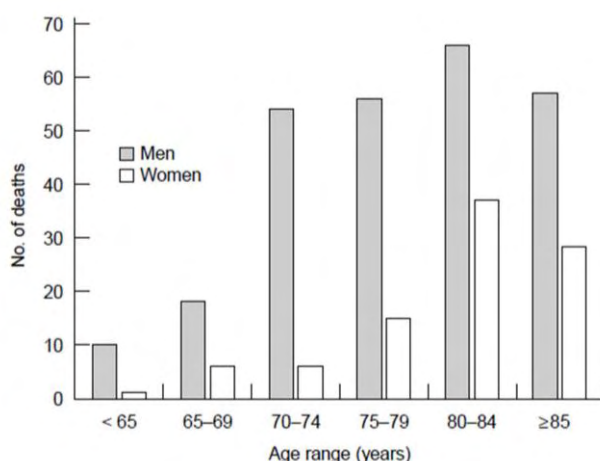
A.1.5.2 Φύλο

Πληθυσμιακές μελέτες υποστηρίζουν ότι το ΑΚΑ παγκοσμίως πλήττει κυρίως τον ανδρικό πληθυσμό [29] καθώς έχει αναφερθεί ότι η συχνότητα της ανευρυσματικής νόσου είναι 2 με 6 φορές μεγαλύτερη στους άρρενες συγκριτικά με τις γυναίκες [14]. Πιο συγκεκριμένα η επίπτωση του ΑΚΑ στον ανδρικό πληθυσμό ανέρχεται στο 8-9%, σε αντίθεση με το γυναικείο πληθυσμό όπου το ποσοστό είναι εμφανώς χαμηλότερο και φτάνει στο 1-3% [29-30] (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση της συχνότητα εμφάνισης του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής (AAA) στον ανδρικό και γυναικείο πληθυσμό [Howard. et al., Br J Surg. 2015].

Μεγάλη σουηδική νεκροτομική μελέτη του Malmö διαπίστωσε ότι στο χρονικό διάστημα 1958-1986 η συχνότητα εμφάνισης του ανευρύσματος στους άνδρες παρουσίαζε ραγδαία αύξηση μετά την ηλικία των 55 ετών φτάνοντας τη μέγιστη τιμή της σε ηλικίες 80-85 ετών, ενώ στις γυναίκες παρατηρήθηκε μια συνεχής αύξηση της συχνότητας μετά τα 70 έτη ηλικίας αλλά με σαφώς μικρότερους ρυθμούς [31]. Νεότερες επιδημιολογικές μελέτες επιβεβαίωσαν τα ευρήματα της μελέτης του Malmö καθώς επίσης διαπίστωσαν μεγάλες διαφορές και στη συχνότητα εμφάνισης της νόσου σε διάφορες ηλικιακές ομάδες μεταξύ ανδρών και γυναικών όπου η επίπτωση του ΑΚΑ παραμένει σαφώς μεγαλύτερη στους άρρενες [14,29-30] (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση της κατανομής τη συχνότητα εμφάνισης του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής (AAA) σε διάφορες ηλικιακές ομάδες του ανδρικού και γυναικείου πληθυσμού [Singh. et al., Am J Epidemiol 2001].

Οι διαφορές μεταξύ ανδρών και γυναικών στην επίπτωση της νόσου αποδίδονται στην εμπλοκή ορμονικών παραγόντων [32-33]. Μελέτες υποστηρίζουν ότι τα επίπεδα των οιστρογόνων θεωρούνται προστατευτικά έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων κυρίως σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε πειραματικά μοντέλα ζώων του ανευρύσματος διαπίστωσαν ότι τα αρσενικά παρουσίαζαν μεγαλύτερου βαθμού εκφυλιστικές και δομικές αλλοιώσεις του αορτικού τοιχώματος γεγονός που εξηγήθηκε από τα υψηλότερα επίπεδα της μεταλλοπρωτεϊνάσης MMP-9 και της μεγάλης συσσώρευσης μακροφάγων στο τοίχωμα της αορτής συγκριτικά με τα θηλυκά [34-35]. Η υπόθεση ότι τα οιστρογόνα διαδραματίζουν προστατευτικό ρόλο στην ανάπτυξη του ΑΚΑ ενισχύθηκε από μελέτη σε πειραματικό μοντέλου ποντικού όπου η χορήγηση 17β-οιστραδιόλης είχε ανασταλτικό ρόλο στην εξέλιξη και ανάπτυξη του ανευρύσματος [36].

A.1.5.3 Κάπνισμα και λοιποί παράγοντες

Το κάπνισμα αποτελεί αδιαμφισβήτητα το σημαντικότερο επιβαρυντικό παράγοντα για την ανάπτυξη και εξέλιξη του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής [37]. Στατιστικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι ο κίνδυνος εμφάνισης του ΑΚΑ είναι αυξημένος κατά 6 με 7 φορές στους καπνίζοντες συγκριτικά με τους μη καπνίζοντες [29,38]. Επιπροσθέτως έχει διατυπωθεί ότι σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και η διάρκεια του καπνίσματος. Σύμφωνα με μελέτες το κάπνισμα ενέχεται στην εμφάνιση της νόσου με χρονοεξαρτώμενο τρόπο καθώς η επίπτωση του ΑΚΑ αυξάνεται στο γενικό πληθυσμό κατά 4% για κάθε χρόνο καπνίσματος [15,23,30,38-39]. Ο μηχανισμός με τον οποίον το κάπνισμα συμβάλλει στην ανευρυσματική νόσο παραμένει άγνωστος, αν και θεωρίες υποστηρίζουν ότι η σχέση του με το ΑΚΑ σχετίζεται με τα επίπεδα των μεταλλοπρωτεϊνών και την απόκριση στο οξειδωτικό στρες.

Επιπλέον σύμφωνα με επιδημιολογικά δεδομένα η υπέρταση και ο διαβήτης συγκαταλέγονται μεταξύ των παραγόντων που θεωρούνται επιβαρυντικοί για το ανεύρυσμα, παρόλο που και στις δύο περιπτώσεις η συσχέτιση είναι ασθενής [40-41]. Όσο αφορά στην υπέρταση, φαίνεται ότι αυτή συνδέεται με αύξηση του κινδύνου ανάπτυξης ΑΚΑ αλλά μόνο στο γυναικείο πληθυσμό [23]. Επιπλέον η υπέρταση, αν και δεν σχετίζεται με τον κίνδυνο ρήξης του ανευρύσματος, επηρεάζει όμως την αιμοδυναμική επιβάρυνση του αορτικού τοιχώματος που συμβάλλει στην εξασθένηση

της δυναμικής του [42], καθώς επίσης σε πειραματικά μοντέλα ζώων φαίνεται να προκαλεί αύξηση του ρυθμού εξέλιξης του ΑΚΑ [43].

Αναφορικά με τη συσχέτιση του διαβήτη με την ανευρυσματική νόσο, τα αποτελέσματα των ερευνών είναι διφορούμενα. Πληθώρα ερευνών έχει αναφέρει πολύ ασθενή έως και μηδαμινή συσχέτιση μεταξύ των δύο παθήσεων [23,29,40-41], ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζουν δεδομένα που αναδεικνύουν τον προστατευτικό ρόλο του διαβήτη έναντι της ανάπτυξης ανευρύσματος. Σύμφωνα με τα ευρήματα αυτών των μελετών, ο διαβήτης προστατεύει από την εμφάνιση ΑΚΑ μέσω της υπερινσουλιναϊμίας και της υπεργλυκαιμίας [44-45], ενώ επίσης σχετίζεται και με χαμηλότερο ρυθμό εξέλιξης της νόσου [46].

A.1.5.4 Γενετική Προδιάθεση

Η ανευρυσματική νόσος της κοιλιακής αορτής θεωρείται ένα πολυπαραγοντικό νόσημα με ισχυρή γενετική συνιστώσα [47]. Η γενετική βάση της νόσου αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1977 από τον Clifton M.A, ο οποίος διαπίστωσε ότι τρία αδέρφια είχαν αναπτύξει ΑΚΑ υποδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο την οικογενική φύση της πάθησης [48]. Μεταγενέστερες έρευνες καθιστούν το οικογενειακό ιστορικό αποδεδειγμένο προδιαθεσικό παράγοντα της νόσου δεδομένου ότι σημαντικό ποσοστό ασθενών της τάξης του 15-20% παρουσιάζουν οικογενειακό ιστορικό ανευρύσματος [49-51]. Συγκεκριμένα μελέτες στις οποίες συμμετείχαν οικογένειες όπου δύο τουλάχιστον συγγενείς είχαν ΑΚΑ, έδειξαν ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης του ανευρύσματος είναι οκτώ φορές υψηλότερος για έναν συγγενή πρώτου βαθμού συγκριτικά με το γενικό πληθυσμό [39,52-55]. Η γενετική προδιάθεση της ανευρυσματικής νόσου ενισχύεται από μία πιο πρόσφατη μελέτη προερχόμενη από τη Σουηδία η οποία διεξήχθη σε πληθυσμό 265 μονοζυγωτικών και διζυγωτικών διδύμων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας εκτιμήθηκε ότι το ποσοστό κληρονομικότητας στον πληθυσμό των διδύμων ανέρχεται στο 70% [56] γεγονός που σε συνδυασμό με τις προγενέστερες μελέτες αναδεικνύει τη γενετική βάση του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής [57].

Στη μέχρι σήμερα βιβλιογραφία αναφέρονται δύο μελέτες ανάλυσης σύνδεσης οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε οικογένειες Καυκάσιων λευκών με τουλάχιστον δύο πάσχοντα μέλη [58-59]. Τα αποτελέσματα υπέδειξαν ισχυρή σύνδεση του ΑΚΑ με τις χρωμοσωμικές περιοχές 19q13 και 4q31, οι οποίες έχουν χαρτογραφηθεί ως AAA1 και AAA2 γενετικοί τόποι, αντιστοίχως, στη βάση δεδομένων Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). Οι παραπάνω χρωμοσωμικές περιοχές αποτέλεσαν

αντικείμενο αναλύσεων συσχέτισης οι οποίες αποκάλυψαν έναν αριθμό μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) σε υποψήφια γονίδια τα οποία πιθανολογείται να ενέχονται στην παθογένεια της ανευρυσματικής νόσου κοιλιακής αορτής. Συγκεκριμένα σε μία πρόσφατη μεγάλη μελέτη της Αυστραλίας [60] αναλύθηκε ο πολυμορφισμός rs5516 που συντελεί σε αλλαγή C>G στο εξώνιο 3 του γονιδίου της *καλλικρεΐνης 1 (KLK1)* το οποίο εδράζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 19q13. Το γονίδιο *KLK1* κωδικοποιεί μία πρωτεάση σερίνης η οποία συμβάλλει στη δράση των κινινών. Οι τελευταίες ενέχονται σε βιολογικές διεργασίες σχετιζόμενες με την παθολογία της νόσου και συγκεκριμένα φαίνεται ότι προωθούν διεργασίες της φλεγμονής. Το G αλληλόμορφο του πολυμορφισμού rs5516 συσχετίστηκε με μεγάλα μεγέθους ανευρύσματα (>50mm), ενώ αυξημένη βρέθηκε και η πρωτεϊνική έκφραση της καλλικρεΐνης 1 στο αορτικό τοίχωμα ασθενών οι οποίοι ήταν φορείς της παραπάνω παραλλαγής και είχαν διάμετρο ανευρύσματος άνω των 50mm. Δύο επιπλέον μελέτες διερεύνησαν 41 SNPs σε 9 υποψήφια γονίδια που εντοπίζονται στην περιοχή 19q13 [61-62]. Τα αποτελέσματα των μελετών έδειξαν ισχυρή συσχέτιση της νόσου με πολυμορφισμούς των γονιδίων *PEPD* και *CD22*, οι οποίοι εντοπίζονταν σε κωδικοποιούσες περιοχές αυτών καθώς και στην 3' αμετάφραστη περιοχή. Το γονίδιο *PEPD* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη της πεπτιδάσης D, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό του κολλαγόνου. Συγκεκριμένα ενέχεται στην αποδόμησή του, μιας χαρακτηριστικής διαδικασίας του παθοφυσιολογικού μηχανισμού του ανευρύσματος. Αντίστοιχα το γονίδιο *CD22* κωδικοποιεί πρωτεΐνη που παράγεται από τα Β-λεμφοκύτταρα και φαίνεται ότι συμβάλλει σε διεργασίες της φλεγμονής και του ανοσοποιητικού συστήματος οι οποίες χαρακτηρίζουν το τοίχωμα αορτής με ανεύρυσμα. Παρ' όλα αυτά περαιτέρω έρευνες καθίστανται αναγκαίες ώστε να αποδειχθεί αν οι πολυμορφισμοί των συγκεκριμένων γονιδίων είναι λειτουργικοί και ενέχονται στην παθολογία της νόσου.

Μελέτες συσχέτισης έχουν αναδείξει ένα σημαντικό αριθμό γονιδίων που σχετίζονται με αυξημένη προδιάθεση για την εμφάνιση και εξέλιξη του ΑΚΑ, τα περισσότερα από τα οποία εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια με σημαντικό ρόλο στον παθοφυσιολογικό μηχανισμό της νόσου. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν μόρια που ενέχονται στην αποδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και στη φλεγμονή, κύριων παθολογικών χαρακτηριστικών του ανευρύσματος, ενώ σχετίζονται και με σηματοδοτικά μονοπάτια του μεταβολισμού των λιπιδίων καθώς και αυξητικών και θρομβοφιλικών παραγόντων (Πίνακας 3) [63].

Πίνακας 3: Γονίδια που σχετίζονται με αυξημένη προδιάθεση με το ΑΚΑ από μελέτες συσχέτισης ασθενών-υγιών ατόμων.

Γονίδιο	Σηματοδοτικό Μονοπάτι	Πολυμορφισμός
<i>SORT1</i>	Μεταβολισμός λιπιδίων	rs599839
<i>IL6R</i>	Φλεγμονή	rs7529229
<i>LPA</i>	Μεταβολισμός λιπιδίων	rs10455872
<i>AGTR1</i>	Σύστημα Ρενίνης-Αγγειοτενσίνης	es5186
<i>TGFBR2</i>	Αυξητικός παράγοντας Μετασχηματισμού	rs1036095
<i>ACE</i>	Σύστημα Ρενίνης-Αγγειοτενσίνης	rs4646994
<i>MMP3</i>	Αποδόμηση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας	rs3025058
<i>MMP13</i>	Αποδόμηση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας	rs2252070
<i>MTHFRD1</i>	Θρομβοφιλία	rs8003379
<i>MTRR</i>	Θρομβοφιλία	rs326118
<i>LRP5</i>	Μεταβολισμός λιπιδίων	rs3781590

Kuivaniemi. et al., Scientifica. 2014

Πρόσφατες μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (Genome-Wide Association Studies, GWAS), οι οποίες παρέχουν τη δυνατότητα αφενός της γονοτυπικής καταγραφής μεγάλου αριθμού του πληθυσμού και αφετέρου της διερεύνησης μεγάλου αριθμού πολυμορφισμών για πιθανότητα σύνδεσης με τον παθολογικό φαινότυπο, έχουν υποδείξει 5 γενετικούς τόπους με ισχυρή συσχέτιση για γενετική προδιάθεση του ανευρύσματος (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Γενετικοί τόποι σχετιζόμενοι με την παρουσία ΑΚΑ χρησιμοποιώντας μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (Genome-Wide Association Studies, GWAS)

Χρωμοσωμική Περιοχή	Γονίδιο	Πολυμορφισμός
3p12.3	Contactin-3 (CNTN3)	rs7635818
9p21.3	CDKN2B antisense RNA 1 (CDKN2BAS1)	rs10757278
9q33.1	DAB2 interacting protein (DAB2IP)	rs7025486
12q13.3	Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1)	rs1466535
19p13.2	Low density lipoprotein receptor (LDLR)	rs6511720

Συγκεκριμένα τα ευρήματα των παραπάνω μελετών υποδεικνύουν ισχυρή συσχέτιση του πολυμορφισμού rs10757278 στη χρωμοσωμική περιοχή 9p21.3 που εδράζεται το γονίδιο *CDKN2BAS* με την ανευρυσματική νόσο. Επίσης βρέθηκαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης του *CDKN2BAS* στο αορτικό τοίχωμα ασθενών με ΑΚΑ και κωδικοποιεί έναν ρυθμιστή της έκφρασης αναστολέων των Ddk κινασών, *CDKN2A* και *CDKN2B* [64]. Επιπλέον με την ανάπτυξη ανευρύσματος συσχετίστηκε ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός rs7635818 που εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 3p12.3 κοντά στο γονίδιο της *contactin-3 (CNTN3)*, ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ευρήματα της έρευνας που υποστηρίζει ότι η συσχέτιση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού ήταν ακόμη πιο ισχυρή στην υποομάδα των καπνιζόντων ασθενών, χωρίς όμως να έχει αποσαφηνιστεί ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίον ο πολυμορφισμός συνδέεται με την παρουσία της νόσου [65]. Επίσης δεδομένα που προέρχονται από πιο πρόσφατες μελέτες τύπου GWAS υποστηρίζουν ότι οι χρωμοσωμικές περιοχές με την ισχυρότερη ένδειξη για γενετική προδιάθεση στο ΑΚΑ περιλαμβάνουν τον πολυμορφισμό rs7025486 στο ιντρόνιο 1 του γονιδίου *DAB2IP* (9q33.1) [66], το οποίο κωδικοποιεί έναν αναστολέα της κυτταρικής ανάπτυξης και επιβίωσης καθώς και πολυμορφισμούς των γονιδίων *LDPR* (19p13.2) [67] και *LRP1* (12q13.3) [68] το οποίο κωδικοποιεί έναν υποδοχέα της πλασματικής μεμβράνης που ενέχεται στη διαδικασία της ενδοκύτωσης των μακροφάγων και λείων μυϊκών κυττάρων. Οι παραπάνω γενετικοί τόποι εμφανίζουν ισχυρή συσχέτιση με την παρουσία του ανευρύσματος αν και ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο ενέχονται στην παθολογία του παραμένει αδιευκρίνιστος.

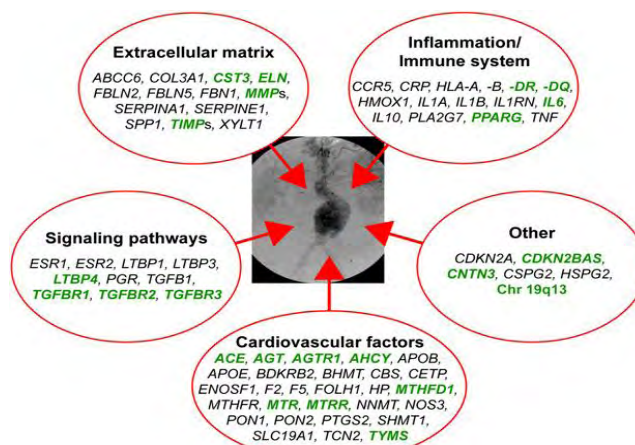
Η τελευταία προσέγγιση της μελέτης της γενετικής συνιστώσας του ΑΚΑ μπορεί να πραγματοποιηθεί με μελέτες έκφρασης των γονιδίων στον υπό μελέτη ιστό. Οι περισσότερες ερευνητικές ομάδες εστίασαν σε γονίδια που συμβάλλουν στην ανάπτυξη και ρήξη του ανευρύσματος και ανέδειξαν έναν σημαντικό αριθμό γονιδίων που παρουσιάζουν διαφοροποιημένη έκφραση στο αορτικό τοίχωμα ασθενών με ΑΚΑ συγκριτικά με το φυσιολογικό. Η πλειοψηφία των γονιδίων που διαφοροποιούνται στο ανεύρυσμα ενέχεται σε διαδικασίες αποδόμησης της εξωκυττάριας ουσίας, φλεγμονής, απόπτωσης καθώς επίσης πληθώρα γονιδίων σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη μεταγωγή ενδοκυτταρικών σημάτων (Εικόνα 7) [69]. Ενδεικτικά, μελέτες που διεξήχθησαν σε πειραματικά μοντέλα ζώων καθώς και σε ανθρώπινο ιστό ανευρύσματος ανέδειξαν διαφοροποιημένα μεταγραφικά και πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) και κυρίως των MMP-2 και MMP-9, κυτοκινών όπως

των ιντελευκινών 1 (IL-1) και 6 (IL-6) και της ιντερφερόνης γ (IFN-γ) καθώς επίσης διαφοροποιημένη είναι και η έκφραση αυξητικών παραγόντων όπως του νεκρωτικού παράγοντα όγκου (TNF-α), του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού (TGF-β) και του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα NFκB. Μέχρι στιγμής όμως δεν έχουν διαλευκανθεί πλήρως οι μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων τα παραπάνω γονίδια και σηματοδοτικά μονοπάτια ενέχονται στην παθογένεση του ανευρύσματος της κοιλιακής αορτής.

ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ	ΠΛΗΘΟΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ	ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ	ΠΛΗΘΟΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ
Immune response	28	G-protein coupled receptor protein signaling pathway	6
Signal transduction	27	Regulation of progression through cell cycle	6
Cell-cell signaling	19	Cell differentiation	5
Inflammatory response	18	Cell motility	5
Chemotaxis	17	Defense response to bacterium	5
Apoptosis	10	Induction of apoptosis ^α	5
Cell proliferation	10	Intracellular signaling cascade	5
Protein folding	10	Angiogenesis	4
Biological process	9	Antimicrobial humoral response (sensu vertebrata)	4
Cell surface receptor linked signal transduction	9	Blood coagulation	4
Multicellular organismal development	9	Caspase activation	4
Cell adhesion	8	Neutrophil chemotaxis	4
Transcription	8	Organ morphogenesis	4
Anti-apoptosis	7	Positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	4
Negative regulation of cell proliferation	7	Protein modification	4
Regulation of transcription, DNA-dependent	7		
Response to unfolded protein	7		
Positive regulation of cell proliferation	6		

Εικόνα 7: Διεργασίες και πλήθος γονιδίων με διαφοροποιημένη έκφραση σε ιστό ΑΚΑ συγκριτικά με το φυσιολογικό [Choke. et al., Eur J Vasc Endovasc. 2009].

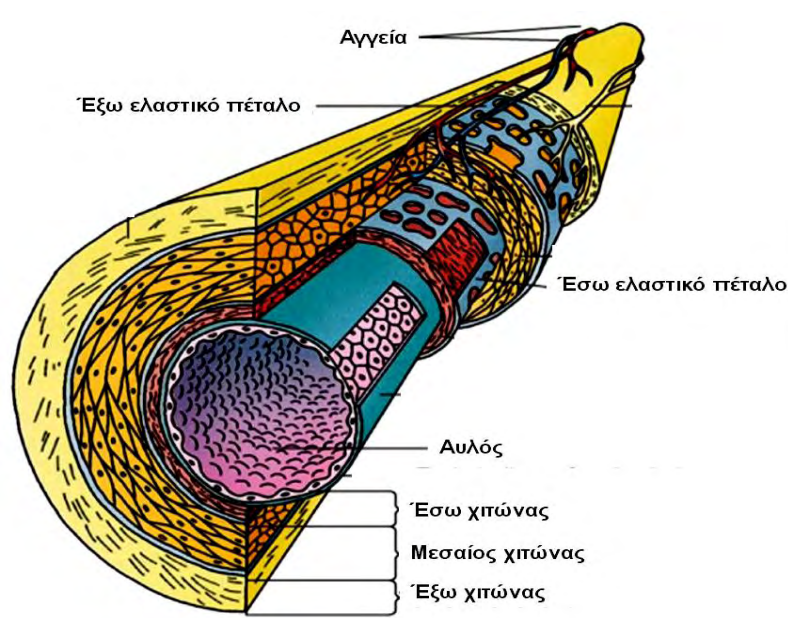
Συμπερασματικά η διερεύνηση της γενετικής συνιστώσας του ανευρύσματος έχει διεξαχθεί μέσω μελετών αναλύσεων σύνδεσης, συσχέτισης καθώς και γονιδιακής έκφρασης και έχει αναδείξει ένα σημαντικό αριθμό γονιδίων και σηματοδοτικών μονοπατιών που συμβάλλουν στην παθογένεια της νόσου (Εικόνα 6) [51].



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση των σηματοδοτικών μονοπατιών που ενέχονται στην παθολογία του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής [Hinterseher. et al., Ann Vasc Surg. 2011].

A.2 Δομή αρτηρικού τοιχώματος

Το αρτηρικό τοίχωμα αποτελείται από τρία διακριτά στρώματα ιστού (χιτώνες): α) τον έσω χιτώνα (intima), β) το μεσαίο χιτώνα (media) και γ) τον έξω χιτώνα (adventitia) (Εικόνα 8) [70].



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση του αρτηρικού τοιχώματος [Pugsley, et al., *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2000].

Συγκεκριμένα προς το εσωτερικό του αγγείου εντοπίζεται ο έσω χιτώνας ο οποίος αποτελεί τη λεπτότερη στοιβάδα του αρτηρικού τοιχώματος. Ο έσω χιτώνας αποτελείται από ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία επενδύουν τον αυλό της αρτηρίας διατεταγμένα σε ένα λεπτό στρώμα. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα σχηματίζουν μία μονή στοιβάδα πεπλατυσμένων πλακωδών κυττάρων τα οποία παρέχουν μία λεία επιφάνεια για τη ροή του αίματος. Ο συγκεκριμένος κυτταρικός τύπος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ομοίωση και διαπερατότητα του αγγείου λόγω της εκκριτικής του λειτουργικότητας. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν παράγοντες οι οποίοι δρουν ανασταλτικά στο σχηματισμό θρόμβου, ενώ επίσης συμμετέχουν στη ρύθμιση του τόνου του αρτηρικού τοιχώματος μέσω της παραγωγής αγγειοδιασταλτικών και αγγειοσυσπαστικών ουσιών. Επιπλέον ενέχονται σε φλεγμονώδεις και ανοσολογικές διεργασίες, ενώ επίσης διαταραχές της λειτουργίας τους έχουν συσχετιστεί με παθήσεις των αγγείων όπως η αθηρωμάτωση και αποφρακτικές αγγειακές διαταραχές. Υποκείμενα των ενδοθηλιακών κυττάρων έγκειται μία πολύ μικρού πάχους στοιβάδα αποτελούμενη από χαλαρό συνδετικό ιστό και περιέχει μη ινώδες κολλαγόνο, λαμίνη και ινωδονεκτίνη. Κάτωθι αυτής εντοπίζεται το έσω ελαστικό

πέταλο που συνιστά ένα λεπτό ινώδες στρώμα ελαστίνης το οποίο επιτρέπει τη διάχυση ουσιών από τον αυλό του αγγείου προς τα υπόλοιπα στρώματα του τοιχώματος καθώς επίσης διαχωρίζει τον έσω και μεσαίο χιτώνα.

Ο μεσαίος χιτώνας αποτελεί το παχύτερο στρώμα του αορτικού τοιχώματος και αποτελείται από ομόκεντρες στοιβάδες λείων μυϊκών κυττάρων τα οποία συνηθέστερα απαντώνται σε μορφή στοιβάδων επιμηκών κυττάρων με λεπτά άκρα. Τα λεία μυϊκά κύτταρα αποτελούν έναν ακόμη σημαντικό κυτταρικό τύπο του αορτικού τοιχώματος καθώς ενέχονται σε σημαντικές λειτουργίες διατήρησης της αγγειακής ομοιόστασης, ενώ επίσης διαταραχές τους έχουν ενοχοποιηθεί για τη παθογένεια καρδιαγγειακών νοσημάτων όπως η ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας. Ενδιάμεσα των λείων μυϊκών κυττάρων βρίσκονται διάσπαρτα ίνες ελαστίνης και κολλαγόνου τύπου III καθώς και φιμπρονεκτίνη και πρωτεογλυκάνες τα οποία συμβάλλουν στη διατήρηση της δυναμικής του αορτικού τοιχώματος. Η εξωτερική επιφάνεια της αορτής καλύπτεται από τον έξω χιτώνα ο οποίος διαχωρίζεται από το μεσαίο με ένα λεπτό στρώμα ελαστίνης που συνιστά το έξω ελαστικό πέταλο. Ο έξω χιτώνας του αορτικού τοιχώματος αποτελείται από ινοβλάστες καθώς επίσης και ίνες κολλαγόνου τύπου I και ελαστίνη με επιμήκη προσανατολισμό. Μέσα στον έξω χιτώνα διεισδύουν μικρότερα αγγεία τα οποία ενέχονται στην αιμάτωση των χιτώνων του αορτικού τοιχώματος και κυρίως του μεσαίου χιτώνα, ενώ επίσης το τροφοδοτούν με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά.

A.3 Λεία μυϊκά κύτταρα

A.3.1 Γενικά στοιχεία

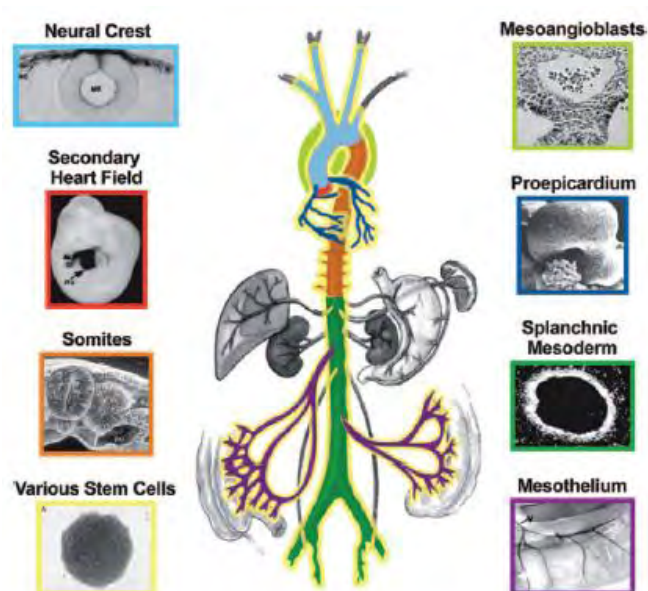
Σημαντικός κυτταρικός τύπος του αορτικού τοιχώματος είναι τα λεία μυϊκά κύτταρα (ΛΜΚ) που απαντώνται στο μεσαίο χιτώνα της αορτής καθώς οι κυτταρικές τους λειτουργίες συνεισφέρουν στη δυναμική και ελαστικότητα αυτής, ενώ διαταραχές τους έχουν συνδεθεί με την παθογένεια καρδιαγγειακών νοσημάτων. Πρόκειται για επιμήκη ατρακτοειδή κύτταρα με λεπτά άκρα τα οποία συναντώνται με τη μορφή στοιβάδων ή δεματίων. Βασικό γνώρισμα των ΛΜΚ είναι η έκφραση πρωτεϊνών, χαρακτηριστικών του συγκεκριμένου κυτταρικού πληθυσμού. Μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται η α-ακτίνη λείου μυϊκού τύπου, η σμουθελίνη, η μυοσίνη, η καλμοδουλίνη και η δεσμίνη. Επιπλέον κύρια χαρακτηριστικά της δομής τους αποτελούν η συσταλτική συσκευή και ο κυτταροσκελετός. Η συσταλτική συσκευή προκύπτει από παχιά και λεπτά νημάτια (μυϊνίδια) του κυτταροπλάσματος οργανωμένα σε κυλινδρικές δέσμες και εξυπηρετεί στη δυνατότητα συστολής των

ΛΜΚ, διεργασία απαραίτητη για τη διατήρηση της δυναμικής του αορτικού τοιχώματος [71-72]. Στην ικανότητα συστολής των ΛΜΚ συνεισφέρει η αύξηση της συγκέντρωσης των ενδοκυττάρων ιόντων Ca^{2+} τα οποία δημιουργούν σύμπλοκο με την καλμοδουλίνη και μέσω ενεργοποίησης της μυοσίνης ελαφριάς αλύσου επάγουν την πυροδότηση της συστολής. Αναφορικά με τον κυτταροσκελετό, αυτός περιβάλλει και υποστηρίζει τη συσταλτική συσκευή στο κυρίως σώμα του κυττάρου. Αποτελείται από σωμάτια α-ακτίνης και δεσμίνης, ενώ σε αγγειακά ΛΜΚ απαντάται επιπλέον και η πρωτεΐνη βιμεντίνη [71].

Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό των λείων μυϊκών κυττάρων, εκτός της κύριας λειτουργίας της συστολής, είναι η ικανότητά τους να συνθέτουν και να εκκρίνουν συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας που τα περιβάλλει επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο το μικροπεριβάλλον της αορτής. Η δυνατότητά τους αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι διαθέτουν οργανίδια τα οποία είναι χαρακτηριστικά των εκκριτικών κυττάρων όπως σύμπλεγμα Golgi και αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο. Συγκεκριμένα τα ΛΜΚ συνθέτουν κολλαγόνο τύπου IV και III, ενώ επίσης παράγουν υμενίνη, ελασίνη, φιμπρονεκτίνη, φιμπριλίνη και πρωτογλυκάνες καθώς και πρωτεάσες και ένζυμα που επηρεάζουν την αρχιτεκτονική και δομή της εξωκυττάριας ουσίας [72]. Επιπροσθέτως έχει δείχθει ότι τα ΛΜΚ μπορούν να διαιρεθούν με σκοπό τη διατήρηση ή αύξηση του αριθμού τους. Ο πολλαπλασιασμός τους πραγματοποιείται είτε στα πλαίσια της φυσιολογικής τους δραστηριότητας είτε ως απόκριση σε βλάβη των κυττάρων ή σε παθολογικά ερεθίσματα του αορτικού τοιχώματος.

Ιδιαίτερο γνώρισμα της βιολογίας των λείων μυϊκών κυττάρων συνιστά η ετερογένεια που παρατηρείται σχετικά με την προέλευσή τους τόσο κατά την εμβρυική ανάπτυξη όσο και στο αγγειακό σύστημα των ενηλίκων. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ΛΜΚ που εντοπίζονται σε διαφορετικά αγγεία ή ακόμα και σε διαφορετικές περιοχές του ίδιου αγγείου προέρχονται από διαφορετικά προγονικά κύτταρα που το καθένα έχει το δικό του αναπτυξιακό ιστορικό (Εικόνα 9). Σύμφωνα με *in vivo* και *in vitro* πειράματα, έχει προταθεί ότι η απόκριση των συγκεκριμένων κυττάρων σε ερεθίσματα του μικροπεριβάλλοντος της αορτής όπως φλεγμονώδεις διαδικασίες καθώς και διαφορές σε χαρακτηριστικά τους σχετικά με την έκφραση γονιδίων όπως η α-ακτίνη λείου μυϊκού τύπου, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την εμβρυϊκή τους καταγωγή. Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν ότι η αναπτυξιακή προέλευση των ΛΜΚ συνιστά σημαντική συνιστώσα της φυσιολογίας των αγγείων και της αορτής είτε σε φυσιολογική είτε σε παθολογική κατάσταση αυτών, ενώ επίσης αποτελεί πιθανή εξήγηση για τις διαφορές που παρατηρούνται στην παθογένεια των

καρδιαγγειακών νοσημάτων. Όλα τα παραπάνω συνηγορούν στο γεγονός ότι η διερεύνηση του αναπτυξιακού τους χάρτη θα προσέφερε νέες προοπτικές στην κατανόηση παθολογικών καταστάσεων της αορτής, ενώ επίσης θα μπορούσε να συμβάλει στην ανάπτυξη νέων εργαλείων για την αντιμετώπισή τους [73].

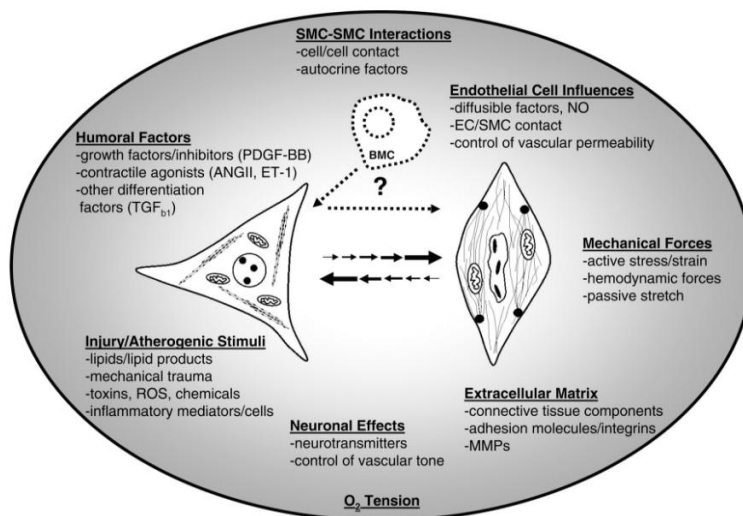


Εικόνα 9: Αναπτυξιακός χάρτης της προέλευσης των λείων μυϊκών κυττάρων. Τα διαφορετικά χρώματα υποδεικνύουν διαφορετική προέλευση [Majesky. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*].

A.3.2 Φαινοτυπική πλαστικότητα λείων μυϊκών κυττάρων

Τα λεία μυϊκά κύτταρα αποτελούν εξειδικευμένα κύτταρα τα οποία λόγω της ικανότητας συστολής τους ενέχονται στη ρύθμιση της αιματικής ροής και της αορτικής διαμέτρου. Σημαντική πρόκληση στην κατανόηση της βιολογίας τους και της εμπλοκής τους στην ομοίωση του αορτικού τοιχώματος αποτελεί το γεγονός ότι παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα φαινοτύπων και χαρακτηριστικών στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Για παράδειγμα σε αγγεία ενηλίκων, σε αντίθεση με τα πρώτα στάδια ανάπτυξης του αγγειακού συστήματος, τα ΛΜΚ παρουσιάζουν ιδιαίτερα χαμηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού, μετανάστευσης και σύνθεσης συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας καθώς επίσης εκφράζουν ένα σημαντικό αριθμό συστατικών πρωτεϊνών, όπως η α-ακτίνη λείου μυϊκού τύπου, η δεσμίνη και η σμουθελίνη, και σηματοδοτικών μορίων που απαιτούνται για τη συσταλτική τους λειτουργία [74-75]. Ωστόσο μελέτες έχουν δείξει ότι τα ΛΜΚ υφίστανται αλλαγές στο φαινότυπό τους ως απάντηση σε ερεθίσματα από το τοπικό περιβάλλον της αορτής, όπως φλεγμονή και οξειδωτικό στρες, γεγονός που φαίνεται ότι συμμετέχει ενεργά στον

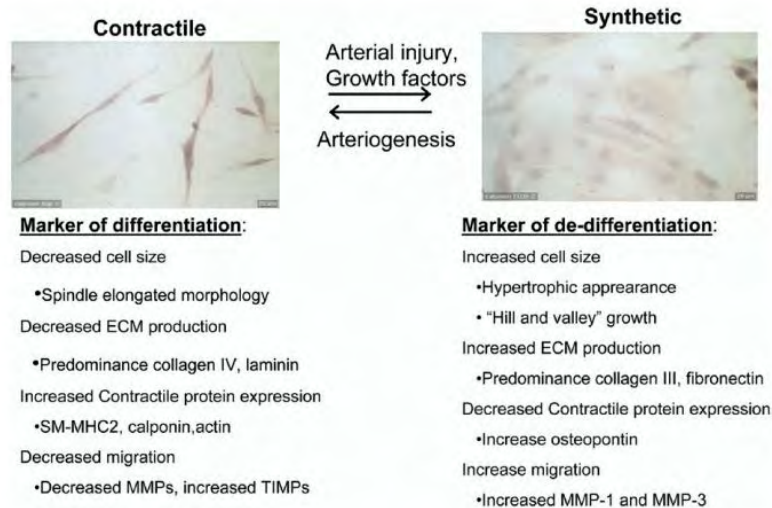
παθοφυσιολογικό μηχανισμό καρδιαγγειακών παθήσεων, ενώ επίσης έχει αναφερθεί ότι η φαινοτυπική τους αλλαγή μπορεί να προκληθεί από τραυματισμό του αορτικού τοιχώματος. Οι μεταβολές που λαμβάνουν χώρα στη φαινοτυπική κατάσταση των ΛΜΚ συνιστούν μια πολυπαραγοντική διαδικασία στην οποία ενέχονται εξωγενείς και τοπικοί παράγοντες καθώς και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις. Τα τελευταία όμως χρόνια μελέτες έχουν αναδείξει και τη γενετική βάση του παραπάνω φαινομένου δεδομένου ότι σημαντικός αριθμός γονιδίων, όπως ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας PDGF και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες, καθώς και μοριακών μηχανισμών ρύθμισης αυτών, όπως φλεγμονώδεις διεργασίες και οξειδωτικό στρες, συμβάλλουν στη φαινοτυπική ποικιλομορφία των λείων μυϊκών κυττάρων (Εικόνα 10) [75-77].



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση παραγόντων που ενέχονται στη φαινοτυπική διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων [Owens. et al., *Physiol Rev.* 2004].

A.3.2.1 Φαινότυποι των λείων μυϊκών κυττάρων

Τα λεία μυϊκά κύτταρα, όπως έχει ήδη προαναφερθεί, επιτελούν πληθώρα λειτουργιών οι οποίες έχουν συσχετιστεί με την ύπαρξη δύο διακριτών φαινοτύπων των συγκεκριμένων κυττάρων. Ειδικότερα τα ΛΜΚ του αορτικού τοιχώματος απαντώνται στο συσταλτικό και συνθετικό φαινότυπο οι οποίοι παρουσιάζουν μεταξύ τους σημαντικές διαφορές όσο αφορά στη μορφολογία, στα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών είτε σε χαρακτηριστικά του κυτταροσκελετού τους είτε πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε πρωτεολυτικές διεργασίες καθώς επίσης τροποποιήσεις παρατηρούνται αναφορικά και με το ρυθμό πολλαπλασιασμού και μετανάστευσής τους (Εικόνα 11) [78-79].



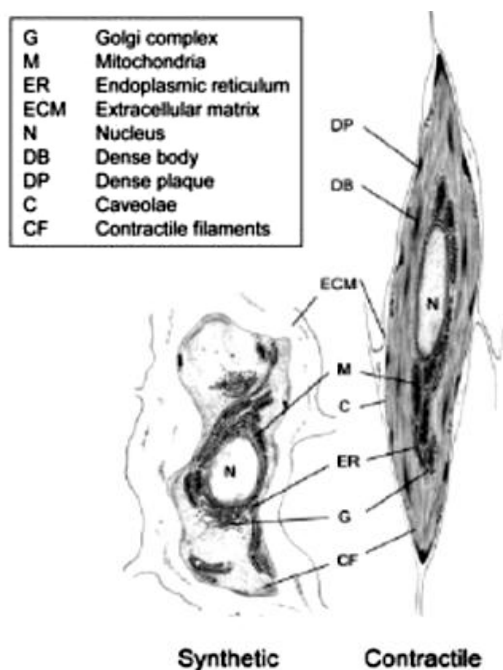
Εικόνα 11: Φαινοτυπική διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων από το συσταλτικό (contractile) στο συνθετικό (synthetic) φαινότυπο. Βασικά χαρακτηριστικά και διαφορές μεταξύ των δύο φαινοτύπων [Rzucidlo. et al., J Vasc Surg. 2007].

Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι οι παραπάνω διαφορές είναι δυνατόν να παρατηρηθούν ακόμα και σε ΛΜΚ που εντοπίζονται στο ίδιο αγγείο. Η φαινοτυπική αυτή ποικιλομορφία των ΛΜΚ κατά ένα μέρος της μπορεί να αποδοθεί στη διαφορετική εμβρυϊκή τους προέλευση [80]. Ωστόσο νεότερα δεδομένα υποστηρίζουν ότι τα ΛΜΚ διαθέτουν την αξιοσημείωτη ικανότητα της φαινοτυπικής διαφοροποίησης η οποία σηματοδοτεί τη μετάβασή τους από το συσταλτικό στο συνθετικό φαινότυπο ως απάντηση σε ερεθίσματα του τοπικού περιβάλλοντος στο αορτικό τοίχωμα [81]. Αποτέλεσμα της αλλαγής στο φαινότυπο των συγκεκριμένων κυττάρων είναι και ο διαφορετικός τους εντοπισμός στο τοίχωμα της αορτής. Συγκεκριμένα ο συσταλτικός φαινότυπος απαντάται σε ΛΜΚ του μεσαίου αορτικού χιτώνα υπό φυσιολογικές συνθήκες, ενώ τα ΛΜΚ του συνθετικού φαινοτύπου συναντώνται στον υποενδοθηλιακό χώρο παθολογικής αορτής [75,80].

Ο **συσταλτικός φαινότυπος** συνιστά το διαφοροποιημένο φαινότυπο των λείων μυϊκών κυττάρων ο οποίος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση του τόνου του αορτικού τοιχώματος καθώς επηρεάζεται από αγγειοδραστικές ουσίες όπως η αγγειοτενσίνη II, προσταγλανδίνη, επινεφρίνη και το μονοξειδίο του αζώτου. Κύριο χαρακτηριστικό του είναι ο χαμηλός ρυθμός πολλαπλασιασμού και η μειωμένη παραγωγή συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας, η οποία περιορίζεται στη σύνθεση κολλαγόνου τύπου IV και λαμινίνης. Αντιθέτως, ο **συνθετικός φαινότυπος** θεωρείται αποδιαφοροποιημένος και αποτελεί βασικό παθολογικό ιστολογικό εύρημα καρδιαγγειακών νοσημάτων και κυρίως της αθηρωμάτωσης. Μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε πειραματικά μοντέλα ζώων υποστηρίζουν ότι ο συνθετικός φαινότυπος

προκύπτει από τη διαφοροποίηση του συσταλτικού κατά την οποία ΛΜΚ του μεσαίου αορτικού χιτώνα μεταναστεύουν στον υποενδοθηλιακό χώρο της αορτής ως απάντηση σε ερεθίσματα του μικροπεριβάλλοντος αυτής [81]. Τα λεία μυϊκά κύτταρα του συνθετικού φαινοτύπου, σε αντίθεση με αυτά του συσταλτικού, συνθέτουν και εκκρίνουν αυξημένες ποσότητες ουσιών του συνδετικού ιστού όπως κολλαγόνο τύπου III και φιβρονεκτίνη, ενώ επίσης διατηρούν υψηλούς ρυθμούς πολλαπλασιασμού και την ικανότητα μετανάστευσης.

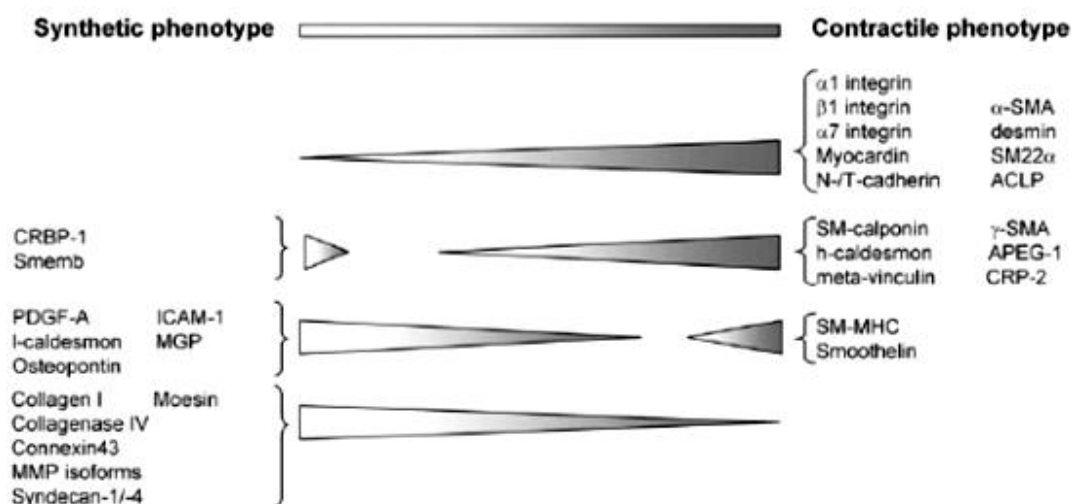
Επιπρόσθετα μια σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο φαινοτύπων έγκειται στη μορφολογία τους. Τα ΛΜΚ του συσταλτικού φαινοτύπου είναι επιμήκη ατρακτοειδή κύτταρα, ενώ τα συνθετικά είναι λιγότερο επιμήκη και συνήθως αναφέρονται ως επιθηλιοειδή ή ρομβοειδή. Επιπλέον τα ΛΜΚ του συνθετικού φαινοτύπου περιέχουν μεγάλο αριθμό οργανιδίων απαραίτητων για την πρωτεϊνοσύνθεση, ενώ αντιθέτως τα οργανίδια αυτά στο συσταλτικό φαινότυπο έχουν αντικατασταθεί στο μεγαλύτερο τμήμα τους από συσταλτικές ίνες (Εικόνα 12) [81-82].



Εικόνα 12: Μορφολογία λείου μυϊκού μύος συνθετικού (synthetic) και συσταλτικού (contractile) φαινοτύπου [Rensen. et al., Neth Heart J. 2007].

Ο χαρακτηρισμός των λείων μυϊκών κυττάρων μπορεί επίσης να επιτευχθεί με τη διερεύνηση της έκφρασης συγκεκριμένων πρωτεϊνών χαρακτηριστικών κάθε φαινοτύπου. Στην πλειονότητά τους οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν χαρακτηριστικούς δείκτες των ΛΜΚ και αφορούν συνήθως σε πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού τους.

Επιπλέον η προσέγγιση αυτή επιτρέπει το διαχωρισμό μεταξύ των δύο φαινοτύπων καθώς μελέτες έχουν δείξει ότι οι πρωτεΐνες αυτές παρουσιάζουν διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ του συσταλτικού και συνθετικού φαινοτύπου η οποία ακολουθεί σταδιακή τροποποίηση κατά τη μετάβαση από τη μία φαινοτυπική κατάσταση στην άλλη. Μεταξύ των πρωτεϊνών συγκαταλέγονται η α-ακτίνη λείου μυϊκού τύπου, η δεσμίνη, η σμουθελίνη, η μιοσίνη βαριάς αλύσου και η βιμεντίνη [78,83-84]. Οι περισσότερες από τις ανωτέρω πρωτεΐνες ενέχονται στη συστολή των ΛΜΚ είτε ως ρυθμιστές της είτε ως δομικά στοιχεία της συσταλτικής τους συσκευής. Πληθώρα ερευνών αναφέρει ότι τα ΛΜΚ διαφορετικού φαινοτύπου εκφράζουν κυμαινόμενα επίπεδα των ίδιων πρωτεϊνικών δεικτών και όχι εντελώς διαφορετικούς πρωτεϊνικούς δείκτες με αποτέλεσμα η μεταξύ τους διάκριση να απαιτεί πληροφορίες που αφορούν στα επίπεδα έκφρασης τουλάχιστον δύο πρωτεϊνών (Εικόνα 13) [75,78,83-84].



Εικόνα 13: Φαινοτυπική διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων από το συσταλτικό (contractile) στο συνθετικό (synthetic) φαινότυπο. Βασικά χαρακτηριστικά και διαφορές μεταξύ των δύο φαινοτύπων [Rensen. et al., Neth Heart J. 2007].

Σύμφωνα με τη μέχρι σήμερα βιβλιογραφία καλά χαρακτηρισμένοι πρωτεϊνικοί δείκτες για τη διάκριση των δύο φαινοτύπων των ΛΜΚ αποτελούν η α-ακτίνη λείου μυϊκού τύπου, η δεσμίνη και η μιοσίνη βαριάς αλύσου. Συγκεκριμένα πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η έκφραση των προαναφερθέντων πρωτεϊνών συνηγορεί υπέρ του συσταλτικού φαινοτύπου των λείων μυϊκών κυττάρων, ενώ απουσία έκφρασης της δεσμίνης και μιοσίνης σε συνδυασμό με μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της α-ακτίνης λείου μυϊκού τύπου υποδεικνύουν το συνθετικό φαινότυπο των ΛΜΚ [75,85]. Μεταγενέστερη

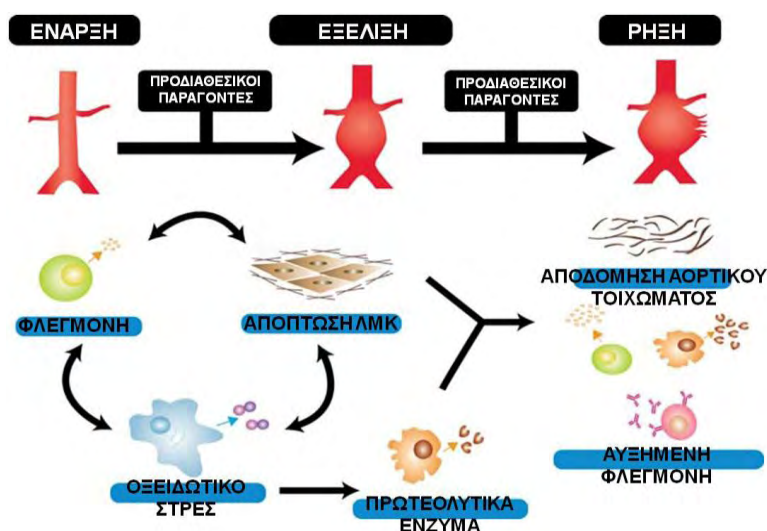
ανοσοϊστοχημική μελέτη, η οποία πραγματοποιήθηκε σε ιστό αθηρωματικής στεφανιαίας αρτηρίας, έρχεται να προσθέσει ένα επιπλέον μοτίβο πρωτεϊνικής έκφρασης, χαρακτηριστικό του συνθετικού φαινοτύπου. Σύμφωνα με τα ευρήματα της παραπάνω μελέτης, αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της βιμεντίνης και ταυτόχρονα μείωση της πρωτεϊνικής έκφρασης α-ακτίνης και απουσία δεσμίνης σηματοδοτούν την υιοθέτηση του συνθετικού φαινοτύπου από τα λεία μυϊκά κύτταρα [86]. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν προηγούμενα πειραματικά δεδομένα όπου η υιοθέτηση του συνθετικού φαινοτύπου από τα ΛΜΚ αρουραίου στην καρωτίδα, η οποία επήλθε μετά από τραυματισμό της, συσχετίστηκε με την πρωτεϊνική έκφραση της βιμεντίνης [87].

Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό των λείων μυϊκών κυττάρων αλλά συγχρόνως και «πρόβλημα» των *in vitro* μελετών, συνιστά το γεγονός ότι η φαινοτυπική τους διαφοροποίηση λαμβάνει χώρα και σε πρωτογενείς καλλιέργειες αυτών, συνοδευόμενη από υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού καθώς και μείωση των επιπέδων έκφρασης συστατικών πρωτεϊνών [76,82,88]. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι όταν τα ΛΜΚ βρεθούν σε περιβάλλον καλλιέργειας παρουσιάζουν σταδιακή μείωση της πρωτεϊνικής έκφρασης μορίων χαρακτηριστικών του συστατικού φαινοτύπου με αποτέλεσμα τη μεταστροφή τους στο συνθετικό φαινότυπο. Συνήθως η παρουσία ΛΜΚ του συστατικού φαινοτύπου σε πρωτογενείς καλλιέργειες περιορίζεται στις πρώτες 1-3 ημέρες, ενώ στη συνέχεια αναδιαμόρφωση και ανακατανομή των πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού τους πυροδοτούν τη διαφοροποίησή τους στο συνθετικό φαινότυπο [89]. Η δυσκολία διατήρησης του συστατικού φαινοτύπου των λείων μυϊκών κυττάρων σε *in vitro* επίπεδο, καθιστά επιτακτική την ανάγκη δημιουργίας ενός μοντέλου καλλιέργειας που θα επέτρεπε τη διατήρηση του φυσιολογικού συστατικού τους φαινοτύπου και κατ' επέκταση την καλύτερη μελέτη της παθογένειας νοσημάτων της αορτής σχετιζόμενες και με διαταραχές των λείων μυϊκών κυττάρων.

A.4 Παθογένεια ανευρύσματος κοιλιακής αορτής

Το ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής αντιπροσωπεύει μία πολύπλοκη δυναμική παθοφυσιολογική διαδικασία παρά ένα στατικό παθολογικό πρόβλημα. Αν και τα τελευταία χρόνια τα αποτελέσματα πληθώρας ερευνών έχουν οδηγήσει σε μία πλησιέστερη εικόνα της παθογένειας του ανευρύσματος, οι μοριακοί μηχανισμοί που ενέχονται στην ανάπτυξη του παραμένουν σε μεγάλο βαθμό έως σήμερα αδιευκρίνιστοι.

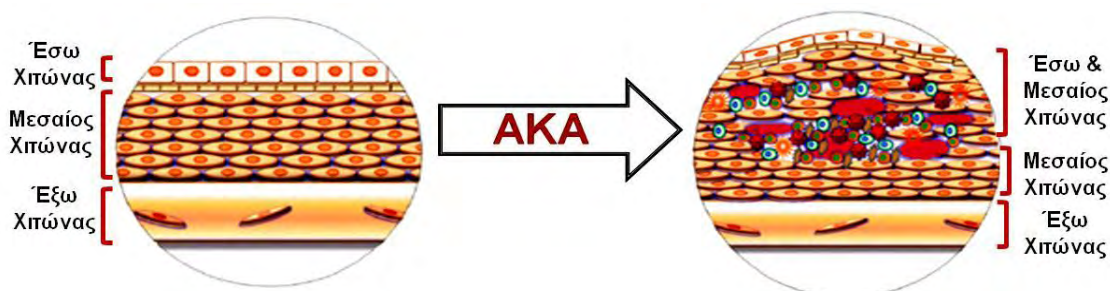
Σύμφωνα με τα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα φαίνεται ότι στον **παθοφυσιολογικό μηχανισμό** του ΑΚΑ ενέχεται η **χρόνια φλεγμονή** που χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση φλεγμονωδών κυττάρων στο αορτικό τοίχωμα, η απόπτωση των λείων μυϊκών κυττάρων (ΛΜΚ) του μεσαίου αορτικού χιτώνα καθώς και η **πρωτεολυτική διάσπαση** του αορτικού τοιχώματος λόγω της ενισχυμένης δράσης πρωτεολυτικών ενζύμων (Εικόνα 14) [6,90].



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση της παθολογίας του ΑΚΑ [Kuivaniemi. et al., Expert Rev Cardiovasc Ther. 2015].

Οι παραπάνω διαδικασίες επιφέρουν αφενός αναδιαμόρφωση της αρχιτεκτονικής του τοιχώματος της αορτής και αφετέρου απώλεια της ελαστικής και του κολλαγόνου, απαραίτητων στοιχείων για τη διατήρηση της δυναμικής του τοιχώματος. Συνέπεια των ανωτέρω είναι να παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές στο πάχος των χιτώνων της ανευρυσματικής αορτής. Συγκεκριμένα ιστολογικές αναλύσεις του ΑΚΑ δείχνουν σημαντική ατροφία του μεσαίου χιτώνα της αορτής, ενώ επίσης αλλαγές παρατηρούνται και στην πάχυνση της υποκείμενης στο ενδοθήλιο στοιβάδας με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός μεγαλύτερου σε πάχος υποενδοθηλιακού χώρου (έσω και μεσαίος χιτώνας) (Εικόνα 15). Επακόλουθο των

παραπάνω είναι η τοπική λέπτυνση του αορτικού τοιχώματος όπου με τη ροή του αίματος αυτό διογκώνεται και δημιουργείται το ανεύρυσμα.



Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση των μεταβολών στο πάχος των χιτώνων του αορτικού τοιχώματος στο ΑΚΑ.

A.4.1 Φλεγμονή και ανοσολογικές αντιδράσεις στην παθογένεια του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής

Η χρόνια φλεγμονή αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό του παθοφυσιολογικού μηχανισμού του ΑΚΑ, αν και μέχρι σήμερα παραμένει αδιευκρίνιστο το ακριβές ερέθισμα αυτής. Ιστολογικές μελέτες έχουν δείξει εκτεταμένη διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων (μακροφάγα, πλασματοκύτταρα, Β-λεμφοκύτταρα, Τ-λεμφοκύτταρα) στο τοίχωμα ανευρυσματικής αορτής και κυρίως στον εξωτερικό χιτώνα αυτής καθώς και στα εξωτερικά στρώματα του μεσαίου χιτώνα [91]. Επακόλουθο της συσσώρευσης φλεγμονωδών κυττάρων αποτελεί η πυροδότηση ενός καταρράκτη κυτοκινών με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση και απελευθέρωση αποικοδομητικών ενζύμων όπως μεταλλοπρωτεϊνολυτικές (MMPs) και πρωτεασών, τα οποία οδηγούν σε καταστροφή του συνδετικού ιστού. Μεταξύ των κυτοκινών που παράγονται συγκαταλέγονται οι ιντερλευκίνες (ILs), IL-1β, IL-6, IL-8 καθώς και η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκου (TNF-α), αυξημένα επίπεδα των οποίων έχουν αναφερθεί στο τοίχωμα αορτής με ΑΚΑ καθώς επίσης υψηλά επίπεδα αυτών στον ορό του περιφερικού αίματος έχουν συσχετιστεί με την παρουσία ανευρύσματος [91-93].

Επιπλέον σημαντικός αριθμός μελετών υποστηρίζει ότι σημαντικό ρόλο στη δημιουργία και εξέλιξη της ανευρυσματικής νόσου διαδραματίζει και η αυτοάνοση διαδικασία. Η παραπάνω υπόθεση ενισχύεται κυρίως από ευρήματα που αναφέρουν υψηλά επίπεδα ανοσοδραστικότητας της ανοσοσφαιρίνης IgG στο τοίχωμα ασθενών με ΑΚΑ. Επιπρόσθετα ενδιαφέρον παρουσιάζουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η εμφάνιση του ανευρύσματος πυροδοτείται από απάντηση των Τ-λεμφοκυττάρων καθοδηγούμενη από διάφορα αντιγόνα. Συγκριμένα έχει αναφερθεί ότι οι διάφοροι

κυτταρικοί τύποι που συναντώνται στο αορτικό τοίχωμα ασθενών με ΑΚΑ όπως μακροφάγα, λεία μυϊκά κύτταρα και ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να δράσουν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα προς τα Τ-λεμφοκύτταρα δεδομένου ότι εκφράζουν το αντιγόνο ιστοσυμβατότητας HLA-DR ενεργοποιώντας με αυτόν τον τρόπο την ανοσολογική απόκριση. Πιθανά αντιγόνα επίσης μπορούν να θεωρηθούν η ελασίνη, το κολλαγόνο, η οξειδωμένη μορφή της λιποπρωτεΐνης, ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV) καθώς και η αντιγονική πρωτεΐνη-40 η οποία έχει συσχετιστεί με το ΑΚΑ δρώντας ως χημιοτακτικός παράγοντας [91,94-95]. Παρ' όλα αυτά παραμένει άγνωστο μέχρι σήμερα αν οι φλεγμονώδεις διεργασίες στο ΑΚΑ επάγονται από την παρουσία αντιγόνων.

A.4.2 Πρωτεολυτική αποδόμηση του συνδετικού ιστού στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής

Ο εκφυλισμός του αορτικού τοιχώματος είναι το τελικό αποτέλεσμα μιας πολυπαραγοντικής διαδικασίας η οποία καταλήγει στην καταστροφή του συνδετικού ιστού. Πληθώρα μελετών έχει συσχετίσει την ανάπτυξη του ΑΚΑ με την αυξημένη τοπικά παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων τα οποία αποικοδομούν απαραίτητα δομικά στοιχεία του αορτικού τοιχώματος, όπως η ελασίνη και το κολλαγόνο έχοντας ως αποτέλεσμα την εκφύλιση, κυρίως, του μεσαίου αορτικού χιτώνα. Με βάση τη πρόσφατη βιβλιογραφία φαίνεται ότι στο ΑΚΑ τέσσερις κυρίως μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs), οι MMP-2, MMP-9, MMP-7, MMP-12, διασπούν ελαστικές ίνες, ενώ επίσης έχουν αναφερθεί αυξημένα επίπεδα έκφρασης άλλων τριών MMPs (MMP-1, MMP-8, MMP-13) οι οποίες ενέχονται στην αποδόμηση του κολλαγόνου [96-97]. Μεταξύ των παραπάνω ενζύμων, η MMP-2 και η MMP-9 αποτελούν τις πιο διεξοδικά μελετημένες MMPs στο ΑΚΑ δεδομένου ότι αυξημένα μεταγραφικά και πρωτεϊνικά επίπεδα αυτών έχουν βρεθεί στο αορτικό τοίχωμα των ασθενών με ΑΚΑ [91,96-97].

Ο ρόλος τους στην παθογένεια της νόσου ενισχύεται περαιτέρω από μελέτες σε πειραματικά μοντέλα της νόσου όπου αποσιώπηση των αντίστοιχων γονιδίων ανέστειλε την ανάπτυξη ΑΚΑ, ενώ υπερέκφραση αυτών πυροδότησε την πρωτεολυτική διάσπαση του συνδετικού ιστού. Επιπρόσθετα ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν δεδομένα που υποδεικνύουν ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των MMP-2 και MMP-9 και του μεγέθους των ανευρυσμάτων. Συγκεκριμένα οι Freestone και συν. (1998) έδειξαν ότι η MMP-2 είναι αυξημένη στα μικρού μεγέθους ανευρύσματα γεγονός που παρέχει ενδείξεις για τη συμβολή της MMP-2 στη γένεση του ανευρύσματος [98]. Αντιθέτως, τα μεταγραφικά επίπεδα

έκφρασης της MMP-9 παρουσιάζονται αυξημένα σε μεγαλύτερης διαμέτρου ανευρύσματα καθιστώντας την MMP-9 σημαντικό μόριο στην εξέλιξη ή και ρήξη του ΑΚΑ [99]. Σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των MMPs κατέχουν οι ιστικοί αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases, TIMPs), οι οποίοι σε φυσιολογική κατάσταση παρουσιάζουν πιο ενισχυμένη δράση από αυτήν των MMPs διατηρώντας με αυτόν τρόπο την ομοιοστασία του αορτικού τοιχώματος. Αντιθέτως, στο ΑΚΑ παρατηρούνται διαταραχές στην ισορροπία μεταξύ MMPs-TIMPs καθώς τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης των τελευταίων αδυνατούν να καταστείλουν τη λειτουργία των ενζύμων.

Ο σημαντικός ρόλος της πρωτεόλυσης στην παθογένεια της νόσου ενισχύεται περαιτέρω από ιστολογικά ευρήματα που δείχνουν ότι θραύσματα που προκαλούνται από την αποικοδόμηση του συνδετικού ιστού, διευκολύνουν τη μετανάστευση των φλεγμονωδών κυττάρων από τον εξωτερικό χιτώνα στους υπόλοιπους της αορτής [6]. Συνέπεια των παραπάνω είναι το αορτικό τοίχωμα να γίνεται λιγότερο ανθεκτικό και να μειώνεται η δυναμική του με αποτέλεσμα να διατάσσεται και να δημιουργείται το ανεύρυσμα.

A.4.3 Ο ρόλος των λείων μυϊκών κυττάρων στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής

Κυρίαρχο ιστοπαθολογικό εύρημα του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής αποτελεί η εκφύλιση του μεσαίου αορτικού χιτώνα η οποία πιθανώς οφείλεται σε διαταραχές της ισορροπίας μεταξύ των πρωτεολυτικών διεργασιών και της σύνθεσης ουσιών της εξωκυττάριας ουσίας. Μελέτες προτείνουν ότι σημαντικό ρόλο στο παραπάνω φαινόμενο διαδραματίζουν τα λεία μυϊκά κύτταρα τα οποία ενισχύουν τον εκφυλισμό της αορτής με ΑΚΑ είτε μέσω ενίσχυσης των αποικοδομητικών διαδικασιών καθώς εκκρίνουν αυξημένες ποσότητες πρωτεολυτικών ενζύμων είτε μέσω της ανεπαρκούς σύνθεσης συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας [96,100-101]. Η πλειοψηφία των μελετών αναφορικά με την εμπλοκή των ΛΜΚ στον παθογενετικό μηχανισμό του ανευρύσματος περιγράφει μειωμένη πυκνότητα των συγκεκριμένων κυττάρων στο μεσαίο χιτώνα της αορτής ως επακόλουθο της ενεργοποίησης αποπτωτικών σηματοδοτικών μονοπατιών [102-106].

Η απόπτωση που υφίστανται τα ΛΜΚ στο ΑΚΑ, κατά ένα μέρος της, αποδίδεται σε διαταραχές της δομής τους. Συγκεκριμένα ανοσοϊστοχημική μελέτη υποδεικνύει ανακατανομή της α-ακτίνης λείου μυϊκού τύπου, η οποία όπως έχει ήδη αναφερθεί αποτελεί χαρακτηριστικό δείκτη των ΛΜΚ, όπου πρωτεϊνική έκφρασή της σε ανευρυσματικά λεία μυϊκά κύτταρα παρατηρείται στην περιπυρηνική περιοχή, σε

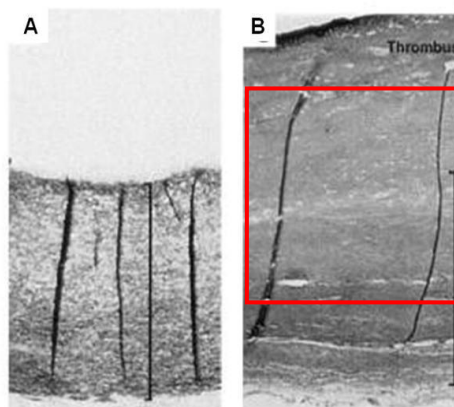
αντίθεση με αυτά της φυσιολογικής αορτής στα οποία η α-ακτίνη κατανέμεται σε όλον τον κυτταροσκελετό [107]. Η διαφορά στον εντοπισμό της α-ακτίνης στα ΛΜΚ του ανευρύσματος επιφέρει διαταραχές στην κυτταρική τους λειτουργία με συνέπεια την απόπτωσή τους. Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι η παρουσία αποπτωτικών σωματιδίων σε ΛΜΚ του ανευρύσματος έχει συνδεθεί με τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της α-ακτίνης τα οποία εμφανίζουν μείωση της τάξης του 90% γεγονός που συνηγορεί υπέρ της απόπτωσης των κυττάρων [108]. Επιπροσθέτως πιθανολογείται ότι η επαγωγή της απόπτωσης των ανευρυσματικών λείων μυϊκών κυττάρων προκαλείται από την ενεργοποίηση γονιδίων που ενέχονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια της απόπτωσης όπως του υποδοχέα Fas και του προσδετικού του μορίου Fas Ligand (FasL) καθώς και του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53. Μελέτες περιγράφουν αυξημένη έκφραση των ανωτέρω μορίων στο τοίχωμα αορτής με ΑΚΑ, η οποία δεδομένου ότι συνεντοπίζεται με την πρωτεϊνική έκφραση της α-ακτίνης υποδεικνύει την παρουσία αποπτωτικών λείων μυϊκών κυττάρων. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η πυροδότηση των συγκεκριμένων αποπτωτικών σηματοδοτικών οδών στο ανεύρυσμα προκαλείται είτε από έκκριση φλεγμονωδών κυτοκινών είτε από άμεση αλληλεπίδραση των ΛΜΚ με φλεγμονώδη κύτταρα που συσσωρεύονται στο τοίχωμα ανευρυσματικής αορτής και κυρίως των T-λεμφοκυττάρων τα οποία εκφράζουν το γονίδιο *FasL* [102-106].

Η συμμετοχή των ΛΜΚ στην παθοφυσιολογία της ανευρυσματικής νόσου αναδεικνύεται περαιτέρω από μελέτες που αφορούν στο φαινότυπό τους, καθώς η φαινοτυπική κατάσταση των συγκεκριμένων κυττάρων έχει συσχετιστεί με την παθογένεια καρδιαγγειακών νοσημάτων. Σύμφωνα με τα ευρήματα *in vivo* και *in vitro* μελετών, φαίνεται ότι τα ΛΜΚ παρουσιάζουν μια ξεχωριστή μορφολογία και φαινοτυπική κατάσταση στην ανευρυσματική νόσο [109-112]. Οι ανωτέρω έρευνες αναφέρουν αυξημένη παραγωγή πρωτεασών και μειωμένα επίπεδα έκφρασης συσταλτικών πρωτεϊνών όπως η α-ακτίνη λείου μυϊκού τύπου στα ΛΜΚ του ΑΚΑ, ενώ αντικρουόμενα είναι τα αποτελέσματά τους σχετικά με το ρυθμό πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης των κυττάρων. Τα παραπάνω παρέχουν ενδείξεις ότι τα ΛΜΚ πιθανότατα υφίστανται τροποποιήσεις στο φαινότυπό τους στο ανεύρυσμα χωρίς όμως να έχει αποσαφηνιστεί μέχρι σήμερα αν οι φαινοτυπικές μεταβολές τους αποτελούν αιτιογενή παράγοντα του ΑΚΑ ή αποτέλεσμα της παθογένειας του.

A.5 Ανεύρυσμα Κοιλιακής Αορτής και Αθηρωμάτωση

Η παρουσία αθηρωματικών αλλοιώσεων αποτελεί συχνό εύρημα της αορτής σε ασθενείς με ΑΚΑ [113], ενώ παράλληλα σημαντικός αριθμός μελετών συνηγορεί υπέρ της συσχέτισης του ανευρύσματος με την αθηρωματική νόσο. Παρά τη σύνδεση των δύο παθήσεων, δεν έχει διευκρινιστεί μέχρι σήμερα εάν η ύπαρξη αθηρωμάτωσης διαδραματίζει αιτιογενή ρόλο στην ανάπτυξη του ΑΚΑ υποδηλώνοντας πιθανώς μια κοινή μοριακή βάση των δύο νοσημάτων ή απλώς παρουσιάζουν ομοιότητες σχετικά στην κλινική τους εικόνα [114-116]. Μερίδα της επιστημονικής κοινότητας παραλληλίζει τις δύο ασθένειες, καθώς προδιαθεσικοί παράγοντες που αυξάνουν τη συχνότητα εμφάνισης του ΑΚΑ συμπίπτουν με αυτούς της αθηρωματικής νόσου. Μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες υποστηρίζουν ότι η προχωρημένη ηλικία, το άρρεν φύλο και το κάπνισμα θεωρούνται επιβαρυντικοί παράγοντες για την εμφάνιση ανευρύσματος και αθηρωμάτωσης, ενώ επίσης στους κοινούς προδιαθεσικούς παράγοντες συγκαταλέγονται η υπέρταση και τα επίπεδα της χοληστερόλης στον ορό των ασθενών [23,29,114-116].

Επιπροσθέτως ιδιαίτερη σημασία παρουσιάζουν ερευνητικά δεδομένα τα οποία αναδεικνύουν το σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας ως πιθανό παθοφυσιολογικό μηχανισμό του ανευρύσματος. Το γεγονός αυτό αποτέλεσε και το έναυσμα για την εισαγωγή του όρου «αθηρωματικά ανευρύσματα», ο οποίος χρησιμοποιείται ευρέως μέχρι και σήμερα. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές συχνό ιστολογικό εύρημα του τοιχώματος ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής συνιστά η ύπαρξη αθηρωματικών αλλοιώσεων μεταξύ του έσω και μεσαίου χιτώνα με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός μεγαλύτερου σε πάχους υποενδοθηλιακού χώρου. Η δημιουργία ενός μεγαλύτερου σε πάχους υποενδοθηλιακού χώρου θεωρείται παθολογικό εύρημα καθώς φέρει στοιχεία του έσω και μεσαίου χιτώνα της αορτής, ενώ πολλές φορές στη βιβλιογραφία είναι δυνατόν να αναφέρεται μόνο ως έσω χιτώνας. Στην πλειοψηφία τους πρόκειται για προχωρημένες βλάβες που χαρακτηρίζονται από το σχηματισμό ινολιπωδών πλακών συνοδευόμενων από υπερκείμενη θρόμβωση και ενδοτοιχωματική αιμορραγία (Εικόνα 16) [114,117-118].



Εικόνα 16: Απεικόνιση αορτικού τοιχώματος (Α) φυσιολογικής κοιλιακής αορτής και (Β) κοιλιακής αορτής με ΑΚΑ και αθηρωματικές αλλοιώσεις [Thompson. et al., *Curr Probl Surg.* 2009].

Η παρουσία αθηρωματικών βλαβών στο τοίχωμα της αορτής έχει συσχετιστεί με τη διάταση αυτής και κατ' επέκταση τη δημιουργία ανευρύσματος. Όσο αφορά στο μοριακό μηχανισμό εμπλοκής της αθηρωμάτωσης στο ΑΚΑ, έχει προταθεί ότι οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις και εκκρίσεις καθώς και η εκφύλιση του συνδετικού ιστού λόγω της έντονης ενζυματικής δραστηριότητας των πρωτεασών στο ΑΚΑ, ενισχύονται από την ύπαρξη αθηρωματικών ερεθισμάτων στο αορτικό τοίχωμα. Συνέπεια των παραπάνω είναι η μείωση της ελαστικότητας και η διάταση της κοιλιακής αορτής αναδεικνύοντας την αθηρωματική νόσο σημαντική συνιστώσα της παθογένειας του ανευρύσματος [116-117].

Ειδικότερα ο παθογενετικός μηχανισμός της αθηρωμάτωσης είναι συνυφασμένος με διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων οι οποίες συμβάλλουν στο σχηματισμό ή και ρήξη της αθηρωματικής πλάκας. Είναι γενικά αποδεκτό ότι η ενδοκυτταρική περιεκτικότητα των λιπιδίων καθορίζεται αυστηρά από μία διαδικασία εισόδου-εξόδου. Μελέτες έχουν δείξει ότι διαταραχές στην ισορροπία των μηχανισμών που ενέχονται στην είσοδο και εκροή των λιπιδίων από τα κύτταρα έχουν ως αποτέλεσμα τη μεγάλο βαθμού εξωκυτάρια και ενδοκυτάρια εναπόθεση λιπιδίων διαδραματίζοντας με αυτόν τον τρόπο σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη της αθηρωματικής νόσου [119-120].

Δεδομένου του ρόλου και της συμβολής του μεταβολισμού των λιπιδίων και των διαταραχών του στην παθογένεια της αθηρωμάτωσης, καθώς επίσης λαμβάνοντας υπ' όψιν τον παραλληλισμό της αθηρωματικής και ανευρυσματικής νόσου, μόρια που ενέχονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων προσέλκυσαν το ερευνητικό ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας αναφορικά με την παθογένεια του ΑΚΑ.

A.6 Ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής και μεταβολισμός λιπιδίων

A.6.1 Ο μεταβολισμός των λιπιδίων σε κυτταρικό επίπεδο

Η χοληστερόλη και τα λιπίδια συνιστούν βασικό συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών και διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην κυτταρική βιολογία των ευκαρυωτικών οργανισμών. Ειδικότερα, τα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης είναι απαραίτητα για τις διάφορες βιολογικές λειτουργίες των κυττάρων από τη διαμεμβρανική μεταφορά ουσιών μέχρι και τη μεταγωγή ενδοκυτταρικών σημάτων [121].

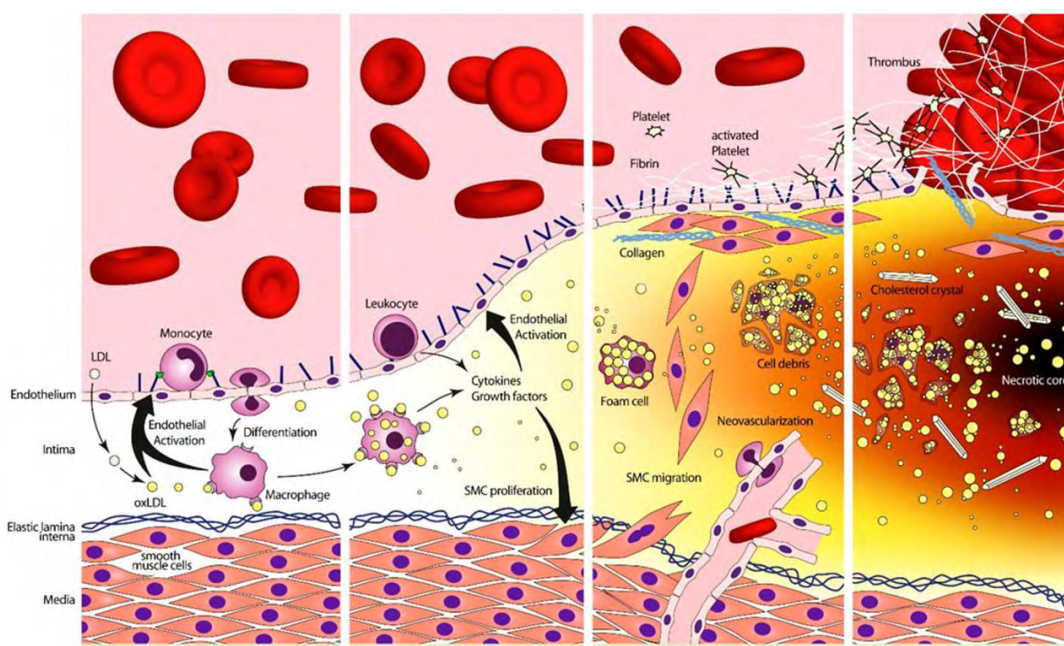
Τα περισσότερα κύτταρα καλύπτουν τις ανάγκες τους σε χοληστερόλη μέσω της ενδογενούς σύνθεσης αυτής [122-123]. Όμως ορισμένοι κυτταρικοί τύποι

αποκτούν επίκτητους μηχανισμούς ενδοκυττάρωσης της εξωγενούς χοληστερόλης, η οποία συνήθως προέρχεται από τροποποιημένες λιποπρωτεΐνες του πλάσματος όπως η οξειδωμένη μορφή της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (low-density lipoprotein, LDL) (ox-LDL) [124]. Η πρόσληψη της ox-LDL στο αορτικό τοίχωμα πραγματοποιείται από κύτταρα τα οποία εκφράζουν ειδικούς υποδοχείς, τους εκκαθαριστικούς υποδοχείς (scavenger receptors), που αναγνωρίζουν την οξειδωμένη LDL, γεγονός που αρχικά αποσκοπεί στην προστασία του ενδοθηλίου από επιβλαβείς τροποποιημένες λιποπρωτεΐνες [119]. Είναι όμως γενικά αποδεκτό ότι τα υψηλά επίπεδα της ελεύθερης χοληστερόλης στο εσωτερικό των κυττάρων είναι τοξικά για αυτά, ενώ η παρουσία της στο αορτικό τοίχωμα αποτελεί κύριο παθολογικό χαρακτηριστικό της αθηρωμάτωσης.

Συγκεκριμένα στα αρχικά στάδια της αθηρογένεσης, η LDL που βρίσκεται σε περίσσεια στην κυκλοφορία, διεισδύει διαμέσου του ενδοθηλίου στον υποενδοθηλιακό χώρο του αορτικού τοιχώματος όπου και προσδένεται σε συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Η εγκλωβισμένη στο τοίχωμα της αορτής LDL υφίστανται χημικές τροποποιήσεις, τόσο στο λιπιδικό όσο και στο πρωτεϊνικό της τμήμα, από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που παράγονται τοπικά, οδηγώντας στη σταδιακή οξείδωση της LDL μέχρι να αποκτήσει την πλήρως οξειδωμένη της μορφή (ox-LDL) [119,125]. Η τροποποίηση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την προσκόλληση μορίων στα ενδοθηλιακά κύτταρα που μειώνουν την ικανότητά τους να παράγουν μονοξειδίο του αζώτου, το οποίο είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της αγγειοδιαστολής. Συνέπεια των παραπάνω είναι η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου καθώς η οξειδωμένη LDL διεγείρει τα ενδοθηλιακά κύτταρα να παράγουν μόρια προσκόλλησης όπως VCAM-1 και σελεκτίνες, τα οποία προσελκύουν κυκλοφορούντα μονοκύτταρα να εισέλθουν στον αορτικό τοίχωμα υποενδοθηλιακά όπου και διαφοροποιούνται σε μακροφάγα [126-128].

Τα μακροφάγα εκφράζουν στην επιφάνεια τους ειδικούς εκκαθαριστικούς υποδοχείς όπως ο CD36 και ο LOX-1 (lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1) μέσω των οποίων αναγνωρίζουν και προσλαμβάνουν με φαγοκυττάρωση την ox-LDL. Η πρόσληψη της οδηγεί σε ενεργοποίηση της φλεγμονώδους διεργασίας και ενδοκυττάρια συσσώρευση λίπους με επακόλουθο τη μετατροπή των μακροφάγων του υποενδοθηλιακού χώρου της αορτής σε αφρώδη κύτταρα (foam cells) [129-131]. Επίσης πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι παραπάνω διεργασίες αποτελούν ερέθισμα και για τη μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων (ΛΜΚ) από το μεσαίο χιτώνα στην περιοχή της βλάβης (υποενδοθηλιακά). Τα ΛΜΚ που

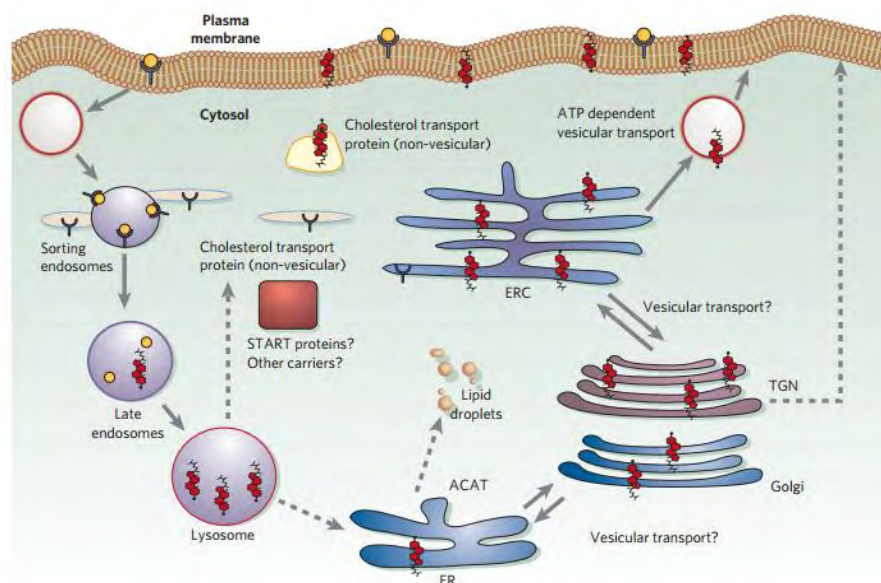
έχουν μεταναστεύσει εκφράζουν, ομοίως με τα μακροφάγα, εκκαθαριστικούς υποδοχείς με συνέπεια να προσλαμβάνουν οξειδωμένη LDL και να μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα [132]. Η εναπόθεση αφρωδών κυττάρων στον έσω χιτώνα συνιστούν τις λιπώδεις γραμμώσεις που αποτελούν το πρώτο βήμα για την ανάπτυξη της αθηρωματικής νόσου [122,133-134]. Καθώς όμως η δράση της ox-LDL θεωρείται κυτταροτοξική, σημαντικός αριθμός αφρωδών κυττάρων νεκρώνονται απελευθερώνοντας στο μικροπεριβάλλον της υποενδοθηλιακής στοιβάδας σταγονίδια λίπους που επιταχύνουν την αθηρωματική διαδικασία (Εικόνα 17) [135].



Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση της αθηρογένεσης από τις πρώιμες αθηρωματικές αλλοιώσεις (αριστερά) μέχρι την προχωρημένη αθηρωματική βλάβη του αορτικού τοιχώματος (δεξιά) [Steinl. et al., Mol. Sci. 2015].

Η κυτταροτοξική δράση της ox-LDL έγκειται στη διαταραχή της ενδοκυττάριας συσσώρευσης λιπιδίων. Αναλυτικότερα, με την ενδοκυττάρωση της οξειδωμένης LDL διαταράσσεται ο λόγος ελεύθερης χοληστερόλης/φωσφολιπιδίων με αποτέλεσμα να παρατηρούνται διαταραχές στη λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης καθώς και στη λειτουργία σημαντικών πρωτεϊνών όπως η Na-K-ATPάση, η αλκαλική φωσφατάση καθώς και μεταφορείς γλυκόζης και θυμιδίνης [136]. Επιπλέον στους μηχανισμούς που έχουν συσχετιστεί με την κυτταροτοξική δράση της συσσωρευμένης ελεύθερης χοληστερόλης συγκαταλέγονται η κρυσταλλοποίηση της ενδοκυττάριας χοληστερόλης, ο σχηματισμός οξυστερολών [137] καθώς και η πυροδότηση αποπτωτικών σηματοδοτικών μονοπατιών (Εικόνα 18) [133,138]. Όλα τα παραπάνω

καθιστούν επιτακτική την ανάγκη διατήρησης της ισορροπίας στους μηχανισμούς που διέπουν την είσοδο και την έξοδο των λιπιδίων από τα κύτταρα.



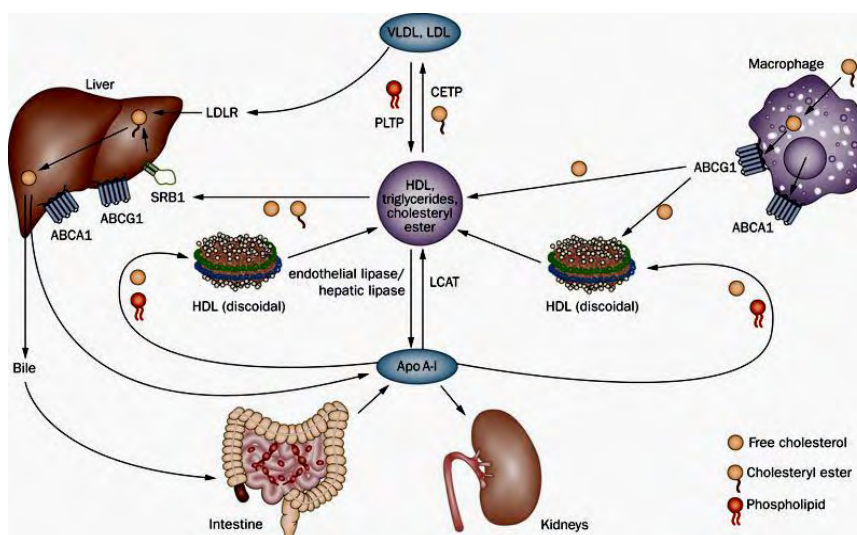
Εικόνα 18: Η LDL χοληστερόλη (κίτρινοι κύκλοι) μεταφέρεται ενδοκυττάρια μέσω ειδικών υποδοχέων (σχήμα Y) οι οποίοι στη συνέχεια επιστρέφουν στην κυτταρική μεμβράνη μέσω του ενδοκυττάριου διαμερίσματος ανακύκλωσης (ERC). Η χοληστερόλη που συντίθεται από το ίδιο το κύτταρα στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) μεταφέρεται εκτός κυττάρου διαμέσου του συστήματος Golgi. Η πλεονάζουσα χοληστερόλη εστεροποιείται (lipid droplets) [Maxfield. et al., Nature. 2005].

A.6.2 Ανάστροφη μεταφορά της χοληστερόλης

Η διατήρηση του ενδοκυττάριου λιπιδικού φορτίου σε φυσιολογικά επίπεδα, όπως έχει προαναφερθεί, διέπεται από αυστηρή ρύθμιση των μηχανισμών που ενέχονται στην είσοδο και έξοδο των λιπιδίων από τα κύτταρα. Συγκεκριμένα η είσοδος και η ενδογενής σύνθεση της χοληστερόλης στα κύτταρα εξισορροπείται από μία ανάστροφη πορεία η οποία συνιστά το μηχανισμό της «ανάστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης» (reverse cholesterol transport, RCT). Πρόκειται για μία διαδικασία που πρώτη φορά περιγράφηκε το 1968 από τον Glomset, κατά την οποία η πλεονάζουσα χοληστερόλη απομακρύνεται από τους περιφερικούς ιστούς προς το ήπαρ ώστε να απεκκριθεί [139]. Η ανάγκη για τη σωστή λειτουργία του μηχανισμού ανάστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης διατυπώνεται από μελέτες που δείχνουν ότι διαταραχές του έχουν συσχετιστεί με την παθολογία καρδιαγγειακών νοσημάτων και κυρίως της αθηρωματικής νόσου. Η σχέση μεταξύ RCT και αθηρωμάτωσης διατυπώθηκε πρώτη φορά από τους Ross και Glomset οι οποίοι υπέθεσαν ότι η αθηρωματική πλάκα αναπτύσσεται λόγω διαταραχών στην εναπόθεση και

απομάκρυνση των λιπιδίων από το αορτικό τοίχωμα μετά τον τραυματισμό του ενδοθηλίου [140]. Συνέπεια των παραπάνω είναι η συνεχής εναπόθεση λιπιδίων ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια, η οποία επιφέρει αποσταθεροποίηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, λέπτυνση του μεσαίου χιτώνας της αορτής και ταυτόχρονη πάχυνση της υποενδοθηλιακής στοιβάδας επιβαρύνοντας με αυτόν τον τρόπο την εξέλιξη της πάθησης [132,141-144].

Ο μηχανισμός της RCT περιλαμβάνει τέσσερις διαδοχικές μεταβολικές οδούς, ενώ σημαντικό του βήμα αποτελεί η εκροή της χοληστερόλης κατά την οποία κύτταρα του αορτικού τοιχώματος (μακροφάγα και λεία μυϊκά κύτταρα) εκκρίνουν τη χοληστερόλη στον εξωκυττάριο χώρο [141,145-146]. Η αποτελεσματικότητα της ανάστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης και της εκροής της καθορίζεται από τη λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας (high-density lipoprotein, HDL) και την απολιποπρωτεΐνη A-I (ApoA-I) (Εικόνα 19) [145,147].



Εικόνα 19: Σχηματική απεικόνιση της ανάστροφης μεταφοράς τη χοληστερόλης (reverse cholesterol transport, RCT). Η RCT αποτελείται από τέσσερα στάδια: α)μεταφορά της ελεύθερης χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στις πρόδρομες μορφές της HDL μέσω σύνδεσης της ApoA-I με την πρωτεΐνη ABCA1 β)εστεροποίηση της ελεύθερης χοληστερόλης με τη δράση του ενζύμου LCAT γ)μεταφορά εστέρων χοληστερόλης σε σωματίδια χυλομικρών και λοιπών λιποπρωτεϊνών (VLDL, LDL) και δ)καταβολισμός της HDL όπου πραγματοποιείται και ηπατική πρόσληψή της μέσω LDL υποδοχέων (π.χ. SRB1) [145].

Η ApoA-I είναι μία πρωτεΐνη μεγέθους 28kDa η οποία συντίθεται στο έντερο και στο ήπαρ από όπου απελευθερώνεται στην κυκλοφορία. Διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών δεδομένου ότι συνιστά το βασικό πρωτεϊνικό συστατικό των HDL. Η δράσης της ApoA-I θεωρείται αντι-

αθηρογόνος καθώς κλινικές μελέτες υποδεικνύουν ότι χαμηλές συγκεντρώσεις της στην κυκλοφορία συμβαδίζουν με χαμηλά επίπεδα HDL επιβαρύνοντας τον κίνδυνο ανάπτυξης καρδιαγγειακού νοσήματος [148]. Περαιτέρω συνεισφορά της ApoA-I στην ανάστροφη μεταφορά της χοληστερόλης έγκειται στη σύνδεσή της με την πρωτεΐνη-μεταφορέα ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1). Η ABCA1 είναι μία πρωτεΐνη μεγέθους 250kDa που εδράζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η ABCA1 ενεργεί ως αντλία λιπιδίων επάγοντας την εκροή χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων από το κύτταρο στην ApoA1 συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στο σχηματισμό των δισκοειδών σωματίων HDL [149-151]. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η ABCA1 να απομακρύνει την περίσσεια της χοληστερόλης δρώντας προστατευτικά έναντι της αθηρωμάτωσης. Η σχέση μεταξύ της ABCA1 και της αθηρωματικής νόσου καθώς και με την ομοιοστασία της HDL προήλθε από μελέτες που υποστηρίζουν ότι μεταλλάξεις του γονιδίου της ABCA1 αποτελούν τη γενετική βάση της νόσου Tangier η οποία ακολουθεί αυτοσωμική υπολειπόμενη κληρονομικότητα. Συγκεκριμένα ομοζυγώτες πάσχοντες εκδηλώνουν πρώιμη αθηρομάτωση καθώς επίσης παρουσιάζουν πολύ χαμηλά κυκλοφορούντα επίπεδα της HDL χοληστερόλης λόγω αδυναμίας της ABCA1 να απομακρύνει την συσσωρευμένη χοληστερόλη [151-153]. Η σημασία της ABCA1 στην ανάπτυξη και εξέλιξη της αθηρωματικής νόσου ενισχύεται περαιτέρω από ανοσοϊστοχημικές μελέτες που αναφέρουν δραματικά μειωμένη ανοσοδραστικότητα της ABCA1 κυρίως στον έσω χιτώνα του αορτικού τοιχώματος αθηρωματικής στεφανιαίας αρτηρίας. Σύμφωνα με τα ευρήματα των μελετών αυτών, τα μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα της ABCA1 πιθανώς ευθύνονται για τη δυσλειτουργία του μηχανισμού εκροής της χοληστερόλης με επακόλουθο τη συσσώρευση των λιπιδίων που παρατηρείται στις αθηρωματικές αλλοιώσεις [143,154-155]

Η σημαντική συμβολή των πρωτεϊνών ABCA1 και ApoA1 καθώς και των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων στο μεταβολισμό των λιπιδίων επιβάλλει την αυστηρή ρύθμιση των μεταγραφικών τους επιπέδων ώστε να διατηρηθεί η ομοιοστασία της χοληστερόλης στο αορτικό τοίχωμα. Η ρύθμιση αυτή επιτυγχάνεται από τους ηπατικούς πυρηνικούς υποδοχείς Liver X Receptors (LXRs) οι οποίοι δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες που επάγουν την έκφραση γονιδίων-στόχων [156-157]. Η ενεργοποίηση της μεταγραφικής τους δραστηριότητας πραγματοποιείται από αγωνιστές που στην πλειοψηφία τους είναι οξυστερόλες, οξειδωμένοι δηλαδή μεταβολίτες της χοληστερόλης, όπως η 24(S)-υδροξυχοληστερόλη, η 22(R)-υδροξυχοληστερόλη, η 24(S),25-υδροξυχοληστερόλη και η 27-υδροξυχοληστερόλη

[158]. Αποτέλεσμα είναι οι LXRs να δρουν ως αισθητήρες χοληστερόλης οι οποίοι πυροδοτούν έναν καταρράκτη γονιδίων που ενέχονται στη μεταφορά και τον καταβολισμό της. Οι υποδοχείς LXRs δρουν ως ετεροδιμερή σχηματίζοντας σύμπλοκο με τους υποδοχείς RXR, ενώ επίσης απαντώνται σε δύο ισομορφές, την LXRα και την LXRβ. Οι δύο υπότυποι LXR παρουσιάζουν υψηλή ομολογία μεταξύ τους όσο αφορά στην περιοχή πρόσδεσης αλλά χαρακτηρίζονται από διαφορετικό πρότυπο έκφρασης. Ειδικότερα η ισομορφή LXRβ συναντάται σε όλους τους ιστούς σε χαμηλά επίπεδα, ενώ αντιθέτως η έκφραση του LXRα περιορίζεται σε μεταβολικά ενεργούς ιστούς όπως το ήπαρ, ο λιπώδης ιστός καθώς και τα μακροφάγα κύτταρα του αορτικού τοιχώματος [159-160].

Μελέτες υποστηρίζουν ότι οι LXRs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη παθοφυσιολογία της αθηρωμάτωσης καθώς δεδομένα που προέρχονται από πειραματόζωα δείχνουν ότι θεραπεία με αγωνιστές των υποδοχέων LXR έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση ή και αναστολή της εξέλιξης της αθηρωματικής νόσου. Συγκεκριμένα πειράματα στα οποία πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση καλλιιεργειών μακροφάγων με οξυστερόλες έδειξαν ότι η ενεργοποίηση του LXRα από τους προσδέτες του επάγει την έκφραση της ABCA1, ενώ επίσης αυξάνει την εκροή της χοληστερόλης από την ABCA1 προς την ApoA1 οδηγώντας σε υψηλότερα κυκλοφορούντα επίπεδα της HDL. Επιπροσθέτως η αντι-αθηρογόνο δράση των LXR αγωνιστών ενισχύεται από περαιτέρω μελέτες, όπου η αύξηση των επιπέδων της HDL και η αποκατάσταση της εκροής της χοληστερόλης εμφανίζουν προστατευτική δράση στο τοίχωμα της αορτής και των αγγείων μέσω αναστολής σηματοδοτικών μονοπατιών της φλεγμονής όπως του πυρηνικού υποδοχέα NF-κΒ [161-164].

A.6.3 Σχέση μεταβολισμού των λιπιδίων και λείων μυϊκών κυττάρων

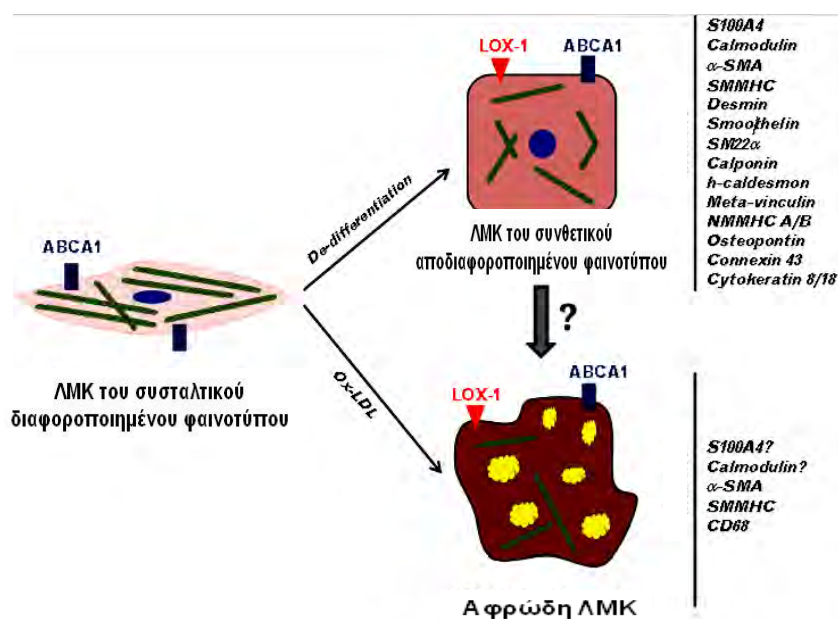
Χαρακτηριστικό γνώρισμα της παθοφυσιολογίας της αθηρωμάτωσης είναι η παρουσία λείων μυϊκών κυττάρων στον υποενδοθηλιακό χώρο του αορτικού τοιχώματος [165]. Είναι καθολικά αποδεκτό ότι κατά τη διάρκεια ανάπτυξης της αθηρωματικής πλάκας, τα ΛΜΚ μεταναστεύουν από το μεσαίο αορτικό χιτώνα στον υποενδοθηλιακό χώρο όπου εμφανίζουν υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού και υφίστανται τροποποιήσεις του φαινοτύπου τους με αποτέλεσμα τη μετατροπή τους από το συστατικό στο συνθετικό φαινότυπο [75-77]. Η επικρατούσα θεωρία υποστηρίζει ότι η μετανάστευση και αποδιαφοροποίηση των ΛΜΚ συμβαίνει μετά από έκθεση σε αυξητικούς παράγοντες και μεσολαβητές της φλεγμονής που

απελευθερώνονται στην περιοχή της βλάβης από μακροφάγα που έχουν προσλάβει την οξειδωμένη μορφή της LDL [166-168]. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι τα ΛΜΚ που απαντώνται στον υποενδοθηλιακό χώρο εκφράζουν όπως τα μακροφάγα εκκαθαριστικούς υποδοχείς με αποτέλεσμα να έχουν τη δυνατότητα πρόσληψης της ox-LDL και κατά συνέπεια να μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα [131,169-170]. Οι παρατηρήσεις αυτές τεκμηριώθηκαν με *in vivo* και *in vitro* πειράματα, όπου η χρήση λιποδιαλυτών χρώσεων με ταυτόχρονη σήμανση πρωτεϊνών χαρακτηριστικών για τα ΛΜΚ υπέδειξε την εναπόθεση λιπιδικών σωματιδίων στο εσωτερικό των λείων μυϊκών κυττάρων του υποενδοθηλιακού χώρου [171-173]. Το φαινόμενο αυτό αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των ΛΜΚ του συνθετικού φαινοτύπου καθώς συσσώρευση λιπιδίων δεν παρατηρείται στα κύτταρα όταν βρίσκονται στο συσταλτικό φαινότυπο. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ενώ αρχικά είχε περιγραφεί ότι η πλειοψηφία των αφρωδών κυττάρων που εντοπίζονται στο λιπιδικό πυρήνα των αθηρωματικών αλλοιώσεων προέρχονταν από μακροφάγα [131], νεότερα δεδομένα επισημαίνουν ότι σημαντικό μέρος αυτών προκύπτει από λεία μυϊκά κύτταρα. Συγκεκριμένα πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ποσοστό της τάξης του 50% των αφρωδών κυττάρων στον έσω χιτώνα στεφανιαίας αρτηρίας προέρχεται από λεία μυϊκά κύτταρα αναδεικνύοντας το σημαντικό τους ρόλο στην παθολογία της αθηρωματικής νόσου [144].

Επιπρόσθετα τα ΛΜΚ του αορτικού τοιχώματος, εκτός από την έκφραση υποδοχέων για την πρόσληψη λιπιδίων, εκφράζουν και γονίδια που ενέχονται στο μηχανισμό της ανάστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης όπως την πρωτεΐνη-μεταφορέα ABCA1 [174]. Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα παρέχουν μια πιθανή εξήγηση του σχηματισμού αφρωδών κυττάρων από ΛΜΚ καθώς αναφέρουν δυσλειτουργία του μηχανισμού εκροής της χοληστερόλης με επακόλουθο την αδυναμία των κυττάρων να απομακρύνουν το ενδοκυττάριο λιπιδικό φορτίο [175]. Τα δεδομένα αυτά προέρχονται από *in vitro* πειράματα όπου έγινε χρήση δύο κλώνων κυτταρικών σειρών ΛΜΚ αρουραίου κάθε μία από τις οποίες προσομοίαζε τη μορφολογία των ΛΜΚ συσταλτικού και συνθετικού φαινοτύπου. Τα αποτελέσματα υπέδειξαν ότι τα συνθετικά ΛΜΚ παρουσιάζουν μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της ABCA1 καθώς και ασθενή σύνδεση αυτής με την ApoA1 έχοντας ως αποτέλεσμα τη μειωμένη εκροή της χοληστερόλης από τα κύτταρα. Τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαιώθηκαν και σε ιστό ανθρώπινης αθηρωματικής στεφανιαίας αρτηρίας όπου λεία μυϊκά κύτταρα που εντοπίζονται στον υποενδοθηλιακό χώρο

κατέχουν τον συνθετικό φαινότυπο και παρουσιάζουν δραματικά μειωμένα πρωτεϊνικά και μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης της ABCA1 [175].

Συνολικά όλα τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων σχετίζονται με τη μετάβαση των λείων μυϊκών κυττάρων προς έναν συνθετικό φαινότυπο επηρεάζοντας πιθανώς με αυτόν τον τρόπο τις εναποθέσεις των λιπιδίων εντός του αορτικού τοιχώματος (Εικόνα 20) [176-177].



Εικόνα 20: Προτεινόμενο μοντέλο μετατροπής των λείων μυϊκών κυττάρων σε αφρώδη κύτταρα (SMC-derived foam cells). Λεία μυϊκά κύτταρα του συσταλτικού φαινοτύπου (contractile) παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης-μεταφορέα ABCA1 στην κυτταρική τους μεμβράνη, ενώ δεν εκφράζουν υποδοχείς πρόσληψης λιπιδίων. Η έκθεση σε λιπίδια (ox-LDL) και η έκφραση εκκαθαριστικών υποδοχέων (LOX-1) συμβάλλει στη φαινοτυπική τους τροποποίηση προς το συνθετικό φαινότυπο (synthetic) όπου μειώνεται η έκφραση της ABCA1 και το κύτταρο μετατρέπεται σε αφρώδες λόγω διαταραχών στην ισορροπία εισόδου-εξόδου των λιπιδίων.

A.6.4 Σχέση του μεταβολισμού των λιπιδίων με το ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής

Ο παραλληλισμός του ΑΚΑ με την αθηρωματική νόσο αποτέλεσε το έναυσμα για στροφή του επιστημονικού ενδιαφέροντος στην εμπλοκή μορίων του μεταβολισμού των λιπιδίων στην παθογένεια του ανευρύσματος. Παρόλο που σημαντικός αριθμός μελετών παρέχει ενδείξεις ότι τα λιπίδια συσχετίζονται με την παρουσία του ΑΚΑ, τα αποτελέσματά τους είναι αντικρουόμενα. Η πλειοψηφία των δεδομένων προέρχεται από πληθυσμιακές μελέτες οι οποίες πρωτίστως διερεύνησαν τα επίπεδα των λιπιδίων στον ορό αίματος ασθενών με ανεύρυσμα. Σύμφωνα με τη

μέχρι σήμερα βιβλιογραφία αποδεικνύεται σημαντική συσχέτιση μεταξύ των κυκλοφορούντων επιπέδων λιποπρωτεϊνών με την ανευρυσματική νόσο, ενώ δεν έχουν διαπιστωθεί ιδιαίτερα σημαντικές διαφορές όσο αφορά στα επίπεδα των τριγλυκεριδίων και της ολικής χοληστερόλης μεταξύ πασχόντων και υγιών ατόμων.

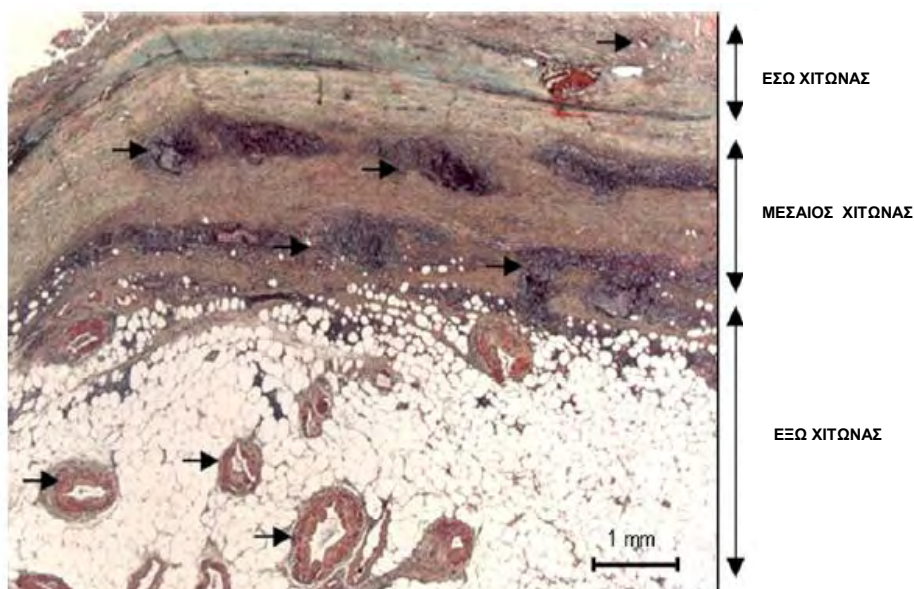
Προς σε αυτήν την κατεύθυνση τα χαμηλά επίπεδα της HDL χοληστερόλης στον ορό του αίματος έχουν συσχετιστεί με την παρουσία του ανευρύσματος αναδεικνύοντας την HDL ως σημαντικό προγνωστικό δείκτη του κινδύνου ανάπτυξης της νόσου καθώς και ως πιθανό μελλοντικό θεραπευτικό στόχο [23,178-179]. Αντιθέτως, αντικρουόμενα είναι τα συμπεράσματα όσο αφορά στα επίπεδα της LDL χοληστερόλης στην κυκλοφορία. Μελέτες υποστηρίζουν ότι υψηλά επίπεδα αυτής συσχετίζονται με την παρουσία και εξέλιξη της ανευρυσματικής νόσου, ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η παραπάνω σύνδεση εμφανίζεται ισχυρότερη σε μικρότερης διαμέτρου ανευρύσματα. Βάση των παραπάνω αποτελεσμάτων, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η LDL χοληστερόλη πιθανώς διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του ΑΚΑ μέσω επιβάρυνσης των φλεγμονωδών διεργασιών στο τοίχωμα ανευρυσματικής αορτής [180-181]. Παρ' όλα αυτά, μεταγενέστερη μελέτη που διεξήχθη σε 3327 άρρενες άνω των 65 ετών απέτυχε να επιβεβαιώσει τα ανωτέρω ευρήματα και να συσχετίσει τα αυξημένα κυκλοφορούντα επίπεδα της LDL χοληστερόλης με την παρουσία ανευρύσματος [179].

Η συμβολή των λιπιδικών παραμέτρων στο ΑΚΑ ενισχύεται από βιβλιογραφικά δεδομένα που υποδεικνύουν διαφοροποιημένα κυκλοφορούντα επίπεδα των απολιποπρωτεϊνών ApoA1, ApoB και ApoM στον ορό ασθενών με ανεύρυσμα συγκριτικά με τα υγιή άτομα. Ειδικότερα πληθυσμιακές μελέτες αναφέρουν μειωμένα κυκλοφορούντα επίπεδα της ApoA1, βασικής απολιποπρωτεΐνης της HDL, σε ασθενείς με ΑΚΑ γεγονός που συνηγορεί υπέρ της υπόθεσης ότι η HDL θα μπορούσε ίσως να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για την πρόγνωση και διάγνωση του ανευρύσματος [178,183]. Όλα τα παραπάνω ευρήματα καθιστούν απαραίτητη τη ρύθμιση των επιπέδων χοληστερόλης στον ορό ασθενών με ΑΚΑ. Για το σκοπό αυτό η χρήση υπολιπιδαιμικών φαρμάκων (στατίνες) έχει προταθεί ως φαρμακευτική αγωγή για την αντιμετώπιση του ανευρύσματος [184-185].

Η λιπιδική συνιστώσα της ανευρυσματικής νόσου αναδεικνύεται περαιτέρω από πρόσφατες μεταβολομικές μελέτες, οι οποίες συνιστούν σημαντικό εργαλείο για την ανεύρεση βιοδεικτών με σκοπό την έγκαιρη διάγνωση και πρόγνωση του

ανευρύσματος μέσω διερεύνησης του μεταβολικού του αποτυπώματος αυτού. Η πλειοψηφία των μεταβολικών αλλαγών σε ασθενείς με ΑΚΑ αφορά κυρίως στο μεταβολισμό των λιπιδίων δεδομένου ότι σημαντικές αλλαγές έχουν βρεθεί στα επίπεδα των σφιγγολιπιδίων, λυσοφωσfolιπιδίων και μεταβολιτών της χοληστερόλης στο πλάσμα πασχόντων, αναδεικνύοντας τη συμβολή του μεταβολισμού της χοληστερόλης και των λιπαρών οξέων στην ανάπτυξη και εξέλιξη της νόσου. Επιπλέον η ταυτοποίηση των ανωτέρω μεταβολιτών παρουσιάζει ιδιαίτερο κλινικό ενδιαφέρον καθώς τα μόρια αυτά έχουν συσχετιστεί με μεγαλύτερης βαθμίδας αλλαγές αναλογικά με την αύξηση της διαμέτρου του ανευρύσματος, προτείνοντας τη χρήση τους ως δείκτες για την ταξινόμηση του σταδίου της νόσου [186-187].

Επιπροσθέτως ιστολογικές αναλύσεις σε ιστοτεμάχια ανευρυσματικών σάκων ανθρώπου ισχυροποιούν την υπόθεση ότι μεταβολισμός των λιπιδίων εμπλέκεται στην παθογένεια του ΑΚΑ, καθώς πρόσφατη μελέτη υπέδειξε την παρουσία φωσφατιδυλοχολίνης (PC) και λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (LPC), μορίων που συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια του μεταβολισμού των λιπιδίων, στο τοίχωμα ανευρυσματικής αορτής [188]. Επιπλέον προγενέστερες αναφορές υποστηρίζουν ότι παρατηρείται πάχυνση του αορτικού τοιχώματος στο ανεύρυσμα, η οποία επιβαρύνεται από τη συσσώρευση κρυστάλλων χοληστερόλης και τη δημιουργία λιπιδικών γραμμώσεων στον έσω χιτώνα ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής, όπως και στην αθηρωμάτωση. (Εικόνα 21) [113,189].



Εικόνα 21: Παρουσία κρυστάλλων χοληστερόλης (μαύρα βέλη) στο τοίχωμα αορτής με ΑΚΑ κυρίως στον έσω (intima) χιτώνα αυτής [Hellenthal. et al., *Cardiovasc Pathol.* 2009].

Η παρουσία της χοληστερόλης που έχει περιγραφεί στο τοίχωμα ανευρυσματικής αορτής παρέχει τις πρώτες ενδείξεις για διαταραχές στη λειτουργία του μηχανισμού εκροής της χοληστερόλης από το τοίχωμα αορτής με ΑΚΑ με αποτέλεσμα η χοληστερόλη να παγιδεύεται σε αυτό. Προς σε αυτήν την κατεύθυνση, μια μοναδική βιβλιογραφική αναφορά περιορίζεται στη διερεύνηση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων LXRα και ABCA1 που συμμετέχουν στο μονοπάτι της ανάστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης, χωρίς όμως να διερευνηθεί ο μοριακός μηχανισμός δράση τους στην παθολογία της νόσου [190]. Συγκεκριμένα οι Soumian και συν. (2005) αναφέρουν αυξημένα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων LXRα και ABCA1 στο τοίχωμα αορτής με ΑΚΑ συγκριτικά με τη φυσιολογική, ενώ μειωμένα είναι τα επίπεδά τους συγκριτικά με ιστό αθηρωματικής πλάκας στεφανιαίας αρτηρίας.

Οι προαναφερθείσες μελέτες υποδεικνύουν ότι ο μεταβολισμός των λιπιδίων σχετίζεται με την παρουσία ανευρύσματος, χωρίς όμως μέχρι στιγμής να έχουν διαλευκανθεί οι μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων συμβάλλει στην παθογένεση ή και εξέλιξη της ανευρυσματικής νόσου κοιλιακής αορτής.

A.7 Επιγενετικές τροποποιήσεις στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής

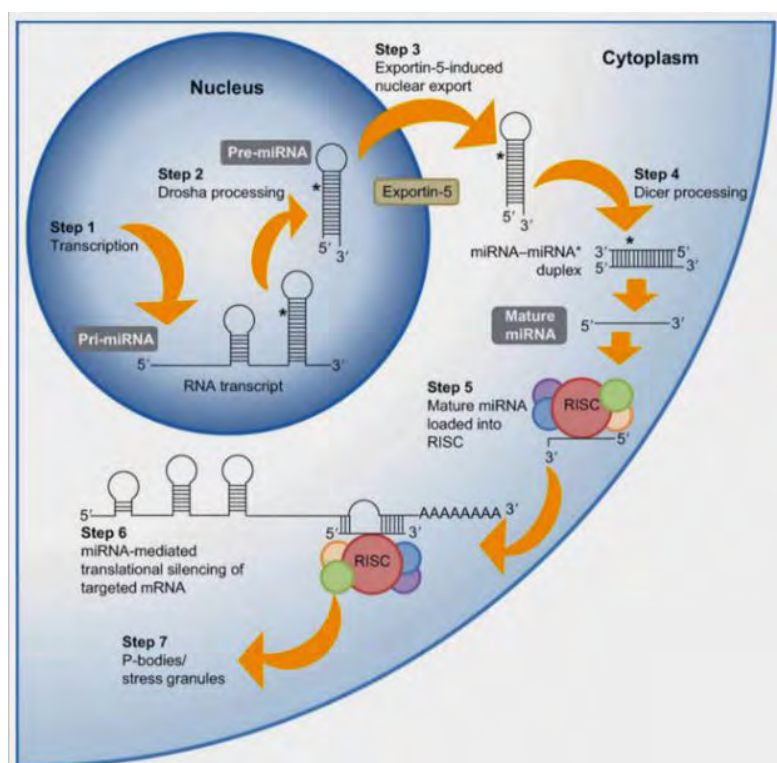
A.7.1 microRNAs: Λειτουργία και Βιογένεση

Τα τελευταία χρόνια η ραγδαία πρόοδος στον τομέα των Βιοεπιστημών, οδήγησε στην ανακάλυψη γονιδίων τα οποία δεν παράγουν πρωτεΐνες αλλά είναι μικρά μόρια RNAs, γνωστά ως microRNAs (miRNAs ή miRs). Τα miRNAs είναι μικρά μη κωδικά μόρια RNA μήκους 18-25 νουκλεοτιδίων τα οποία αποτελούν σημαντικούς ενδογενείς ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης. Τα microRNAs έχει δειχθεί ότι εμπλέκονται στη ρύθμιση ενός ευρέος φάσματος βιολογικών διαδικασιών όπως η διαφοροποίηση, ο πολλαπλασιασμός και απόπτωση των κυττάρων, ενώ η δράση τους έχει συσχετιστεί με την παθογένεια πολλών νοσημάτων [191]. Πρόκειται για μόρια τα οποία συναντώνται σε όλους τους πολυκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, ενώ στον άνθρωπο συντελούν στη ρύθμιση >50% των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες παρόλο που μόλις το 3% των γονιδίων του ανθρώπου κωδικοποιεί miRNAs [192-193].

Λειτουργικός τους ρόλος είναι η αποσιώπηση της γονιδιακής έκφρασης των mRNA-στόχων με ένα μοτίβο πλήρους ή μερικής συμπληρωματικότητας. Τα miRs προσδένονται στην 3-αμετάφραστη περιοχή (3' UTR) και σπανιότερα στην 5'-αμετάφραστη περιοχή του mRNA του εκάστοτε γονιδίου και ρυθμίζουν τη γονιδιακή

έκφραση ανάλογα με το βαθμό συμπληρωματικότητας. Συγκεκριμένα σε περιπτώσεις πλήρους συμπληρωματικότητας οδηγούν σε αποδόμηση του mRNA και καταστολή της μεταγραφής, ενώ η μερική συμπληρωματικότητα με το mRNA του γονιδίου-στόχου οδηγεί σε αναστολή της μετάφρασης [191,194]. Στον άνθρωπο τα γονίδια που κωδικοποιούν microRNAs βρίσκονται διασκορπισμένα στα χρωμοσώματα, με εξαίρεση το Υ χρωμόσωμα, και εντοπίζονται σε εσώνια γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ή σε μη κωδικές μεταγραφικές μονάδες μεταξύ των γονιδίων, ενώ σε σπάνιες περιπτώσεις απαντώνται και σε περιοχές εξωνίων [195].

Τα γονίδια των miRNA κωδικοποιούν ένα πρόδρομο μετάγραφο miRNA το οποίο τροποποιείται για να παραχθεί το τελικό μόριο microRNA. Η παραπάνω διαδικασία αποτελεί τη βιογένεση των microRNAs και συνιστά μια πολύπλοκη και εξειδικευμένη διεργασία (Εικόνα 22).



Εικόνα 22: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού βιογένεσης των microRNAs [Biggar. et al., *J Exp Biol.* 2015].

Η βιογένεση ξεκινάει με τη μεταγραφή του microRNA του γονιδίου από την RNA πολυμεράση II. Το πρώιμο pri-miRNA που παράγεται έχει μέγεθος άνω των 100 νουκλεοτιδίων, φέρει 5' καλύπτρα και πολυαδενυλιώνεται. Έπειτα το μόριο pri-miRNA αναδιπλώνεται λαμβάνοντας τη δομή φουρκέτας ή βρόγχου με μονόκλινα 5' και 3' άκρα, ενώ πολλές φορές φέρει ιντρόνια όπως τα κανονικά μετάγραφα mRNA

[197-199]. Στη συνέχεια το pri-miRNA υφίστανται τη διαδικασία της ωρίμανσης. Κατά την ωρίμανση υπόκεινται σε ενδονουκλεοτιδική πέψη από το ένζυμο Drosha η οποία ανήκει στην κατηγορία των ριβονουκλεασών τύπου III (RNάση III) και η δράση της απαιτεί την παρουσία του παράγοντα DGCR8 [200-201]. Αποτέλεσμα του παραπάνω σταδίου είναι η παραγωγή του πρόδρομου μορίου pre-miRNA. Το pre-miRNA είναι ένα μόριο μήκους 60-100 νουκλεοτιδίων με δομή φουρκέτας το οποίο συνήθως απαντάται σε ένα μόνο αντίγραφο στο γονιδίωμα. Το pre-miRNA εξάγεται εν συνεχεία στο κυτταρόπλασμα από την πρωτεΐνη της πυρηνικής μεμβράνης εξπορτίνη-5 μέσω υδρόλυσης GTP [202]. Μετά την εξαγωγή του πρόδρομου μορίου pre-miRNA από τον πυρήνα, υποβάλλεται σε περαιτέρω επεξεργασία από την RNάση Dicer με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ενός δίκλωνου μορίου 22 νουκλεοτιδίων το οποίο συνιστά το ώριμο microRNA. Τα ώριμα microRNAs προσδένονται στο σύμπλοκο πρωτεϊνών RISC προωθώντας είτε την αποδόμηση των mRNA-στόχων είτε την παρεμπόδιση της μετάφρασης [203-204].

A.7.2 Τα microRNAs στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής

Τα τελευταία χρόνια τα microRNAs συγκεντρώνουν το ερευνητικό ενδιαφέρον στη διερεύνηση του παθοφυσιολογικού μηχανισμού παθήσεων της αορτής δεδομένου ότι συμμετέχουν σε πληθώρα κυτταρικών και μεταβολικών διαδικασιών όπως η διαφοροποίηση, η απόπτωση, και ο μεταβολισμός των λιπιδίων [205]. Μελέτες υποδεικνύουν ότι τα microRNAs πιθανώς διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο και στην παθογένεια του ΑΚΑ αναδεικνύοντας τα ως πιθανούς θεραπευτικούς στόχους για την αναστολή της εξέλιξης της νόσου [206-207]. Οι πρώτες ενδείξεις για την εμπλοκή των miRNAs στην παθολογία του ανευρύσματος προέρχονται από μοντέλα ζώων. Σύμφωνα με ευρήματα μελετών φαίνεται ότι καταστολή της έκφρασης των miR-712, miR-205 και miR-29b και υπερέκφραση των miR-21 και miR-24 είχαν ανασταλτικό ρόλο στην πορεία εξέλιξης του ΑΚΑ, καθώς λειτουργούν ως αρνητικοί ρυθμιστές της έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια της απόπτωσης και της φλεγμονής, κύριων παθολογικών χαρακτηριστικών της νόσου [208-211].

Περαιτέρω ενδείξεις για την εμπλοκή των miRNAs στο ΑΚΑ προέρχονται από μελέτες με χρήση μικροσυστοιχιών που ανέδειξαν ένα σημαντικό αριθμό υπερεκφραζόμενων και υποεκφραζόμενων microRNAs στο ανεύρυσμα χωρίς όμως να αποσαφηνιστεί ο ακριβής βιολογικός τους ρόλος στη νόσο. Έρευνες που διεξήχθησαν στο σύνολο του αορτικού τοιχώματος με ΑΚΑ αναφέρουν ότι η

πλειοψηφία των microRNAs που έχουν περιγραφεί στην ανευρυσματική αορτή εμφανίζουν ισχυρή συσχέτιση με διαδικασίες της φλεγμονής και αναδιαμόρφωσης της εξωκυττάριας ουσίας. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν τα miR-155, miR-146a, miR-223 και miR-124a τα οποία υπερεκφράζονται στο ΑΚΑ, ενώ τα επίπεδα των miR-362, miR-19b-1, miR-194, miR-769, miR-21 και miR-550 εμφανίζονται μειωμένα στο ανεύρυσμα και η έκφρασή τους καθορίζεται από το βαθμό της φλεγμονής που παρατηρείται στο τοίχωμα αορτής με ΑΚΑ [212-214].

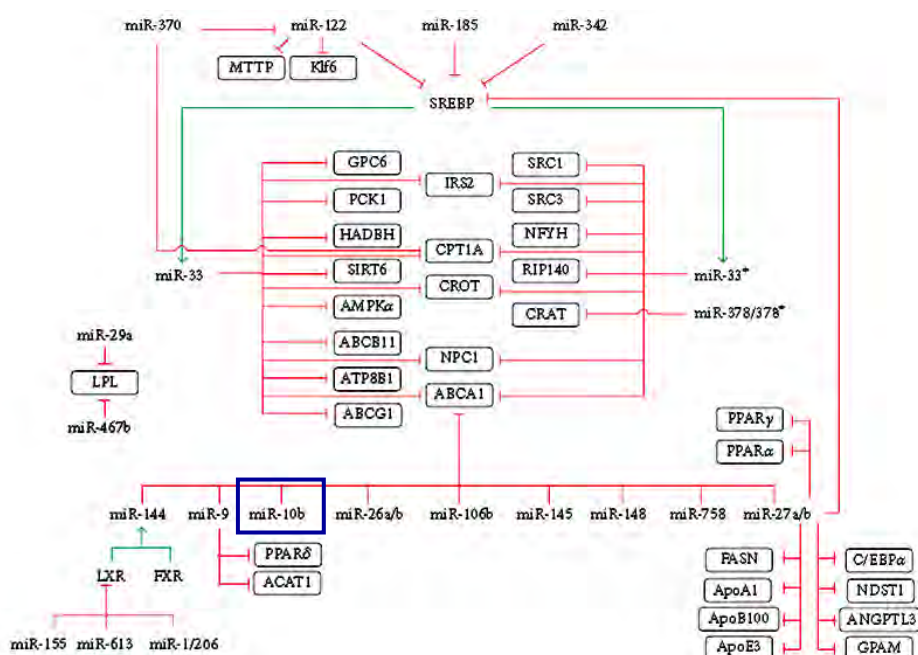
Επιπροσθέτως μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο ορό περιφερικού αίματος ασθενών με ΑΚΑ ενισχύουν την υπόθεση του ενεργού ρόλου των microRNAs στην ανευρυσματική νόσο κοιλιακής αορτής καθώς τα κυκλοφορούντα επίπεδα αυτών συνιστούν βιοδείκτες για την έγκαιρη πρόγνωση και διάγνωση της νόσου. Συγκεκριμένα πρόσφατη μελέτη ανέδειξε 29 miRNAs τα οποία παρουσιάζουν διαφοροποιημένη έκφραση στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΑΚΑ συγκριτικά με υγιή άτομα, ενώ 4 από τα αυτά εμφάνιζαν και διαφοροποιημένα επίπεδα στον ορό των ασθενών. Ειδικότερα αυξημένα βρέθηκαν τα κυκλοφορούντα επίπεδα των let-7e, miR-15a και miR-196b, ενώ αντιθέτως μειωμένα βρέθηκαν τα επίπεδα του miR-411 [215]. Παρόλο που δεν έχει περιγραφεί απορύθμιση των παραπάνω microRNAs σε ιστό αορτής με ΑΚΑ, φαίνεται ότι αυτά συσχετίζονται με προγενέστερα χαρακτηρισμένους βιοδείκτες του ανευρύσματος, ενώ επίσης παρουσιάζουν και ασθενή συσχέτιση με τη διάμετρο αυτού [215-217]. Μία επιπλέον μελέτη που διεξήχθη στο πλάσμα ασθενών με ανεύρυσμα ανέδειξε 151 miRNAs με διαφορετικό πρότυπο έκφρασης μεταξύ πασχόντων και υγιών ατόμων, ενώ προτείνει ότι τα miR-1281, miR-191-3p και miR-455-3p, τα οποία έδειξαν την μεγαλύτερη αύξηση στο ΑΚΑ, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί βιοδείκτες της νόσου [218].

Όλα τα παραπάνω συνηγορούν στην εμπλοκή των microRNAs στην παθογένεια του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής καθιστώντας σημαντική την αναγνώριση νέων μορίων miRNAs, καθώς και των μηχανισμών που ελέγχουν τη ρύθμισή τους, ως νέους μοριακούς στόχους για την πρόληψη ή και αναστολή της εξέλιξης του ανευρύσματος.

A.7.3 Τα microRNAs στο μεταβολισμό των λιπιδίων: ο ρόλος του microRNA-10b

Δεδομένου του σημαντικού ρόλου του μεταβολισμού των λιπιδίων και των διαταραχών του στην παθογένεια καρδιαγγειακών νοσημάτων, όπως της αθηρωμάτωσης, το επιστημονικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στη διερεύνηση του ρόλου

των miRNAs σε παθήσεις της αορτής μέσω της ρύθμισης γονιδίων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπιδίων. Στη μέχρι σήμερα βιβλιογραφία αναφέρονται αρκετά microRNAs τα οποία δρουν ως ρυθμιστές της έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπιδίων και κυρίως στο μηχανισμό της ανάστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης [219-223]. Η πλειοψηφία των ερευνητικών ομάδων εστίασε το ενδιαφέρον της στη ρύθμιση της έκφρασης του πυρηνικού υποδοχέα LXRA και της πρωτεΐνης-στόχου του ABCA1 και ανέδειξε έναν αριθμό microRNAs όπως τα miR-144, miR-33a/b, miR-145, miR-26a/b, miR-27, miR-758, miR-206, miR-148, miR-1 miR-106b και miR-10b τα οποία είτε ρυθμίζουν την έκφραση των ανωτέρω γονιδίων είτε ρυθμίζονται από τα ίδια τα γονίδια, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στη ρύθμιση της ομοιόστασης της χοληστερόλης (Εικόνα 23) [222,224-231].



Εικόνα 23: Αντιπροσωπευτική εικόνα της ρύθμισης γονιδίων του μεταβολισμού των λιπιδίων από τα microRNAs [Novák. et al., *Mediators Inflamm.* 2014].

Ένα προσφάτως μελετημένο microRNA σχετικά με τη συμμετοχή του στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων του μεταβολισμού των λιπιδίων είναι το miR-10b [232]. Πρόκειται για ένα μόριο microRNA το οποίο έχει λάβει γενικώς σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον κυρίως στον καρκίνο. Απαντάται σε περιοχές μεταξύ των συμπλεγμάτων των γονιδίων *Hox*, που κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες, ενώ επίσης εμφανίζει πρότυπο έκφρασης παρόμοιο με αυτό των γονιδίων *Hox* υποδηλώνοντας κοινό τρόπο ρύθμισής τους [233-234]. Αρκετές μελέτες έχουν αναδείξει την εμπλοκή του miR-10b σε διάφορες μορφές καρκίνου και κυρίως στον

καρκίνο του μαστού δεδομένου ότι αυξημένα επίπεδα έκφρασης του miR-10b σχετίζονται με υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης καθώς και με αυξημένη πρωτεϊνική έκφραση δεικτών των καρκινικών κυττάρων όπως της βιμεντίνης [233,253].

Πρόσφατες όμως μελέτες αναδεικνύουν τη πιθανή συμβολή του miR-10b στην παθοφυσιολογία της αθηρωματικής νόσου. Το ερέθισμα για τη διερεύνηση του ρόλου του στην αθηρωμάτωση έδωσε μελέτη του Bidzhekov και συν. (2012) η οποία αναφέρει για πρώτη φορά την έκφραση του miR-10b σε αθηρωματικές αλλοιώσεις της καρωτίδας [236]. Οι Wang και συν. (2012) έδειξαν ότι το mRNA του γονιδίου της ABCA1 περιέχει στην 3' αμετάφραστη περιοχή του θέσεις πρόσδεσης για το microRNA-10b. Πειράματα που έγιναν σε μακροφάγα κύτταρα ποντικού καθώς και σε κυτταρική σειρά ανθρωπίνων μονοκυττάρων έδειξαν ότι διαμόλυνση των μακροφάγων με το miR-10b είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των μεταγραφικών και πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης της ABCA1 και τη μειωμένη έξοδο της χοληστερόλης στις απολιποπρωτεΐνες. Ο ενεργός ρόλος του microRNA-10b στην εκροή της χοληστερόλης επιβεβαιώθηκε περαιτέρω όταν χρήση του αναστολέα του ανέστρεψε τα παραπάνω αποτελέσματα αυξάνοντας σημαντικά τα επίπεδα (anti-miR-10b) έκφρασης της ABCA1 σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο καθώς και την έξοδο της περίσσειας της χοληστερόλης στην ApoA1, η οποία επιβεβαιώθηκε από τα αυξημένα επίπεδα της HDL [232].

Όλα τα παραπάνω αναδεικνύουν τη συμμετοχή του miR-10b στη ρύθμιση της εξόδου της χοληστερόλης και κατ' επέκταση στην παθογένεια καρδιαγγειακών νοσημάτων που έχουν συσχετιστεί με διαταραχές της. Ο ρόλος του βέβαια σε παθήσεις της αορτής ενισχύεται περαιτέρω από πρόσφατη μελέτη που περιγράφει αυξημένη έκφραση του miR-10b και σε αθηρωματικές αλλοιώσεις της στεφανιαίας αρτηρίας, ενώ επίσης τα αυξημένα επίπεδά του συσχετίστηκαν με μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα της α-ακτίνης λείου μυϊκού τύπου των ΛΜΚ συμβάλλοντας πιθανώς στη φαινοτυπική τους διαφοροποίηση [237]. Δεδομένου ότι οι διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων καθώς και του φαινοτύπου των λείων μυϊκών κυττάρων αποτελούν κύρια παθολογικά χαρακτηριστικά της αθηρωματικής νόσου, η περαιτέρω μελέτη του miR-10b αποτελεί υποσχόμενο θεραπευτικό στόχο. Όσο αφορά στο ρόλο του miR-10b στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής, αυξημένη έκφρασή του έχει περιγραφεί στο σύνολο του αορτικού τοιχώματος με ΑΚΑ [213] χωρίς όμως να υπάρχει μέχρι σήμερα αναφορά σε τυχόν λειτουργικό του ρόλο στην παθογένεια της νόσου.

A.8 Σκοπός της διατριβής

Στα πλαίσια της γενετικής διερεύνησης του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής, σκοπός της παρούσας διατριβής αποτελεί η διερεύνηση της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στο μηχανισμό της ανάστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής, η συμβολή τους στην παθογένεια της νόσου καθώς και η επιγενετική ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων που ενέχονται στον παραπάνω μηχανισμό μέσω μικρών μη-κωδικών μορίων RNA, των microRNAs. Συγκεκριμένα διερευνήθηκαν:

- η εναπόθεση λιπιδίων και η παρουσία αφρωδών κυττάρων στο τοίχωμα ανευρυσματικής, φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής.
- η παρουσία ειδικών πρωτεϊνικών δεικτών, όπως α-ακτίνη λείου μυϊκού τύπου και βιμεντίνη, χαρακτηριστικών για το φαινότυπο των λείων μυϊκών κυττάρων (συσταλτικός/συνθετικό) στο τοίχωμα ανευρυσματικής, φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής.
- η μεταγραφική έκφραση των γονιδίων των δύο υποτύπων του πυρηνικού υποδοχέα LXR, LXRα και LXRβ, καθώς και του γονιδίου-στόχου του LXR, της ABCA1, στο σύνολο του αορτικού τοιχώματος ανευρυσματικής, φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής.
- η μεταγραφική και πρωτεϊνική έκφραση των γονιδίων LXRα και LXRβ, καθώς και τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ABCA1 στον υποενδοθηλιακό χώρο (έσω και μεσαίος χιτώνας) του αορτικού τοιχώματος ανευρυσματικής, φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής.
- η ιστολογική κατανομή της έκφρασης των γονιδίων LXRα, ABCA1 και ApoA1 στους επιμέρους χιτώνες του αορτικού τοιχώματος των υπό μελέτη ιστών.
- η έκφραση του miR-10b στον υποενδοθηλιακό χώρο (έσω και μεσαίος χιτώνας) του αορτικού τοιχώματος ανευρυσματικής και φυσιολογικής κοιλιακής αορτής.
- ο ρόλος του miR-10b στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων LXRα και ABCA1 μετά από επίδραση με τον αναστολέα του (anti-miR-10b) σε καλλιέργειες λείων μυϊκών κυττάρων ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής.
- ο ρόλος του miR-10b στο φαινότυπο των λείων μυϊκών κυττάρων ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής μετά από επίδραση με τον αναστολέα του (anti-miR-10b) σε καλλιέργειες αυτών.

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1.1 Συλλογή δειγμάτων

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής τα οποία ελήφθησαν από ασθενείς που υπεβλήθησαν σε ανοιχτή χειρουργική επέμβαση αποκατάστασης του ανευρύσματος της κοιλιακής αορτής (ΑΚΑ) στην Αγγειοχειρουργική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Η χειρουργική επέμβαση για ΑΚΑ έγινε με βάση το μέγεθος του ανευρύσματος (διάμετρος αορτής > 5.0cm) κατόπιν διάγνωσης με υπερηχοτομογραφικό έλεγχο και αξονική αγγειογραφία (Computed Tomography Angiography). Συνολικά στη μελέτη συμπεριλήφθησαν 12 δείγματα ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής από 12 άνδρες, με μέσο όρο ηλικίας 73.7 ± 7.7 έτη.

Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν 5 δείγματα φυσιολογικής κοιλιακής αορτής από 5 άνδρες, με μέσο όρο ηλικίας 62 ± 5.3 έτη, χωρίς ιστορικό ανευρύσματος και αθηρωματικών αλλοιώσεων τα οποία ελήφθησαν από το Εργαστήριο Ιατροδικαστικών Επιστημών του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Επιπροσθέτως χρησιμοποιήθηκαν 5 δείγματα αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής από 5 άνδρες, με μέσο όρο ηλικίας 64 ± 5.3 έτη, ως αθηρωματικό δείγμα ελέγχου, τα οποία ελήφθησαν από το Εργαστήριο Ιατροδικαστικής-Τοξικολογίας του Ανθρώπου και Ασφαλιστικής Ιατρικής του Τμήματος Ιατρικής του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης. Όλα τα δείγματα φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής ελήφθησαν κατά τη διάρκεια νεκροψίας σε χρονικό διάστημα εντός 12 ωρών από την ώρα θανάτου χωρίς χημική επεξεργασία.

B.1.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Όλα τα δείγματα ανευρυσματικής, φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής περιείχαν και τους τρεις χιτώνες, έσω, μεσαίος, έξω, του αορτικού τοιχώματος. Αμέσως μετά την παραλαβή των δειγμάτων έγινε έκπλυση των ιστών με το ρυθμιστικό διάλυμα Phosphate Buffer Saline χωρίς CaCl_2 και MgCl_2 (PBS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} , HyClone) ώστε να διατηρηθεί σταθερό το pH τους.

Κάθε τύπος ιστού διαχωρίστηκε σε τρία επιμέρους τμήματα. Στο πρώτο τμήμα, το **σύνολο του αορτικού τοιχώματος** ομογενοποιήθηκε και χρησιμοποιήθηκε για την διερεύνηση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων. Στο δεύτερο τμήμα των υπό μελέτη ιστών αρχικά απομακρύνθηκε μηχανικά ο έξω χιτώνας. Ο εναπομείναντας ιστός συνιστά τον

υποενδοθηλιακό χώρο που αποτελείται από τον έσω και μεσαίο χιτώνα της αορτής. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι οι παραπάνω χιτώνες στους παθολογικούς ιστούς (ανευρυσματική και αθηρωματική μη ανευρυσματική κοιλιακή αορτή) δεν μπορούν να διαχωριστούν λόγω της ύπαρξης αθηρωματικών αλλοιώσεων, οι χιτώνες αυτοί χρησιμοποιήθηκαν στο σύνολό τους για τη μελέτη των μεταγραφικών και πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων. Το τρίτο τμήμα όλων των δειγμάτων περιελάμβανε και τους τρεις χιτώνες του αορτικού τοιχώματος και χρησιμοποιήθηκε για ανοσοϊστοχημική μελέτη και ιστολογική ανάλυση.

B.1.3 Καλλιέργεια λείων μυϊκών κυττάρων

B.1.3.1 Απομόνωση και καλλιέργεια λείων μυϊκών κυττάρων από ιστό ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής

Συνθήκες καλλιέργειας

Η απομόνωση και καλλιέργεια των λείων μυϊκών κυττάρων (ΛΜΚ) έγινε από τον υποενδοθηλιακό χώρο αορτής με ΑΚΑ που ελήφθη άσηπτα κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης. Όπως προαναφέρθηκε ο υποενδοθηλιακός χώρος της ανευρυσματικής αορτής αποτελείται από τον έσω και μεσαίο χιτώνα, οι οποίοι δεν μπορούν να διαχωριστούν λόγω της ύπαρξης αθηρωματικών αλλοιώσεων. Μετά την παραλαβή του δείγματος από το χειρουργείο πραγματοποιήθηκε έκπλυση του ιστού με το ρυθμιστικό διάλυμα Phosphate Buffer Saline χωρίς CaCl_2 και MgCl_2 (PBS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} , HyClone) ώστε να απαλλαγεί ο ιστός από υπολείμματα του χειρουργείου και παράλληλα να διατηρηθεί σταθερό το pH του.

Για την απομόνωση των ανευρυσματικών ΛΜΚ απομακρύνθηκε μηχανικά με αποστειρωμένο νυστέρι ο εξωτερικός χιτώνας της αορτής. Ο εναπομείναντας ιστός τοποθετήθηκε για καλλιέργεια με το θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified Eagle's medium / Ham's F-12 (DMEM/F-12, GIBCO BRL, UK). Το θρεπτικό υλικό πριν τη χρήση του εμπλουτίζεται με ορό εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS, GIBCO BRL, UK) σε αναλογία 10% του όγκου του θρεπτικού υλικού, ο οποίος παρέχει τους απαραίτητους αυξητικούς παράγοντες για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό καθώς και με αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (penicillin-streptomycin, P/S, Roche) σε αναλογία 0,5% του όγκου του θρεπτικού υλικού. Το πλήρες θρεπτικό υλικό διατηρείται στους 4°C.

Η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε σε επωαστικό κλίβανο (Heraeus Instruments) ο οποίος παρέχει σταθερή θερμοκρασία 37°C, κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και εμπλουτισμένη ατμόσφαιρα με 5% CO_2 . Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε ειδικό

αποστειρωμένο χώρο και όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων έγιναν μέσα σε εστία κάθετης νηματικής ροής προς αποφυγή εξωτερικών μολύνσεων. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Axiovert S100, Zeiss).

Πειραματική Διαδικασία

- Τοποθέτηση του φρέσκου ιστού σε τρυβλίο Petri και προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος PBS χωρίς Ca^{2+} , Mg^{2+} σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ξέπλυμα του ιστού 2-3 φορές για την απομάκρυνση υπολειμμάτων του χειρουργείου και διατήρηση σταθερού pH.
- Αφαίρεση του εξωτερικού χιτώνα της αορτής με αποστειρωμένο νυστέρι και τεμαχισμός του εναπομείναντα ιστού
- Μεταφορά των κομματιών του ιστού σε φλάσκα των 25cm^3 μαζί με 5ml πλήρες θρεπτικό υλικού και επώαση στον κλίβανο (37°C , 5% CO_2)

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γινόταν όταν τα κύτταρα είχαν αυξήσει τον πληθυσμό τους και είχαν καλύψει όλη την επιφάνεια της φλάσκας. Μετά από 1-2 ανακαλλιέργειες τα κύτταρα καταψύχονταν για μελλοντική χρήση.

Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων απαιτούνταν η αποκόλλησή τους. Αρχικά γινόταν αφαίρεση του καλλιεργητικού υλικού από τη φλάσκα, έκπλυση με 5ml PBS χωρίς Ca^{2+} , Mg^{2+} και κατόπιν προσθήκη θρυψίνης (1ml). Η θρυψίνη είναι ένα ένζυμο το οποίο συντελεί στην αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας λύνοντας τους δεσμούς των κυτταρικών μεμβρανών. Οι φλάσκες παρέμεναν στον επωαστικό κλίβανο για 5 λεπτά περίπου μέχρι τα κύτταρα να αποκολληθούν (μέγιστος χρόνος 10 λεπτά). Η αποκόλληση των κυττάρων ελέγχονταν στο μικροσκόπιο και στη συνέχεια για τη διακοπή της δράσης της θρυψίνης προστίθεντο άμεσα πλήρες θρεπτικό υλικό σε δεκαπλάσια ποσότητα από αυτή της θρυψίνης και ακολούθως πραγματοποιούνταν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις και εκπλύσεις προς συλλογή των κυττάρων.

Για την κατάψυξη των κυττάρων τα κύτταρα τοποθετούνταν σε ειδικό κρουοφιαλίδιο σε συγκέντρωση $4-5 \times 10^6/\text{ml}$ θρεπτικού υλικού το οποίο περιέχει 10% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma Aldrich) και 20% FBS χωρίς προσθήκη αντιβιοτικών. Το DMSO συντελεί στην αργή ψύξη των κυττάρων και του θρεπτικού υλικού αποφεύγοντας τη δημιουργία κρυστάλλων που καταστρέφουν την κυτταρική μεμβράνη. Η κατάψυξη των κυττάρων γίνεται σταδιακά. Αρχικά το κρουοφιαλίδιο

τοποθετείται στους -20°C για 4 ώρες, κατόπιν στους -80°C για 24-28 ώρες και τελικά στους -150°C .

Σε αντίθεση με τη σταδιακή κατάψυξη των κυττάρων, η απόψυξή τους γίνεται γρήγορα με την τοποθέτηση του κρυοφιαλιδίου σε υδατόλουτρο με 37°C και άμεση μεταφορά του περιεχομένου σε σωληνάριο των 15ml το οποίο περιέχει 5ml πλήρες θρεπτικό υλικό. Το σωληνάριο φυγοκεντρείται για 5 λεπτά, απομακρύνεται το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 10ml πλήρους θρεπτικού υλικού και τοποθετούνται σε φλάσκα των 25ml και στη συνέχεια στον επωαστικό κλίβανο.

B.1.3.2 Ταυτοποίηση του κυτταρικού τύπου σε καλλιέργειες του υποενδοθηλιακού χώρου της ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής

Στη συνέχεια για το χαρακτηρισμό των κυττάρων της καλλιέργειας και προκειμένου να επιβεβαιώσουμε ότι έγινε απομόνωση λείων μυϊκών κυττάρων (ΛΜΚ) χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του ανοσοφθορισμού. Πρόκειται για μία μέθοδο κατά την οποία χρησιμοποιούνται φθορίζοντα αντισώματα για την ανίχνευση και εντοπισμό ενός αντιγόνου ή αντισώματος σε κυτταρικό επίπεδο. Συγκεκριμένα τα κύτταρα επώαστηκαν με αντισώματα έναντι της α -ακτίνης λείου μυϊκού τύπου (α -smooth muscle actin, α -SM) η οποία αποτελεί χαρακτηριστική πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού των ΛΜΚ και της VE-Cadherin χαρακτηριστικής πρωτεΐνης των ενδοθηλιακών κυττάρων (ECs) για τον έλεγχο πιθανής πρόσμιξης της καλλιέργειας από άλλους κυτταρικούς τύπους της αορτής.

Υλικά

- Θρουψίνη (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK)
- Πλήρες θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified Eagle's medium / Ham's F-12 (DMEM/F-12, GIBCO BRL, UK)
- Ρυθμιστικό διάλυμα Phosphate Buffer Saline χωρίς CaCl_2 και MgCl_2 (PBS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} , HyClone)
- Δις-απεσταγμένο νερό (ddH₂O)
- Διάλυμα 4% παραφορμαλδεΐδης (4% PFA)
- Διάλυμα ξέπλυματος Permabilization buffer (2mg/ml BSA + 0.1% Triton X-100 + PBS)
- Πρωταρχικά αντισώματα
 - anti- α -SM (A5228, Sigma-Aldrich, Munich, Germany) σε αραιώση 1:200
 - anti-VE-Cadherin (sc-52751, Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA) σε αραιώση 1:100
- Δεύτερα αντισώματα

- AlexaFluor® 488-conjugated (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK) σε αραίωση 1:100
- AlexaFluor® 594-conjugated (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK) σε αραίωση 1:100
- Μονιμοποιητικό υλικό DAPI mounting medium (Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA)
- Πλακάκια καλλιέργειας κυττάρων έξι θέσεων (Labtek)

Πειραματική Διαδικασία

- Ξέπλυμα της φλάσκας και προσθήκη 1ml θρυψίνης για την αποκόλληση των κυττάρων
- Μεταφορά της φλάσκας σε επωαστικό κλίβανο (37°C, 5%CO₂) με κλειστό καπάκι για 10 λεπτά
- Προσθήκη 4ml πλήρους θρεπτικού DMEM/F-12 για να σταματήσει η δράση της θρυψίνης
- Μεταφορά των κυττάρων σε σωληνάριο των 15ml και φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές για 5 λεπτά
- Αποχύνεται το υπερκείμενο και ακολουθούν δύο ξεπλύματα με το ρυθμιστικό διάλυμα PBS και επακόλουθη φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές για 5 λεπτά
- Διάλυση του ιζήματος με 1ml πλήρους θρεπτικού DMEM/F-12 και μοίρασμα αυτού σε Labtek
- Επώαση των Labtek ολονυχτίως σε επωαστικό κλίβανο (37°C, 5%CO₂)
- Προσθήκη 300μl διαλύματος 4%PFA με σκοπό τη μονιμοποίηση των κυττάρων
- Επώαση των Labtek σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά
- Ξέπλυμα με διάλυμα Permeabilization buffer τρεις φορές
- Επώαση με το έκαστο πρωταρχικό αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Το έκαστο αντίσωμα προστέθηκε σε τρεις διαφορετικές θέσεις του Labtek
- Αφαίρεση των αντισωμάτων και ξέπλυμα με διάλυμα Permeabilization buffer τρεις φορές
- Επώαση με το έκαστο δεύτερο αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι
- Αφαίρεση των αντισωμάτων και ξέπλυμα με διάλυμα Permeabilization buffer τρεις φορές

- Κάλυψη των Labtek με μονιμοποιητικό υλικό DAPI mounting medium χρησιμοποιώντας καλυπτρίδα
- Παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού και εξαγωγή συμπερασμάτων.

B.1.4 Απομόνωση RNA από φρέσκο αορτικό ιστό και ανευρυσματικά λεία μυϊκά κύτταρα σε καλλιέργεια

Προκειμένου να διερευνηθούν τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων (LXRα, LXRβ, ABCA1) καθώς και του miR-10b, από κάθε τύπο ιστού πραγματοποιήθηκε άμεσα απομόνωση RNA αφενός από ομογενοποίηση του συνόλου του αορτικού τοιχώματος και αφετέρου από ομογενοποίηση των επιμέρους αορτικών χιτώνων που απομονώθηκαν με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Απομόνωση RNA πραγματοποιήθηκε επίσης και από καλλιέργειες ανευρυσματικών λείων μυϊκών κυττάρων (ΛΜΚ).

Υλικά

- Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK)
- Χλωροφόρμιο (Scharlau, Barcelona, Spain)
- Ισοπροπανόλη (Scharlau, Barcelona, Spain)
- Διάλυμα 70% αιθανόλης (Scharlau, Barcelona, Spain)
- Δις-απεσταγμένο νερό (ddH₂O)

Πειραματική Διαδικασία

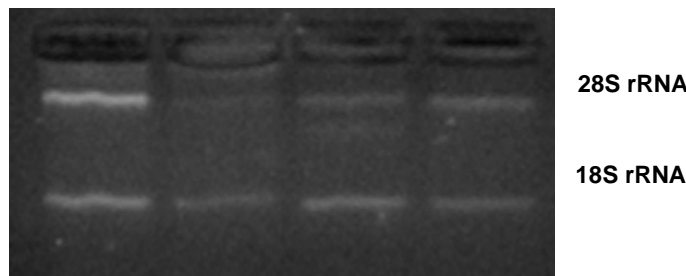
- Τεμαχισμός των ιστών και προσθήκη 1,5-2ml Trizol
- Ομογενοποίηση του ιστού με τη χρήση ομογενοποιητή (IKA-WERKE) και vortex με στόχο τη λύση των κυττάρων
- Σε καλλιεργημένα ΛΜΚ προστέθηκε 1ml Trizol με στόχο τη λύση των κυττάρων
- Προσθήκη 0,2ml χλωροφορμίου για κάθε ml Trizol
- Καλή ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα
- Επώαση για 2-3 λεπτά στους 15-30°C σε υδατόλουτρο
- Φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 15 λεπτά στους 2-8°C
- Μετά τη φυγοκέντρηση σε κάθε σωληνάριο υπήρχαν τρεις φάσεις: η υποκείμενη φάση που περιείχε Trizol / χλωροφόρμιο, η μεσόφαση και η ανώτερη υδατική φάση στην οποία έχει απομονωθεί το RNA
- Μεταφορά της ανώτερης υδατικής φάσης που περιέχει το RNA σε νέο σωληνάριο των 2ml

- Προσθήκη 0,5ml κρύας ισοπροπανόλης για κάθε ml Trizol με στόχο την κατακρήμνιση του RNA
- Επώαση για 10 λεπτά στους 15-30°C σε υδατόλουτρο
- Φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 10 λεπτά στους 2-8°C
- Απομάκρυνση του υπερκλειμένου και ξέπλυμα του RNA με 1ml κρύου διαλύματος 70% αιθανόλη
- Φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές για 10 λεπτά στους 2-8°C
- Απομάκρυνση του υπερκλειμένου και στέγνωμα του RNA σε θερμοκρασία δωματίου σε εστία κάθετης νηματικής ροής για λίγη ώρα
- Διάλυση του RNA σε 30μl ddH₂O
- Επώαση για 10 λεπτά στους 55-60°C σε υδατόλουτρο
- Αποθήκευση του RNA στους -80°C

Για να ελεγχθεί η ποσότητα του RNA πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση σε κάθε δείγμα στα 260 και 280nm, αφού πρώτα κάθε δείγμα είχε αραιωθεί 1:100. Η συγκέντρωση του RNA υπολογίστηκε ως εξής:

$$\text{συγκέντρωση RNA} = \text{αραίωση} \times \text{OD}_{260} \times 40(\text{mgr/ml})$$

Επίσης πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ποιότητας του RNA μετά από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτική αγαρόζη 2% (Εικόνα 24)



Εικόνα 24: Δείγματα RNA μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη 2%

B.1.5 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Τα δείγματα RNA που απομονώθηκαν μετατράπηκαν σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription, RT) *in vitro* χρησιμοποιώντας ως εκκινητές εξανουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας (Random Primers) είτε ολιγονουκλεοτίδια γνωστής αλληλουχίας (stem loop RT primers) ώστε να ενισχυθεί η περιοχή που περιέχει το microRNA που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε (miR-10b stem loop RT primer, U6 stem loop RT primer). Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση είναι η αντίστροφη μεταγραφάση SuperScript III.

Υλικά

- Random Primers (3μg/μl, Invitrogen)
- Stem loop RT primer (5pmol)
- Kit αντίστροφης μεταγραφάσης SuperScript III (200U/μl, Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK)
- Δεσοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs 50mM, Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK)
- Δις-απεσταγμένο νερό (ddH₂O)

Πειραματική Διαδικασία

Η σύνθεση cDNA από 1μg RNA πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια με τελικό όγκο αντίδρασης στα 25μl. Αναλυτικότερα:

1^ο Στάδιο

- Διάλυση του RNA σε ddH₂O και προσθήκη 1μl Random Primers ή Stem loop RT primers ώστε ο τελικός όγκος να είναι 15μl
- Το μείγμα θερμαίνεται στους 70°C για 10 λεπτά ώστε να γίνει αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών του RNA

2^ο Στάδιο

- Προσθήκη των υπόλοιπων αντιδραστηρίων στις εξής ποσότητες:

Ρυθμιστικό διάλυμα 5x	4μl
Δεσοξυριβονουκλεοτίδια	2μl
Χλωριούχο Μαγνήσιο	2μl
DTT	2μl
SuperScript III	0.5μl

- Τοποθέτηση των δειγμάτων σε συσκευή PCR στις ακόλουθες συνθήκες:
 - 20°C, 10 λεπτά
 - 42°C, 45 λεπτά
 - 99°C. 3 λεπτά
 - 18°C, 5 λεπτά
 - τελική θερμοκρασία: 4°C

Για την αποφυγή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων πραγματοποιείται ενίσχυση αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε μετάγραφα γονιδίων τα οποία

εκφράζονται πάντοτε στον υπό ανάλυση ιστό (μετάγραφα “αναφοράς”). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιείται το mRNA του γονιδίου GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) ένα ένζυμο που καταλύει το έκτο στάδιο της γλυκόλυσης. Το cDNA κάθε δείγματος ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές (F: Forward, R: Reverse) για το γονίδιο GAPDH:

GAPDH F: 5' GAGTCAACGGATTTGGTCGT 3'

GAPDH R: 5' GACAAGCTTCCCGTTCTCAG 3'

Το διάλυμα αντίδρασης για την ανίχνευση του γονιδίου GAPDH περιείχε:

cDNA	3μl
Ρυθμιστικό διάλυμα My Taq HS 2x	12.5μl
Εκκινητής GAPDH F	0.5μl
Εκκινητής GAPDH R	0.5μl
ddH ₂ O	8.5μl

Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν για την ενίσχυση του mRNA του γονιδίου ήταν οι εξής:

- αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 1 λεπτό
- 40 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
 - ✓ αποδιάταξη στους 95°C για 15 δευτερόλεπτα
 - ✓ υβριδοποίηση-σύνδεση εκκινητών στους 60°C για 15 δευτερόλεπτα
 - ✓ επιμήκυνση στους 72°C για 10 δευτερόλεπτα
- τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ο έλεγχος παρουσίας ή όχι του τμήματος που ενισχύθηκε πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη 3% με μάρτυρα προτύπων μοριακών βαρών 100 bp (Fermentas, Thermo Scientific, Rockford, USA).

B.1.6 Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των mRNA μεταγράφων των γονιδίων LXRα, LXRβ και ABCA1 καθώς και της ώριμης μη κωδικής αλληλουχίας RNA miR-10b και του μικρού πυρηνικού RNA U6 με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time Polymerase Chain Reaction, RT PCR)

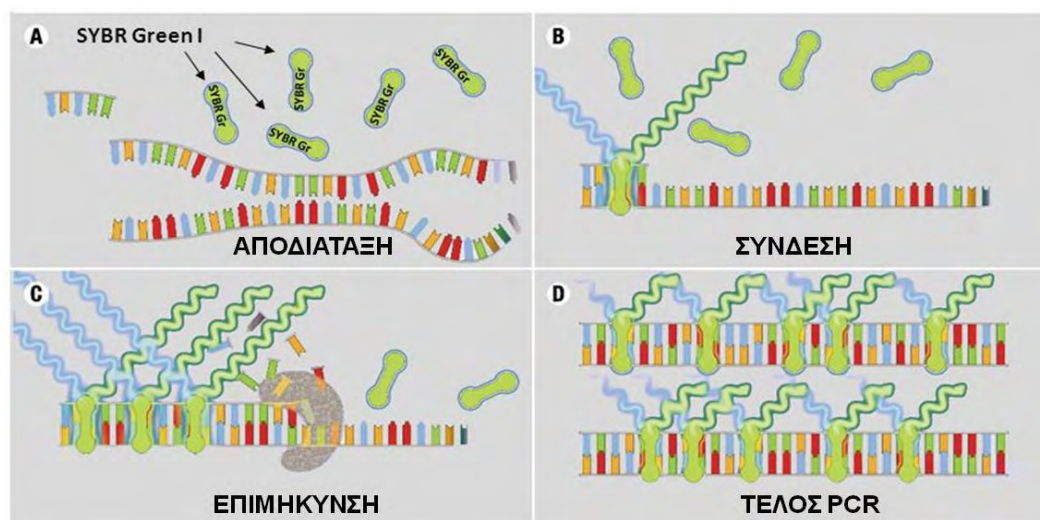
B.1.6.1 Βασικές αρχές της μεθόδου

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) επιτρέπει την ενζυματική ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA in vitro με τη βοήθεια της Taq πολυμεράσης και των εκκινητών. Η Taq πολυμεράση είναι μια θερμοανθεκτική πολυμεράση η οποία εξάγεται από το θερμοφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Οι εκκινητές (primers) είναι μονόκλωνες νουκλεοτιδικές ακολουθίες, ολιγονουκλεοτίδια, η κάθε μία από τις οποίες είναι συμπληρωματική προς τη μία από τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA-εκμαγείου. Με τη διαδικασία της PCR οι εκκινητές υβριδίζονται στις συμπληρωματικές θέσεις των δύο αλυσίδων, στα άκρα του τμήματος του DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο πολλαπλασιασμός του συγκεκριμένου τμήματος του DNA το μείγμα αντίδρασης θα πρέπει να περιέχει : τη δίκλωνη ακολουθία DNA που πρόκειται να ενισχυθεί, Taq πολυμεράση με το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα, το ζεύγος των εκκινητών, διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) τα οποία χρησιμοποιεί η πολυμεράση και διάλυμα χλωριούχου μαγνησίου (MgCl₂) που διευκολύνει τη δράση του ενζύμου. Η αντίδραση της PCR περιλαμβάνει 30-40 επαναλαμβανόμενους κύκλος καθένας από τους οποίους περιλαμβάνει τρία στάδια:

- 1) Αποδιάταξη του εκμαγείου-DNA
Συνθήκες: 94°C-96°C για 20-60 δευτερόλεπτα
- 2) Σύνδεση εκκινητών με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλυσίδες
Συνθήκες: 37°C-65°C για 20-60 δευτερόλεπτα
- 3) Επιμήκυνση των συνδεδεμένων εκκινητών και σύνθεση DNA με κατεύθυνση 5' → 3'
Συνθήκες: 72°C για 0.5-2 λεπτά

Η χρονική διάρκεια κάθε σταδίου εξαρτάται από το μήκος (σε bp) του υπό ενίσχυση τμήματος DNA. Με την παραπάνω διαδικασία επιτυγχάνεται η συλλογή ενός εκατομμυρίου περίπου αντιγράφων της επιθυμητής αλληλουχίας καθώς κάθε θερμοκρασιακός κύκλος διπλασιάζει το προϊόν του προηγούμενου κύκλου.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR) αποτελεί μία γρήγορη, αξιόπιστη και ευαίσθητη τεχνική η οποία παρέχει τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης του παραγόμενου προϊόντος. Ο έλεγχος της προόδου της ενίσχυσης της επιθυμητής αλληλουχίας επιτυγχάνεται με τη βοήθεια ειδικών χημικών αντιδράσεων και ανιχνευτών. Σήμερα οι πιο κοινές μέθοδοι χημείας που χρησιμοποιούνται στη Real-time PCR είναι α) η χρωστική ουσία SYBR Green I, β) ανιχνευτές υδρόλυσης (Hydrolysis probes) και γ) ανιχνευτές υβριδοποίησης (Hybridization probes). Η απλούστερη μέθοδος είναι αυτή στην οποία το προϊόν PCR ανιχνεύεται με τη φθορίζουσα χρωστική SYBR Green I. Η χρωστική αυτή παρουσιάζει ελάχιστο ή καθόλου φθορισμό όταν βρίσκεται ελεύθερη σε διάλυμα, ενώ παράγει φθορισμό όταν δεσμεύεται σε δίκλινα μόρια DNA (Εικόνα 25). Επομένως η ένταση του σήματος σε κάθε βήμα της αντίδρασης PCR αυξάνει καθώς αυξάνει και η συγκέντρωση του προϊόντος.

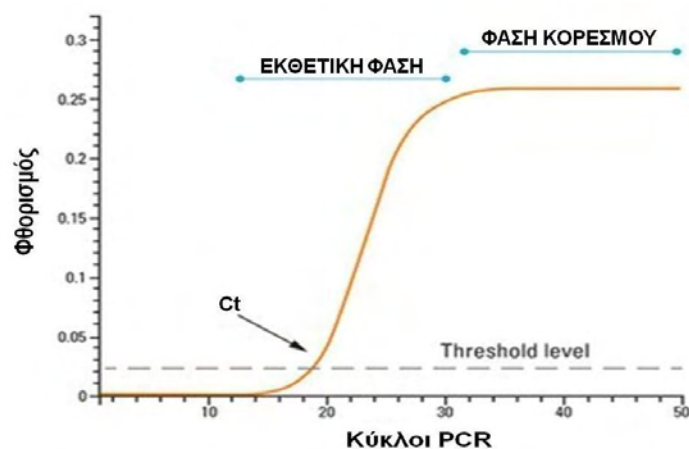


Εικόνα 25: Δράση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green I

B.1.6.2 Ποσοτικοποίηση

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό, η Real-time PCR εκμεταλλεύεται την αναλογική σχέση του πρώτου κύκλου στον οποίον το προϊόν ενίσχυσης είναι σε ανιχνεύσιμη ποσότητα. Συγκεκριμένα υπάρχει ένα κατώφλι (threshold)-σήμα φθορίζουσας χρωστικής το οποίο καθορίζει σε ποιο σημείο όλα τα δείγματα μπορούν να συγκριθούν. Αυτό το κατώφλι υπολογίζεται ως συνάρτηση του ποσού του υπόβαθρου της φθορίζουσας χρωστικής και τελικά ο κλασματικός αριθμός των κύκλων PCR που απαιτούνται για να παράγουν αρκετό σήμα φθορίζουσας χρωστικής που θα φθάσει σε αυτό το κατώφλι χαρακτηρίζεται ως κατώφλι κύκλου

(cycle threshold, Ct). Οι τιμές Ct εξαρτώνται απόλυτα από το αρχικό ποσό του δείγματος και είναι η βάση για τον υπολογισμό των επιπέδων έκφρασης του mRNA (Εικόνα 26).



Εικόνα 26: Γραφική παράσταση πολλαπλασιασμού που προκύπτει κατά την Real-time PCR

Η γραφική παράσταση πολλαπλασιασμού είναι η συνάρτηση του φθορισμού σε σχέση με τον αριθμό των κύκλων. Ως threshold ορίζονται οι κύκλοι PCR κατά τους οποίους το σήμα συσσωρεύεται μεν αλλά είναι κάτω από τα όρια ανίχνευσης από τη συσκευή στην οποία πραγματοποιείται η αντίδραση. Σήμα χρωστικής το οποίο ανιχνεύεται πάνω από το κατώφλι θεωρείται πραγματικό και χρησιμοποιείται για το καθορισμό του στατιστικά σημαντικού σήματος για κάθε δείγμα (cycle threshold, Ct). Οι τιμές Ct των δειγμάτων χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της σχετικής ποσότητας του κάθε δείγματος και εντοπίζονται πάντα στην εκθετική φάση πολλαπλασιασμού (exponential phase). Κατά συνέπεια, η ποσοτικοποίηση δεν επηρεάζεται από την εξάντληση κάποιου από τα συστατικά, συνήθως των εκκινητών, η οποία συμβαίνει κατά τη φάση κορεσμού (Plateau phase). Ανάλογα με το σκοπό του πειράματος, αν δηλαδή απαιτείται να υπολογισθεί η σχετική ποσότητα DNA ή ο ακριβής αριθμός αντιγράφων, υπάρχουν δύο διαφορετικές μέθοδοι ποσοτικοποίησης: η απόλυτη ποσοτικοποίηση (Absolute quantification) και η σχετική ποσοτικοποίηση (Relative quantification). Η απόλυτη ποσοτικοποίηση παρέχει μεγαλύτερη ακρίβεια στην ποσοτικοποίηση των παραγόμενων προϊόντων της Real-time PCR και πραγματοποιείται όταν κρίνεται αναγκαία η γνώση του ακριβούς αριθμού των αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου σε κάθε δείγμα. Η μέθοδος πραγματοποιείται μέσω της δημιουργίας απόλυτης πρότυπης καμπύλης αναφοράς (standard curve) χρησιμοποιώντας δείγματα γνωστής συγκέντρωσης.

Η σχετική ποσοτικοποίηση είναι πιο εύκολη στη χρήση της σε σχέση με την απόλυτη, ενώ επίσης δεν είναι απαραίτητη η κατασκευή καμπύλης αναφοράς. Η μέθοδος στηρίζεται στην σύγκριση της έντασης φθορισμού του υπό μελέτη γονιδίου με εκείνη ενός γονιδίου αναφοράς (reference gene) του ίδιου οργανισμού στην ίδια αντίδραση. Έχουν αναπτυχθεί διάφορα μαθηματικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται για να υπολογίσουμε την έκφραση του υπό μελέτη γονιδίου. Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σχετική ποσοτικοποίηση των mRNA μεταγράφων των υπό μελέτη γονιδίων όπου το ποσό του μορίου-στόχου κανονικοποιήθηκε ως προς έναν εσωτερικό μάρτυρα σε σχέση με ένα μόριο-ρυθμιστή (calibrator) δίνεται από τη σχέση $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

B.1.6.3 Πρωτόκολλο αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time Polymerase Chain Reaction, RT PCR)

Για την ποσοτικοποίηση των mRNA μεταγράφων των γονιδίων LXRα, LXRβ και ABCA1 καθώς της ώριμης μη κωδικής αλληλουχίας RNA miR-10b με τη μέθοδο της Real-time PCR χρησιμοποιήθηκε η συσκευή ABI 7300 (Applied Biosystems Foster, CA), ενώ οι ειδικοί για κάθε αντίδραση εκκινητές αναφέρονται στον Πίνακα 4.

Η διαδικασία της PCR περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους θερμοκρασιακούς κύκλους (30-45), καθένας από τους οποίους περιλαμβάνει τρία στάδια:

- 1) αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στους 94-95°C
- 2) σύνδεση των εκκινητών στα δύο αντίθετα άκρα της μονόκλωνης πια ακολουθίας-στόχου, σε θερμοκρασία που εξαρτάται κάθε φορά από τη σύνθεση των εκκινητών
- 3) θέρμανση του μείγματος στους 68-72 °C, έτσι ώστε η πολυμεράση να πραγματοποιήσει την αντιγραφή του DNA-στόχου με τη βοήθεια των dNTPs, ξεκινώντας από τους εκκινητές.

Πίνακας 4: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην τεχνική Real-time PCR για τη μελέτη της μεταγραφικής έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων.

Γονίδιο	Εκκινητής Forward	Εκκινητής Reverse
LXRα	CCGCCTGAAGAAACTGAA	CGAAGCCGGTCAGAAAAG
LXRβ	CGCTACAACCACGAGACAGA	GTGGAAGTCGTCCTTGCTGT
ABCA1	GGAGGCAATGGCACTGAGGAA	CCTGCCTTGTGGCTGGAGTGT
GAPDH	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG
miR-10b	CGTCGTACCCTGTAGAACCGA	GTGCAGGGTCCGAGGT
U6	GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT	CTCACACCGTGTCTGTTCCA

Υλικά

- cDNA
- Ρυθμιστικό διάλυμα με SYBR Green I (Fermentas Thermo Scientific, Rockford, USA)
- Εκκινητές των γονιδίων
- Δις-απεσταγμένο νερό (ddH₂O)

Πειραματική Διαδικασία

- Το διάλυμα αντίδρασης για την ανίχνευση της έκφρασης των γονιδίων περιείχε:

cDNA	3μl
SYBR Green	12.5μl
Εκκινητής Forward	1μl
Εκκινητής Reverse	1μl
ddH ₂ O	7.5μl

- Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν για την ενίσχυση του mRNA των γονιδίων ήταν οι εξής:

- αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 10 λεπτά
- 45 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
 - ✓ αποδιάταξη στους 95°C για 15 δευτερόλεπτα
 - ✓ υβριδοποίηση-σύνδεση εκκινητών στους 60°C για 60 δευτερόλεπτα
 - ✓ επιμήκυνση στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα
- τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά

B.1.7 Απομόνωση πρωτεΐνης από φρέσκο αορτικό ιστό και ανευρυσματικά λεία μυϊκά κύτταρα σε καλλιέργεια

Η απομόνωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος πραγματοποιήθηκε από ομογενοποίηση του υποενδοθηλιακού χώρου (έσω και μεσαίος χιτώνας) ανευρυσματικής, αθηρωματικής μη ανευρυσματικής και φυσιολογικής κοιλιακής αορτής καθώς και από καλλιέργειες ανευρυσματικών λείων μυϊκών κυττάρων με σκοπό τον έλεγχο και τη μέτρηση της πρωτεϊνικής έκφρασης.

Υλικά

- Διάλυμα λύσης κυττάρων (RIPA Lysis buffer) το οποίο αποτελείται από:
 - 1% Triton X-100 (Scharlau, Barcelona, Spain)
 - 1% Sodium Deoxycholate (Scharlau, Barcelona, Spain)
 - 0.1% SDS (Scharlau, Barcelona, Spain)
 - 150mM NaCl (Scharlau, Barcelona, Spain)
 - 10mM Tris (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK)
 - 1mM EDTA (Scharlau, Barcelona, Spain)
- Αναστολείς πρωτεασών (protease inhibitor cocktail tablets EDTA free, Roche, Indianapolis, IN, USA)

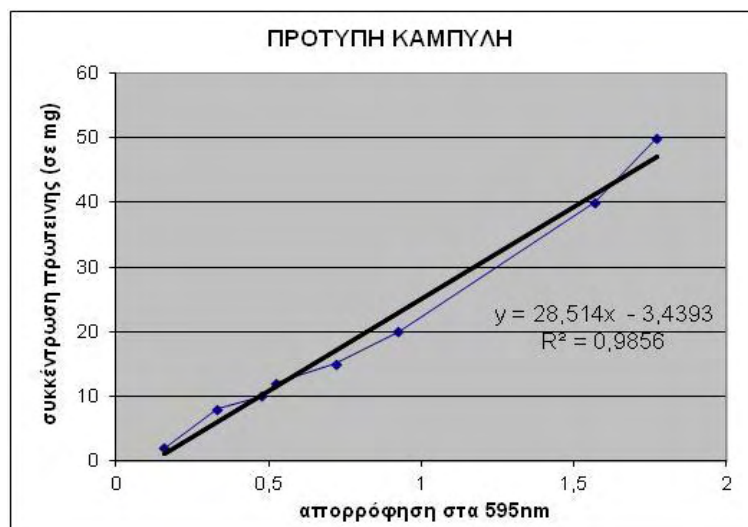
Πειραματική Διαδικασία

- Τεμαχισμός των ιστών και προσθήκη 10-30μl αναστολέων πρωτεασών (ανάλογα με το μέγεθος του ιστού) με σκοπό την προστασία των πρωτεϊνών από τη δράση των πρωτεασών. Οι πρωτεάσες σερίνης ή ενδοπεπτιδάσες σερίνης είναι ένζυμα με ένα κατάλοιπο σερίνης στο ενεργό τους κέντρο που υδρολύουν τους πεπτιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών και έτσι το μόριο χάνει την ενεργότητά του.
- Προσθήκη 100-300μl διαλύματος λύσης RIPA lysis buffer ανάλογα με το μέγεθος του ιστού. Για την απομόνωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από καλλιέργειες ανευρυσματικών ΛΜΚ το RIPA lysis buffer προστίθεται μαζί με τους αναστολείς πρωτεασών σε κυτταρικό ίζημα.
- Ομογενοποίηση του ιστού με τη χρήση ομογενοποιητή (IKA-WERKE)
- Μηχανική ανάδευση των δειγμάτων σε vortex και επώαση των δειγμάτων σε πάγο για 10 λεπτά. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται τρεις φορές
- Φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 15 λεπτά στους 2-8°C
- Μεταφορά του υπερκλειμένου σε νέο σωληνάριο

- Φωτομέτρηση των δειγμάτων για τον έλεγχο της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης και αποθήκευση στους -80°C

B.1.7.1 Υπολογισμός ποσότητας πρωτεϊνών - Μέθοδος Bradford

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. Συγκεκριμένα ποσότητες από 1μg έως 20μg αλβουμίνης του ορού του βοός (Bovine Serum Albumin, BSA, Bio-Rad Protein Assay) διαλύονται σε 800μl dH₂O. Έπειτα προστίθενται 200μl χρωστικής σε κάθε δείγμα πρωτεΐνης και το μίγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Ακολούθως γίνεται ήπια ανάδευση των δειγμάτων αρκετές φορές, μεταφορά τους σε κυβέττα και φωτομέτρηση στα 595nm. Από τις τιμές των απορροφήσεων των διαφόρων συγκεντρώσεων κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη (Εικόνα 27).



Εικόνα 27: Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών.

Έπειτα για την ανάλυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων άγνωστης συγκέντρωσης προστίθενται 5μl από κάθε δείγμα σε 495μl διάλυμα Bradford και ακολουθεί η παραπάνω διαδικασία. Με βάση την πρότυπη καμπύλη που έχει δημιουργηθεί βάση των δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης, προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνικών δειγμάτων.

B.1.8 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου – SDS

B.1.8.1 Βασικές αρχές της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση βασίζεται στο γεγονός ότι ένα μόριο με καθαρό φορτίο, όπως πρωτεΐνες, DNA, RNA, μετακινείται σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η ταχύτητα μετακίνησης (u) μίας πρωτεΐνης (ή κάθε μορίου) σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης (z) και τον συντελεστή τριβής (f):

$$u = Ez/f$$

Η σταθερά τριβής εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου που μετακινείται καθώς και από την πυκνότητα του μέσου. Ο ηλεκτροστατικός διαχωρισμός γίνεται σχεδόν πάντα σε πηκτή και όχι σε υγρό κυρίως για δύο λόγους. Καταρχάς η πηκτή καταστρέφει τα ρεύματα που δημιουργούνται από μικρές βαθμιδώσεις θερμοκρασίας – απαραίτητη προϋπόθεση για σωστό διαχωρισμό. Δεύτερον, η πηκτή λειτουργεί σαν μοριακός ηθμός καθιστώντας έτσι ευκολότερους τους διαχωρισμούς μορίων. Τα μόρια που είναι μικρά σε σχέση με τους πόρους της πηκτής κινούνται εύκολα δια μέσου της πηκτής, ενώ τα μεγάλα μόρια μένουν σχεδόν αμετακίνητα. Μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται μέσα από την πηκτή με διαφορετικές ταχύτητες. Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου είναι προτιμότερες για ηλεκτροφόρηση γιατί αποτελούνται από χημικά ουδέτερες ενώσεις, ενώ οι πόροι της πηκτής μπορούν εύκολα να ρυθμιστούν επιλέγοντας διαφορετικές συγκεντρώσεις ακρυλαμιδίου και μεθυλενοδισακρυλαμιδίου στον πολυμερισμό για τον σχηματισμό της πηκτής.

Σε μία ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως βάσει του μοριακού τους βάρους. Το δωδεκακυλοθειικό (SDS) είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό που καταστρέφει τις μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας φυσικής πρωτεΐνης. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις κύριες αλυσίδες σε αναλογία ενός μορίου SDS ανά 2 αμινοξέα, γεγονός που δίνει στο σύμπλοκο του SDS με την αποδιαταγμένη πρωτεΐνη ένα μεγάλο φορτίο περίπου ανάλογο με τη μάζα της. Το αρνητικό φορτίο που αποκτάται με τη δέσμευση του SDS είναι συνήθως πολύ μεγαλύτερο απ' ό,τι το αρχικό φορτίο της φυσικής πρωτεΐνης με αποτέλεσμα το αρχικό φορτίο καθίσταται αμελητέο. Η μετακίνηση γίνεται σε λεπτή κατακόρυφη στιβάδα και με αυτόν τον τρόπο ηλεκτροφόρησης η μετακίνηση των περισσότερων πολυπεπτιδικών αλυσίδων κάτω από αυτές τις συνθήκες είναι απολύτως ανάλογη με το λογάριθμο της μάζας τους.

B.1.8.2 Πρωτόκολλο ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου – SDS

Υλικά

- Διάλυμα χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης (Samples buffer, Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK)
- Αναγωγικό διάλυμα (Reducing buffer, Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK)
- Πηκτή πολυακρυλαμιδίου-SDS
- Μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών πρωτεϊνών (Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad, California, USA)
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer, Bio-Rad, California, USA) (50ml Running buffer + 950ml ddH₂O)
- Δις-απεσταγμένο νερό (ddH₂O)

Πειραματική Διαδικασία

1^ο Στάδιο: Αποδιάταξη των πρωτεϊνών

Πριν την ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Το διάλυμα αποδιάταξης περιλαμβάνει 5μl χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης και 2μl αναγωγικού διαλύματος σε όγκο που αντιστοιχεί για 20μg πρωτεΐνης. Το διάλυμα της χρωστικής βοηθάει στην ανίχνευση των πρωτεϊνών κατά το διαχωρισμό τους στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου, ενώ το αναγωγικό διάλυμα έχει την ιδιότητα να ανάγει τη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών μετατρέποντας τους δισουλφιδικούς δεσμούς σε ελεύθερες σουλφιδρυλικές ομάδες. Ως αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται μόνο βάσει του μοριακού τους βάρους. Στη συνέχεια τα δείγματα μεταφέρονται σε συσκευή PCR όπου πραγματοποιείται η αποδιάταξή τους στους 95°C για 10 λεπτά.

2^ο Στάδιο: Διαχωρισμός των πρωτεϊνών

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η συσκευή ηλεκτροφόρησης BIORAD και η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής:

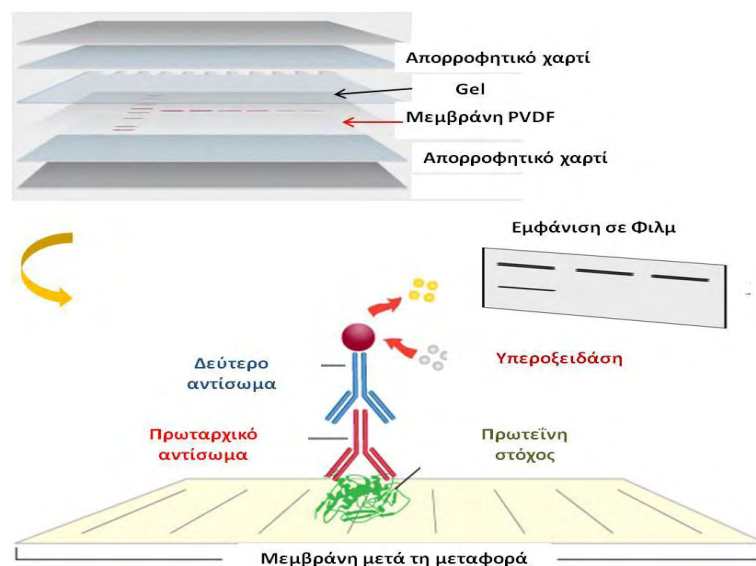
- Στήσιμο της συσκευής ηλεκτροφόρησης
- Προσθήκη 600ml Running buffer στο μπροστά και πίσω μέρος της συσκευής καθώς και στο μεσαίο μέρος αυτής
- Φόρτωση των δειγμάτων στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Στη μία άκρη της πηκτής φορτώνεται και ο μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών πρωτεϊνών

- Ηλεκτροφόρηση στα 200V για 50 λεπτά
- Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης προετοιμάζονται τα διαλύματα και τα υλικά που θα χρησιμοποιηθούν στην ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών (Western blot)

B.1.9 Ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών LXRα, LXRβ, ABCA1, α-SM και βιμεντίνη με την τεχνική Western blot

B.1.9.1 Βασικές αρχές της μεθόδου

Η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης βασίζεται στη μεταφορά των αποδιαταγμένων πρωτεϊνών σε μία ειδική επιφάνεια και στην ανίχνευση των επιλεγμένων πρωτεϊνών με τη χρήση ειδικού αντισώματος. Η επιφάνεια αυτή είναι συνήθως μεμβράνη PVDF (Polyvinylidene Fluoride membrane, Millipore, USA) και βοηθάει τις πρωτεΐνες να αντιδράσουν με το αντίσωμα. Το αντίσωμα αυτό αναγνωρίζει την πρωτεΐνη σαν αντιγόνο και δεσμεύεται σε αυτή. Το σύμπλοκο αντιγόνου – αντισώματος στην επιφάνεια μπορεί να ανιχνευτεί με την προσθήκη δεύτερου αντισώματος ειδικού για το πρώτο. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε δεύτερο αντίσωμα σημασμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση της ραπανίδας (horseradish peroxidase, HRP) και η ενίσχυση έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (enhanced chemiluminescence, ECL) έχοντας ως αποτέλεσμα να δημιουργείται σκοτεινή γραμμή σε φιλμ ακτίνων X (αυτοραδιογραφία) η οποία αντιπροσωπεύει τα επίπεδα έκφρασης της υπό μελέτης πρωτεΐνης (Εικόνα 28).



Εικόνα 28: Αρχή της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας.

B.1.9.2 Πρωτόκολλο ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blot)

Υλικά

- Διάλυμα μεταφοράς το οποίο αποτελείται από:
 - 2.9g Glycine (Scharlau, Barcelona, Spain)
 - 5.8g Tris Base (Scharlau, Barcelona, Spain)
 - 0.37g SDS (Scharlau, Barcelona, Spain)
 - dH₂O
 - Methanol (Scharlau, Barcelona, Spain)
- Χαρτί Whitman (Bio-Rad, California, USA)
- Μεμβράνη PVDF (Millipore, USA)
- Χρωστική μεμβράνης (Ponseau, Sigma-Aldrich, Munich, Germany)
- Διάλυμα πλύσης TBS-Tween (TBST) το οποίο αποτελείται από:
 - 50 mM Tris (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK)
 - 150 mM NaCl (Scharlau, Barcelona, Spain)
 - 1mM EDTA (Scharlau, Barcelona, Spain)
 - 0.05% Tween (Bio-Rad, California, USA)
- Σκόνη μπλοκαρίσματος (Blotting Grade Blocker, Bio-Rad, California, USA)
- Μεθανόλη (Scharlau, Barcelona, Spain)
- Ορός αλβουμίνης βοοειδών (BSA, Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK)
- Διάλυμα ανάπτυξης (Developer buffer, Kodak)
- Διάλυμα σταθεροποίησης (Fixer buffer, Kodak)
- Φιλμ ακτίνων X (Kodak)
- Ενισχυτικό σήματος ECL⁺ (Thermo Scientific, Rockford, USA)
- Πρωταρχικά αντισώματα των υπό μελέτη γονιδίων
 - anti-LXRα (ab41902, Abcam) σε αραίωση 1:200
 - anti-LXRβ (ab76983, Abcam) σε αραίωση 1:200
 - anti-ABCA1 (ab18189, Abcam) σε αραίωση 1:500
 - anti-α-SM (A5228, Sigma-Aldrich) σε αραίωση 1:1000
 - anti-vimentin (ab92547, Abcam) σε αραίωση 1:1000
 - anti-GAPDH (CB1001, Calbiochem) σε αραίωση 1:1000
- Δεύτερο αντίσωμα
 - Goat anti-mouse HRP (Invitrogen) σε αραίωση 1:10000
 - Goat anti-rabbit HRP (Invitrogen) σε αραίωση 1:10000

Πειραματική Διαδικασία

Για την μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή στη μεμβράνη PVDF χρησιμοποιήθηκε η συσκευή στυπώματος Semi-dry Transfer System BIORAD.

Αναλυτικότερα:

- Η μεμβράνη PVDF επωάζεται για 15 δευτερόλεπτα σε μεθανόλη με σκοπό να ενεργοποιηθεί
- Επώαση της μεμβράνης PVDF, των χαρτιών Whitman και της πηκτής σε διάλυμα μεταφοράς Transfer buffer για 15 λεπτά
- Κατασκευάζεται στοιβάδα: 2 χαρτιά Whitman → μεμβράνη PVDF → πηκτή πολυακρυλαμιδίου → 2 χαρτιά Whitman
- Μεταφορά της στοιβάδας στη η συσκευή στυπώματος
- Μεταφορά των πρωτεϊνών στα 30V για 30 λεπτά
- Μετά το πέρας της μεταφοράς ακολουθεί βάψιμο της μεμβράνης με Ponceau, μέχρι να εμφανιστούν οι μπάντες των πρωτεϊνών
- Ξέπλυμα της μεμβράνης με διάλυμα πλύσης TBST για 15 λεπτά και επιπλέον τρεις φορές για 5 λεπτά με ανάδευση
- Μεταφορά της μεμβράνης σε διάλυμα μπλοκαρίσματος 5% (2,5 gr σκόνης μπλοκαρίσματος σε 50 ml TBST) και επώαση στους 4°C με ανάδευση ολονύκτια
- Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBST για 15 λεπτά και επιπλέον τρεις φορές για 5 λεπτά με ανάδευση
- Επώαση της μεμβράνης με το εκάστοτε πρωταρχικό αντίσωμα στους 4°C με ανάδευση ολονύκτια. Το αντίσωμα διαλύεται σε διάλυμα μπλοκαρίσματος 5%
- Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBST για 15 λεπτά και επιπλέον τρεις φορές για 5 λεπτά με ανάδευση
- Επώαση της μεμβράνης στο κατάλληλο δεύτερο αντίσωμα για 1 ώρες με ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση του δεύτερου αντισώματος και ξέπλυμα της μεμβράνης με TBST για 15 λεπτά και επιπλέον τρεις φορές για 5 λεπτά με ανάδευση
- Η ανίχνευση γίνεται με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας
- Για την εμφάνιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Η μεμβράνη επωάζεται για ένα λεπτό σε 10 ml διαλύματος λουμινόλης (1,25 mM σε 0,1 M Tris-Cl pH 8,5), στο οποίο προστίθενται 10 μl 3% H₂O₂ και 100 μl κουμαρικού οξέος (6,8 mM σε DMSO). Η συζευγμένη με το δεύτερο αντίσωμα υπεροξειδάση αντιδρά με το υπεροξειδίο δημιουργώντας

ρίζες υπεροξειδίου, οι οποίες αντιδρούν με τον ενισχυτή της χημειοφωταύγειας κουμαρικό οξύ δημιουργώντας ρίζες κουμαρικού οξέος. Αυτές με τη σειρά τους οξειδώνουν της λουμινόλη σε 3-αμινο-φθαλικό, ουσία η οποία εκπέμπει φως.

- Η μεμβράνη καλύπτεται με διαφανή μεμβράνη και ακολουθεί έκθεση σε φωτογραφικό φιλμ Kodak. Το φιλμ εμφανίζεται με τα αντιδραστήρια εμφάνισης: 3 λεπτά επώαση στο διάλυμα ανάπτυξης (Developer buffer, Kodak), 3 λεπτά στο διάλυμα σταθεροποίησης (Fixer buffer, Kodak) και 3 λεπτά σε νερό.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την ανοσοαποτύπωση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Image J programme (1.47r, Wayne Rasband National Institutes of Health, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>). Το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιεί μία διαδικασία ποσοτικοποίησης, κατά την οποία συγκρίνεται η σχετική ένταση διαφορετικών ζωνών πάνω σε μία σαρωμένη εικόνα ενός πηκτώματος ή μεμβράνης. Συνεπώς, οι μεμβράνες σαρώνονται και προσδιορίζεται η ένταση των ζωνών πάνω στην εικόνα για όλες τις πρωτεΐνες ενδιαφέροντος.

B.1.10 Ανοσοϊστοχημικές Τεχνικές

B.1.10.1 Ιστολογικό υλικό και προετοιμασία δειγμάτων για τομές σε κρουτόμο

Οι ανοσοϊστοχημικές τεχνικές πραγματοποιήθηκαν σε διαδοχικές τομές αορτικού τοιχώματος ανευρυσματικής (3 δείγματα) και φυσιολογικής (4 δείγματα) κοιλιακής αορτής καθώς επίσης και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής (3 δείγματα). Όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν περιείχαν και τους τρεις χιτώνες (έσω, μεσαίος και έξω χιτώνας) του αορτικού τοιχώματος.

Συγκεκριμένα τα δείγματα αμέσως μετά τη παραλαβή τους διατηρούνται αρχικά σε μονιμοποιητικό διάλυμα 4% παραφορμαλδεΰδης (PFA) για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να διατηρηθεί η γενική δομή των κυτταρικών οργανιδίων. Έπειτα τα δείγματα τοποθετούνται σε διάλυμα 30% σουκρόζης (Sigma-Aldrich) στους 4°C όπου αρχικά επιπλέουν. Η παραμονή τους στο διάλυμα της σουκρόζης πραγματοποιείται μέχρι να βυθιστούν στο falcon λόγω ωσμωτικών φαινομένων. Ακολούθως οι ιστοί εμβαπτίζονται σε ισοπεντάνιο σε θερμοκρασία -45°C για 1 λεπτό και διατηρούνται στους -80°C μέχρι τη περαιτέρω χρήση τους.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε τεμαχισμός των ιστών σε κρουτόμο στους -24-26°C. Αρχικά πραγματοποιείται έγκλειση των ιστών σε μονιμοποιητικό κρουπροστατευτικό διάλυμα OCT. Εν συνεχεία, οι ιστοί κόβονται σε διαδοχικές τομές

πάχους 10μm με τη χρήση κρουτόμου και τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους πλάκες (Super frost plus) για περαιτέρω ιστοχημικές και ανοσοϊστοχημικές χρώσεις. Για κάθε δείγμα ελήφθησαν 6 διαδοχικές τομές σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα. Μετά το κόψιμο οι τομές φυλάσσονται στους -20°C .

B.1.10.2 Ιστολογικές Χρώσεις

B.1.10.2.1 Χρώση Αιματοξυλίνης και Ηωσίνης

Τομές ανευρυσματικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής επεξεργάστηκαν με τη χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης (Hematoxylin and Eosin, H&E) προκειμένου να αξιολογηθεί η μικροσκοπική τους μορφολογία και συγκεκριμένα να εκτιμηθεί ο βαθμός της αθηρωματικής πλάκας. Η μέθοδος χρώσης των ιστών με Αιματοξυλίνη-Ηωσίνη αποτελεί μία τεχνική η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στην ιστολογία. Η αιματοξυλίνη προσδένεται σε νουκλεϊκά οξέα και χρωματίζει μπλε περιοχές όπως ο πυρήνας και τα ριβοσώματα, ενώ αντίθετα η ηωσίνη προσδένεται σε πρωτεΐνες και χρωματίζει ροζ το κυτταρόπλασμα.

Υλικά

- Αιματοξυλίνη
- Ηωσίνη
- Διάλυμα 1% οξινισμένης αλκοόλης (0.5ml HCL + 50ml αιθανόλη)
- Διάλυμα 0.2% ammonium H₂O (0.2ml ammonium hydroxide + 100ml distilled water)
- Ξυλόλη (Scharlau, Barcelona, Spain)
- Ανιούσα βαθμίδωση αλκοολών (95%v/v, 100%v/v)

Πειραματική Διαδικασία

- Επώαση των τομών σε θερμοκρασία δωματίου
- Ξέπλυμα των τομών σε τρεχούμενο νερό (τρεις φορές)
- Επώαση των τομών σε διάλυμα αιματοξυλίνης για 8 λεπτά σε σκοτεινό κουτί
- Ξέπλυμα των τομών σε τρεχούμενο νερό
- Επώαση των τομών σε διάλυμα 1% οξινισμένης αλκοόλης για 30 δευτερόλεπτα
- Επώαση των τομών σε τρεχούμενο νερό για 1 λεπτό
- Επώαση των τομών σε διάλυμα 0.2% ammonium H₂O για 30 δευτερόλεπτα έως 1 λεπτό
- Επώαση των τομών σε διάλυμα ηωσίνης για 3 λεπτά
- Γρήγορα εμβάπτιση των τομών σε τρεχούμενο νερό

- Αφυδάτωση των τομών σε σειρά διαλυμάτων αλκοόλης ανιούσης συγκέντρωσης: 95%v/v για 1 λεπτό και 100%v/v για 5 λεπτά σε κάθε διάλυμα
- Εμβάπτιση των τομών σε ξυλόλη για 5 λεπτά
- Τοποθέτηση καλυπτρίδων σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα
- Παρατήρηση των τομών σε οπτικό μικροσκόπιο και εξαγωγή συμπερασμάτων

B.1.10.2.2 Χρώση Τολουϊδίνης

Η ύπαρξη λιπιδίων στο αορτικό τοίχωμα ανευρυσματικής, φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής αορτής, ελέγχθηκε μετά από χρώση των αντίστοιχων τομών με το κυανούν της τολουϊδίνης. Πρόκειται για μια οξεόφιλη χρώση η οποία χρωματίζει επιλεκτικά όξινα συστατικά των ιστών όπως τα νουκλεϊκά οξέα των κυτταρικών πυρήνων. Το κυανούν της τολουϊδίνης βασίζει τη δράση του στην ικανότητα της μεταχρωμασίας, κατά την οποία παρατηρείται αλλαγή της χρωστικής από το ορθοχρωματικό ή συνηθισμένο της χρώμα (μπλε στην περίπτωση της τολουϊδίνης) σε μεταχρωματικό χρώμα με την παρουσία όξινων συστατικών. Η χρωματική αυτή αλλαγή προκύπτει ως αποτέλεσμα της δέσμευσης των μορίων της χρωστικής σε ισχυρά όξινα μόρια των ιστών και των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων. Συγκεκριμένα το κυανούν της τολουϊδίνης όταν βρεθεί σε συμπυκνωμένα διαλύματα, τα μόρια της χρωστικής πολυμερίζονται και ως εκ τούτου παρουσιάζουν αλλαγή στο χρώμα τους. Το αποτέλεσμα αυτής της μεταχρωματικής αντίδρασης είναι να χρωματίζονται διαφορετικά τα διάφορα συστατικά των ιστών.

Υλικά

- Διάλυμα 0.1% κυανού της τολουϊδίνης (Toluidine Blue O, TBO) (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) (0.1gr TBO + 100ml 0.1M Na⁺ PB)
- Ξυλόλη (Scharlau, Barcelona, Spain)
- Ανιούσα βαθμίδωση αλκοολών (70%v/v, 75%v/v, 95%v/v, 100%v/v)
- Απεσταγμένο νερό (dH₂O)
- Μονιμοποιητικό υλικό DPX Mountant medium (Fluka, Sigma-Aldrich, Munich, Germany)

Πειραματική Διαδικασία

- Επώαση των τομών σε θερμοκρασία δωματίου
- Επώαση των τομών σε διάλυμα 0.1% TBO για 60 δευτερόλεπτα
- Γρήγορα εμβάπτιση των τομών σε dH₂O

- Αφυδάτωση των τομών σε σειρά διαλυμάτων αλκοόλης ανιούσης συγκέντρωσης (70%v/v, 75%v/v, 95%v/v, 100%v/v) για 30 δευτερόλεπτα σε κάθε διάλυμα
- Εμβάπτιση των τομών σε ξυλόλη για 5 λεπτά (δύο φορές)
- Τοποθέτηση των τομών σε εστία κάθετης νηματικής ροής μέχρι να στεγνώσουν
- Κάλυψη των αντικειμενοφόρων πλακών με μονιμοποιητικό υλικό DPX χρησιμοποιώντας καλυπτρίδα
- Παρατήρηση των τομών σε οπτικό μικροσκόπιο και εξαγωγή συμπερασμάτων

B.1.10.3 Ανοσοϊστοχημεία

B.1.10.3.1 Αρχές της μεθόδου

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας προκειμένου να μελετηθεί η πρωτεϊνική έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων κατά μήκος των χιτώνων του αορτικού τοιχώματος ανευρυσματικής, φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής. Η συγκεκριμένη τεχνική επιτρέπει την ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση πρωτεϊνικών αντιγόνων σε κύτταρα και ιστούς με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων. Η μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας στηρίζεται στην επιλεκτική αλληλεπίδραση ανάμεσα σε ένα αντίσωμα και την πρωτεΐνη που αναγνωρίζει σχηματίζοντας ένα ειδικό σύμπλοκο. Το σύμπλοκο αντίσωμα-πρωτεΐνη μπορεί να ανιχνευτεί είτε με ανοσοφθορίζουσες τεχνικές με τη χρήση φθορίζοντων μορίων είτε με ανοσοενζυμικές τεχνικές με τη χρήση ενζυμικής χρωμογόνου αντίδρασης.

B.1.10.3.2 Ανοσοενζυμική μέθοδος

Η παρουσία αφρωδών κυττάρων τα οποία προέρχονται από λεία μυϊκά κύτταρα στο αορτικό τοίχωμα των υπό μελέτη ιστών πραγματοποιήθηκε με την ανοσοενζυμική μέθοδο και επακόλουθη χρώση των τομών με τη λιποδιαλυτή χρωστική Oil Red O. Η χρώση Oil Red O βασίζεται στη μεγάλη διαλυτότητα της χρωστικής στα λιπίδια παρά τον αλκοολικό διαλύτη όπου διαλύεται. Πριν την χρήση γίνεται αραίωση της χρωστικής στο νερό όπου η διαλυτότητά της είναι μικρή. Όταν όμως στη συνέχεια έρθει σε επαφή με τους ιστούς, η χρωστική μετακινείται από το διάλυμα προς τα λιπίδια όπου και η διαλυτότητά της είναι μεγαλύτερη.

Όσο αφορά στην ανοσοϊστοχημεία με την ανοσοενζυμική μέθοδο, η ανίχνευση των πρωτεϊνικών αντιγόνων πραγματοποιείται με τη χρήση αντισωμάτων ειδικών προς την πρωτεΐνη-στόχο και συνδεδεμένων με κατάλληλο ένζυμο. Το

ένζυμο που κυρίως χρησιμοποιείται είναι η υπεροξειδάση (horseradish peroxidase-HRP), η οποία καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου σε νερό και οξυγόνο όταν υπάρχει παρουσία ενός δότη ηλεκτρονίων. Σε αυτήν την περίπτωση η ανίχνευση του συμπλόκου πραγματοποιείται με τη χρήση χρωμογόνων ουσιών οι οποίες δρουν ως δότες ηλεκτρονίων. Κυρίως ως χρωμογόνο χρησιμοποιείται η 3,3-τετραϋδροχλωρική διάμινο-βενζιδίνη (DAB) η οποία προσδίνει καφέ χρώμα στη θέση των συμπλεγμάτων αντιγόνο-αντίσωμα.

Υλικά

- Διάλυμα πλύσης PBS χωρίς CaCl_2 και MgCl_2 (HyClone)
- Διάλυμα 3% υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2)
- Διάλυμα 2% λευκωματίνης του βόειου ορού (bovine serum albumen, BSA, Sigma-Aldrich, Munich, Germany)
- Διάλυμα 2% protein blocking agent (0.5% 2% BSA και 0.03% Triton X-100 σε PBS)
- Substrate reagent 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Thermo Scientific, Rockford, USA)
- Πρωταρχικό αντίσωμα έναντι της α -ακτίνης λείου μυϊκού τύπου (α -smooth muscle actin, α -SM, A5228, Sigma-Aldrich, Munich, Germany)
- Δεύτερο αντίσωμα Goat anti-mouse HRP (G21040, Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK)
- Διάλυμα 60%v/v ισοπροπανόλης (Scharlau, Barcelona, Spain)
- Oil Red O (Sigma-Aldrich, Munich, Germany)
- Μονιμοποιητικό διάλυμα glycerin jelly

Πειραματική Διαδικασία

- Επώαση των τομών σε θερμοκρασία δωματίου
- Επώαση των τομών σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS για 5 λεπτά (τρεις φορές)
- Επώαση των τομών σε διάλυμα 3% H_2O_2 με σκοπό την αναστολή της ενεργότητας της ενδογενούς υπεροξειδάσης των κυττάρων. Τα πλακάκια παραμένουν σ'αυτό το διάλυμα για 5 λεπτά και σε σκοτεινό μέρος για να αποφευχθεί η διάσπαση του H_2O_2 σε H_2O και O_2 με την επίδραση του φωτός.
- Ξέπλυμα των τομών σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS για 5 λεπτά (τρεις φορές)
- Επώαση των τομών με το διάλυμα 2% BSA για 1 ώρα
- Ξέπλυμα των τομών σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS για 5 λεπτά (τρεις φορές)

- Επώαση των τομών με το πρωταρχικό αντίσωμα (αραίωση 1:200) στο διάλυμα protein blocking agent ολονυκτίως σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό κουτί με υγρασία
- Ξέπλυμα των τομών σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS για 5 λεπτά (τρεις φορές)
- Επώαση των τομών με το δεύτερο αντίσωμα (αραίωση 1:250) σε διάλυμα 2% BSA για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου
- Ξέπλυμα των τομών σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS για 5 λεπτά (τρεις φορές)
- Επώαση των τομών σε διάλυμα DAB σε κάθε τομή για 17 λεπτά
- Ξέπλυμα των τομών σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS για 5 λεπτά (τρεις φορές)
- Ξέπλυμα των τομών με τρεχούμενο νερό για 2 λεπτά
- Επώαση των τομών σε διάλυμα 60% ισοπροπανόλης για 5 λεπτά
- Επώαση των τομών σε διάλυμα Oil Red O για 15 λεπτά
- Επώαση των τομών σε διάλυμα 60% ισοπροπανόλης για 5 λεπτά
- Ξέπλυμα των τομών με δις-απεσταγμένο νερό για 3 λεπτά
- Κάλυψη των αντικειμενοφόρων πλακών με μονιμοποιητικό υλικό glycerin jelly χρησιμοποιώντας καλυπτρίδα
- Παρατήρηση των τομών σε οπτικό μικροσκόπιο και εξαγωγή συμπερασμάτων

B.1.10.3.3 Ανοσοϊστοχημεία φθορισμού

Στην παρούσα μελέτη η ανοσοϊστοχημεία φθορισμού χρησιμοποιήθηκε για να διερευνήσουμε ποιοτικά και ποσοτικά τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που ενέχονται στο μηχανισμό εξόδου της χοληστερόλης (LXRα, ABCA1, ApoA1) καθώς επίσης και πρωτεϊνών-δεικτών (α-SM, βιμεντίνη/vimentin) χαρακτηριστικών των λείων μυϊκών κυττάρων κατά μήκος των χιτώνων του τοιχώματος της ανευρυσματικής, φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής. Στη συγκεκριμένη τεχνική το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος όταν ακτινοβοληθεί με μία δέσμη φωτός συγκεκριμένου μήκους κύματος εκπέμπει με τη σειρά του φως σε μήκος κύματος διαφορετικό από το μήκος απορρόφησης. Με αυτόν τον τρόπο επιτρέπει να προσδιοριστεί ο εντοπισμός της πρωτεΐνης-στόχου πάνω στον ιστό και συνεπώς η ποσοτική ανάλυση των επιπέδων έκφρασης αυτής. Επιπλέον ένα πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι επιτρέπει τον προσδιορισμό δύο διαφορετικών πρωτεϊνικών αντιγόνων ταυτοχρόνως πάνω στον ιστό χρησιμοποιώντας αντισώματα ειδικά για κάθε πρωτεΐνη.

Υλικά

- Διάλυμα πλύσης PBS χωρίς CaCl₂ και MgCl₂ (HyClone)
- Διάλυμα 2% λευκωματίνης του βόειου ορού (bovine serum albumen, BSA, Sigma-Aldrich, Munich, Germany)
- Διάλυμα 2% protein blocking agent (0.5% 2% BSA και 0.03% Triton X-100 σε PBS)
- Μονιμοποιητικό υλικό DAPI mounting medium (Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA)

Πειραματική Διαδικασία

- Επώαση των τομών σε θερμοκρασία δωματίου
- Επώαση των τομών σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS για 5 λεπτά (τρεις φορές)
- Επώαση των τομών με το διάλυμα 2% BSA για 1 ώρα
- Ξέπλυμα των τομών σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS για 5 λεπτά (τρεις φορές)
- Επώαση των τομών με το εκάστοτε πρωταρχικό αντίσωμα (Πίνακας 5) στο διάλυμα protein blocking agent ολονυκτίως σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό κουτί με υγρασία
- Ξέπλυμα των τομών σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS για 5 λεπτά (τρεις φορές)
- Επώαση των τομών με το αντίστοιχο δεύτερο αντίσωμα (Πίνακας 5) σε διάλυμα 2% BSA για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό κουτί με υγρασία.
- Ξέπλυμα των τομών σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS για 5 λεπτά (τρεις φορές)
- Κάλυψη των αντικειμενοφόρων πλακών με μονιμοποιητικό υλικό DAPI mounting medium χρησιμοποιώντας καλυπτρίδα
- Παρατήρηση των τομών σε μικροσκόπιο φθορισμού και εξαγωγή συμπερασμάτων

Επιπλέον η ανοσοϊστοχημεία φθορισμού χρησιμοποιήθηκε για να διερευνήσουμε την ύπαρξη αφρωδών κυττάρων που προέρχονται από μακροφάγα στο αορτικό τοίχωμα των υπό μελέτη ιστών. Για το σκοπό αυτό, ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία, οι τομές επωάζονται με πρωταρχικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης CD68 (Πίνακας 5), η οποία αποτελεί χαρακτηριστικό δείκτη των μακροφάγων, και επακόλουθη χρώση των τομών με χρωστική Oil Red O.

Ένα πρόβλημα στις τεχνικές ανοσοϊστοχημείας φθορισμού αποτελεί το φαινόμενο του αυτοφθορισμού ή φυσικού φθορισμού που μπορεί να παρουσιάζεται σε ορισμένους ιστούς εξαιτίας των συστατικών τους. Αποτέλεσμα αυτού του

φαινομένου είναι η δημιουργία background όταν χρησιμοποιούνται φθορίζουσες χρωστικές, το οποίο εμποδίζει την εκτίμηση του φθορισμού που εκπέμπεται λόγω της δημιουργίας του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος. Το παραπάνω φαινόμενο παρατηρείται και σε τομές αορτικού ιστού εξαιτίας των στρωμάτων ελαστίνης που εντοπίζονται στο τοίχωμα αυτό. Στη παρούσα μελέτη προκειμένου να εξασφαλίσουμε την ποιότητα των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τομές των υπό μελέτη ιστών ως μη ειδικό αρνητικοί μάρτυρες. Το γεγονός αυτό επιτρέπει να αξιολογήσουμε το φθορισμό που προκαλείται μόνο από το σύμπλεγμα του αντισώματος με την πρωτεΐνη-στόχο αποφεύγοντας το μη-ειδικό φθορισμό (background) που προκαλείται λόγω φθορισμού της ελαστίνης από την επώαση των δευτερογενών αντισωμάτων. Για την πειραματική επεξεργασία αυτών ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που περιγράφηκε με τη διαφορά ότι οι αντικειμενοφόρες πλάκες δεν επωάστηκαν με το πρωτογενές αντίσωμα.

Πίνακας 5: Αναλυτικά στοιχεία πρωταρχικών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στη ανοσοϊστοχημεία φθορισμού.

Πρωταρχικά Αντισώματα	Εταιρεία	Κωδικός	Είδος	Αραίωση
LXRα	Abcam, Cambridge, UK	ab41902	mouse	1:100
ABCA1	Abcam, Cambridge, UK	ab18180	mouse	1:200
ΑποAI	Abcam, Cambridge, UK	ab7614	goat	1:200
α-SM	Sigma-Aldrich, Munich, Germany	A5228	mouse	1:200
Vimentin	Abcam, Cambridge, UK	ab92547	rabbit	1:100
CD68	Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA, USA	sc20060	mouse	1:100

Δεύτερα Αντισώματα	Εταιρεία	Κωδικός	Είδος	Αραίωση
AlexaFluor® 488-conjugated	Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK	A11001	anti-mouse	1:250
AlexaFluor® 488-conjugated	Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK	A11008	anti-rabbit	1:250
AlexaFluor® 594-conjugated	Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK	A21203	anti-mouse	1:250
AlexaFluor® 594-conjugated	Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK	A21207	anti-rabbit	1:250
AlexaFluor® 594-conjugated	Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK	A11058	anti-goat	1:250

B.1.11 Μικροσκοπία

Η παρατήρηση των αορτικών τομών μετά από τις ιστολογικές και ανοσοϊστοχημικές χρώσεις έγινε σε μικροσκόπιο φωτός Zeiss Axioskop 40 (Carl Zeiss Inc, New York, USA) με φακούς Plan Neofluar 10x/0.25 και 40x/0.75 και οι εικόνες ελήφθησαν με τη βοήθεια ψηφιακής κάμερας Leica DFC 480 (Leica Cameras, Solms, Germany) προσαρμοσμένης στο μικροσκόπιο. Η λήψη εικόνων φθορισμού πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τρία διαφορετικά φίλτρα φθορισμού (Πίνακας 6).

Πίνακας 6: Αναλυτικά στοιχεία των φίλτρων φθορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη των εικόνων φθορισμού σε μικροσκόπιο Zeiss Axioskop.

Φίλτρο Φθορισμού	Μήκος Κύματος Διέγερσης (excitation)	Μήκος Κύματος Εκπομπής (emission)
DAPI filter set	359nm	461nm
FITC filter set	495nm	517nm
Fura Red filter set	435nm	670nm

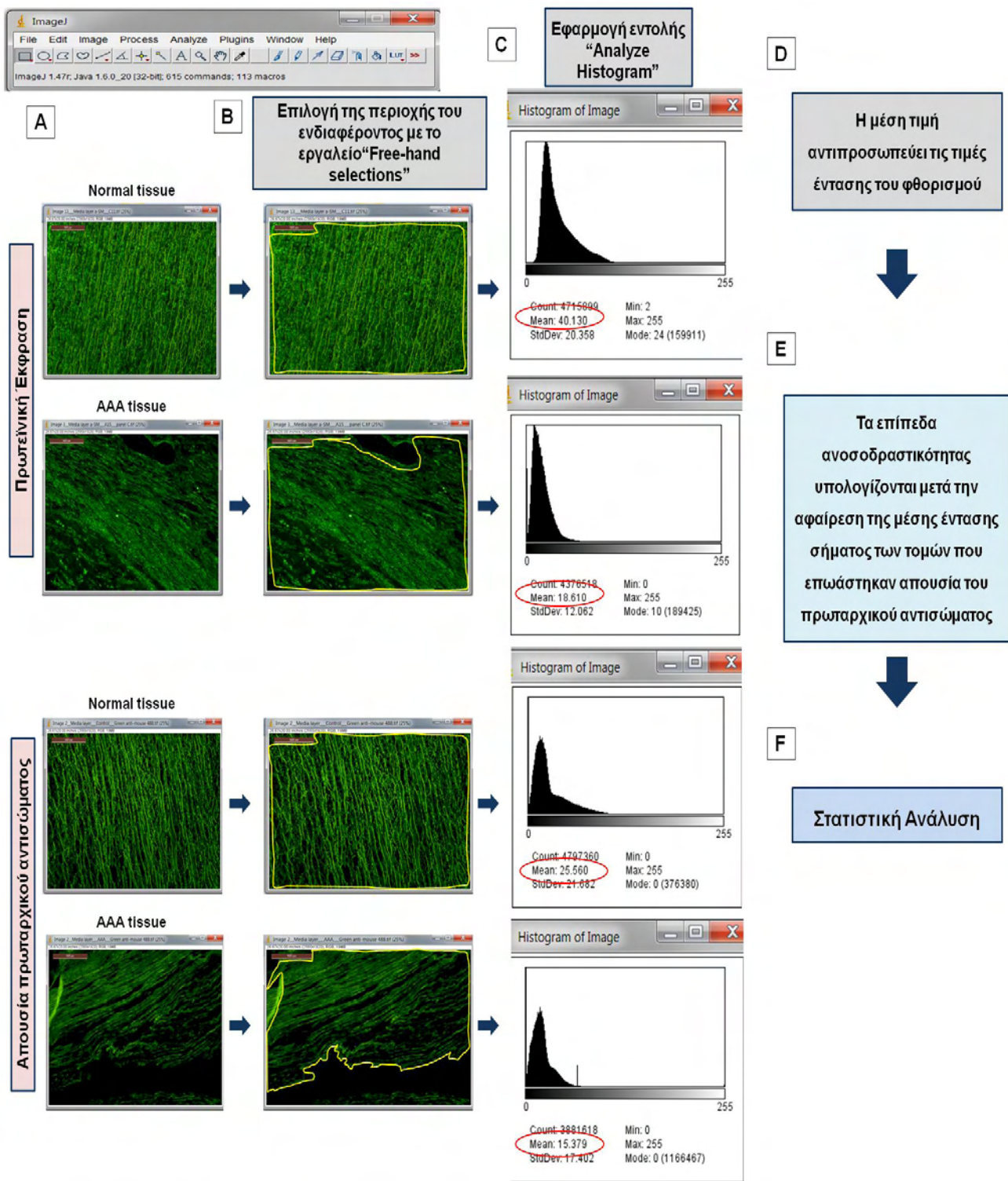
B.1.12 Ανάλυση και επεξεργασία εικόνων μικροσκοπίου

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων αναλύθηκαν από κάθε δείγμα τρεις με τέσσερις διαφορετικές διαδοχικές τομές και οι εικόνες για το κάθε ένα αντίσωμα ελήφθησαν σε διαφορετικό χρόνο έκθεσης (Πίνακας 7). Ο χρόνος έκθεσης για κάθε διαφορετικό αντίσωμα εφαρμόστηκε με τον ίδιο τρόπο σε όλα τα δείγματα αορτικών τομών ανευρυσματικής, φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής συμπεριλαμβανομένων και των αρνητικών μαρτύρων προκειμένου να διασφαλιστεί η ποιότητα των αποτελεσμάτων.

Πίνακας 7: Αναλυτικά στοιχεία του χρόνου έκθεσης που χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη των εικόνων φθορισμού σε μικροσκόπιο Zeiss Axioskop.

Αντίσωμα	Χρόνος έκθεσης (δευτερόλεπτα, sec)	Αντίσωμα	Χρόνος έκθεσης (δευτερόλεπτα, sec)
LXRα	1.5sec	α-SM	408.9sec
ABCA1	1.5sec	Vimentin	547.8sec
ΑροΑΙ	1.0sec	CD68	809.5sec

Η ανάλυση και επεξεργασία των εικόνων μικροσκοπίου (RGB εικόνες) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος Image J programme (1.47r, Wayne Rasband National Institutes of Health, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>). Αρχικά με το εργαλείο επιλογής ελεύθερης σχεδίασης (freehand selection tool) επιλέχθηκε η περιοχή του ενδιαφέροντός μας, η οποία περιελάμβανε το μεσαίο χιτώνα (media layer) όλων των υπό μελέτη ιστών, καθώς επίσης και τον έσω χιτώνα (intima layer) των παθολογικών ιστών (ανευρυσματική και αθηρωματική μη ανευρυσματική κοιλιακή αρτηρία). Στη συνέχεια από την επιλεγμένη περιοχή, υπολογίζεται η ένταση του φθορισμού με τη χρήση της εντολής Analyze/Histogram". Η μέση τιμή που προκύπτει από την παραπάνω διαδικασία αντιπροσωπεύει τις τιμές έντασης του φθορισμού οι οποίες αποτελούν ακέραιους αριθμούς μιας κλίμακας με τιμές από το 0 έως το 255. Το 0 αντιστοιχεί στην ελάχιστη, ενώ το 255 στη μέγιστη φωτεινότητα που μπορεί να έχει η ένταση του φθορισμού. Η παραπάνω διαδικασία εφαρμόζεται με τον ίδιο τρόπο σε όλα τα δείγματα αορτικών τομών συμπεριλαμβανομένων και των αρνητικών μαρτύρων (Εικόνα 29). Η αξιολόγηση της έντασης του φθορισμού σε κάθε δείγμα αντιπροσωπεύει τα επίπεδα ανοσοδραστικότητας για κάθε αντίσωμα (Immunoreactivity levels, IR) τα οποία αντικατοπτρίζουν τα επίπεδα έκφρασης της αντίστοιχης πρωτεΐνης στους ιστούς.



Εικόνα 29: Διαδικασία ανάλυσης και επεξεργασίας των εικόνων μικροσκοπίου.

B.1.13 Αποσιώπηση της έκφρασης γονιδίων με τη χρήση της τεχνολογίας των μικρών μη κωδικών αλληλουχιών RNA (microRNAs).

Οι μικρές μη κωδικές αλληλουχίες RNA (microRNAs) προκαλούν επιλεκτική αναστολή της έκφρασης γονιδίων καθιστώντας τα microRNA μόρια με σημαντικό ρόλο στην παθογένεια νοσημάτων. Συγκεκριμένα τα microRNAs είναι αλληλουχίες RNA μήκους 20-24 νουκλεοτιδίων τα οποία ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση μεταμεταγραφικά. Τα ώριμα microRNAs είναι συμπληρωματικά με περισσότερα του ενός mRNA γονιδίων και η συμπληρωματικότητα αυτή παρατηρείται στην πλειοψηφία της στην 3'-αμετάφραση περιοχή των mRNA-στόχων, ενώ πιο σπάνια συναντάται στην 5'-αμετάφραση περιοχή τους ή σε κωδικοποιούσες περιοχές. Στην περίπτωση της πλήρους συμπληρωματικότητας παρατηρείται άμεση αποδόμηση των πρωτεϊνών, ενώ η μερική συμπληρωματικότητα εμποδίζει τη μετάφρασή τους σε ώριμες πρωτεΐνες. Ο ρόλος των microRNA στην εκδήλωση νοσημάτων έχει μελετηθεί με πειράματα επιμόλυνσης των κυττάρων είτε με χρήση εξωγενών μορίων microRNA, είτε με χρήση αναστολέων τους, η οποία πραγματοποιείται με τη βοήθεια κατάλληλων φορέων ή λιποσωμάτων. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η λιποφεκταμίνη ως μόρο μεταφοράς του αναστολέα του υπό μελέτη microRNA. Πρόκειται για μία λιπιδιακή κατιονικά δομή η οποία παρέχει υψηλή αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης σε ποικιλία κυτταρικών σειρών.

Υλικά

- Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK)
- Θρεπτικό υλικό DMEM/F-12 χωρίς την προσθήκη FBS και αντιβιοτικών
- antagomir-10b (anti-miR-10b) (5' UACCCUGUAGAA) (Qiagen)

Πειραματική Διαδικασία

Μία ημέρα πριν γίνει η επιμόλυνση των ανευρυσματικών λείων μυϊκών κυττάρων (ΛΜΚ) με το anti-miR-10b, τα κύτταρα τα οποία έχουν καλλιεργηθεί με τη μέθοδο που έχει περιγραφεί, μεταφέρονται σε πλάκα 6 θέσεων και προστίθενται 2ml θρεπτικού υλικού DMEM/F χωρίς προσθήκη FBS και αντιβιοτικών. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων υπό στείρες συνθήκες σε κλίβανο για 24 ώρες (37 °C, 5% CO₂). Τα κύτταρα 3 θέσεων χρησιμοποιήθηκαν ως δείγμα ελέγχου (δεν προστέθηκε ποσότητα microRNA), ενώ στα κύτταρα των άλλων 3 θέσεων έγινε επιμόλυνση με anti-miR-10b για την αποσιώπηση του γονιδίου. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν προκειμένου να διαπιστωθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τριών τιμών. Η συγκέντρωση του anti-miR-10b που

χρησιμοποιήθηκε ήταν 100 nmol/lit και η χορήγησή του διήρκεσε 48 ώρες.

Αναλυτικότερα η διαδικασία έχει:

- Προσθήκη 5 μl λιποφεκταμίνης σε 495 μl DMEM/F χωρίς να περιέχει FBS και αντιβιοτικά. Καλή ανάδευση
- Προσθήκη 5 μl anti-miR-10b σε 495 μl DMEM/F χωρίς να περιέχει FBS και αντιβιοτικά. Καλή ανάδευση
- Επώαση των δύο παραπάνω διαλυμάτων για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Ανάμειξη του διαλύματος της λιποφεκταμίνης με αυτό του anti-miR-10b. Καλή ανάδευση και επώαση του μίγματος για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού από τις θέσεις της πλάκας και ξέπλυμα με PBS (δύο φορές)
- Μεταφορά 1 ml σε κάθε θέση του μίγματος λιποφεκταμίνη / anti-miR-10b, ενώ στις θέσεις που χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου προστέθηκε μόνο 1 ml DMEM/F χωρίς FBS και αντιβιοτικά.
- Με το πέρας του κάθε χρονικού διαστήματος ακολούθησε συλλογή των κυττάρων και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA και πρωτεϊνών με τις μεθόδους που περιγράφηκαν προηγουμένως.

B.1.14 Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα GraphPad έκδοση 4 (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). Αναφορικά με τα δεδομένα που προήλθαν από τα πειράματα ανοσοϊστοχημείας φθορισμού, τα επίπεδα της έκαστης ανοσοδραστικότητας υπολογίστηκαν μετά από αφαίρεση της μέσης έντασης φθορισμού των τομών που επώαστηκαν απουσία του πρωταρχικού αντισώματος (αρνητικοί μάρτυρες) προκειμένου να αφαιρεθεί πιθανό σήμα το οποίο προέρχεται από μη ειδική δέσμευση των πρώτων αντισωμάτων ή από πιθανό αυτό-φθορισμό.

Η στατιστική ανάλυση όλων των πειραματικών δεδομένων μεταξύ τριών ομάδων έγινε με ανάλυση διακύμανσης one-way ANOVA και μη παραμετρική ανάλυση διακύμανσης (έλεγχος Kruskal-Wallis) ακολουθούμενες από μετα-ανάλυση με το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni και Dunn αντιστοίχως, ενώ ο έλεγχος unpaired t-test χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση μεταξύ δύο ομάδων. Τα αποτελέσματα των πειραματικών δεδομένων παρουσιάζονται ως μέσες τιμές με το τυπικό σφάλμα (mean \pm standard error of the mean, SEM). Σε όλες τις περιπτώσεις ως όριο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε η τιμή $P < 0.05$.

B.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

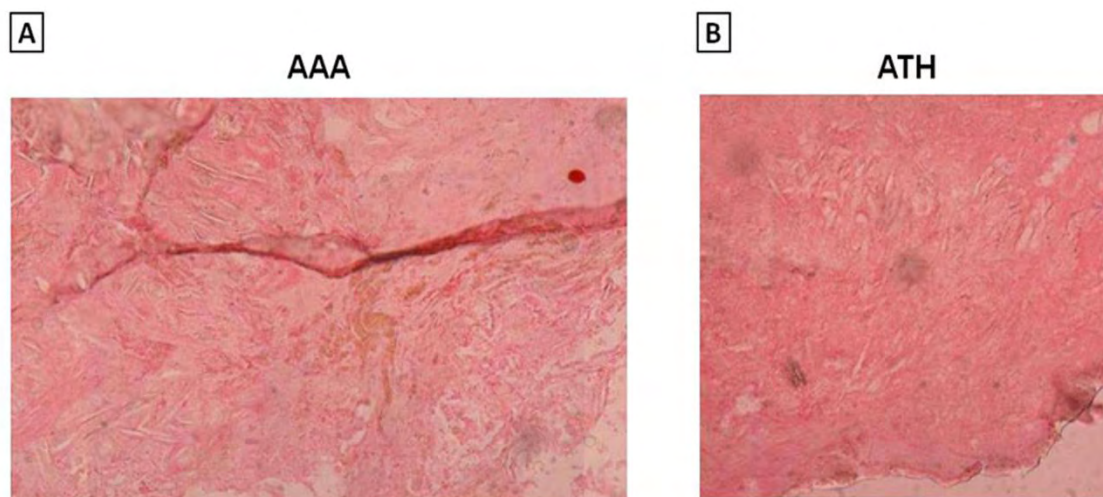
B.2.1 Ιστολογική ανάλυση δειγμάτων ανευρυσματικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής

Οι τομές ανευρυσματικής (AAA) και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής (ATH) κοιλιακής αορτής υπεβλήθησαν σε χρώση Αιματοξυλίνης και Ηωσίνης προκειμένου να μελετηθούν μικροσκοπικά για την παρουσία αθηρωματικών βλαβών. Η εκτίμηση του βαθμού των αθηρωματικών αλλοιώσεων πραγματοποιήθηκε από ειδικό παθολογοανατόμο σύμφωνα με τα κριτήρια της Αμερικανικής Ένωσης Καρδιολογίας (American Heart Association) (Πίνακας 8) [131,238]

Πίνακας 8: Κριτήρια ταξινόμησης αθηρωματικών πλακών σύμφωνα με την Αμερικανική Ένωση Καρδιολογίας.

Τύπος	Γνωρίσματα	Χαρακτηρισμός
I	Αρχική βλάβη <ul style="list-style-type: none">▪ Αυξημένος αριθμός μακροφάγων▪ Μεμονωμένα λιπώδη μακροφάγα (αφρώδη κύτταρα)	Πρώιμη αλλοίωση
II	Ανάπτυξη λιπωδών γραμμώσεων <ul style="list-style-type: none">▪ Συσσώρευση αφρωδών κυττάρων	Πρώιμη αλλοίωση
III	Προ-αθήρωμα <ul style="list-style-type: none">▪ Εξωκυττάρια συσσώρευση λίπους μεταξύ λείων μυϊκών κυττάρων	Ενδιάμεση αλλοίωση
IV	Αθήρωμα <ul style="list-style-type: none">▪ Εξωκυττάρια συσσώρευση λιπιδίων στον υποενδοθηλιακό χώρο▪ Σαφώς καθορισμένος λιπιδικός πυρήνας▪ Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία πλούσια σε πρωτεογλυκάνες, λεμφοκύτταρα, μακροφάγα και αφρώδη κύτταρα	Προχωρημένη αλλοίωση
V	Ινωδοαθήρωμα Κατηγοριοποιείται σε τρεις υποομάδες: <ul style="list-style-type: none">▪ Πλάκα με λιπώδη πυρήνα και παχύ ινώδη χιτώνα (Va)▪ Μεγάλος βαθμός επασβεστοποίησης (Vb)▪ Εκτεταμένη ίνωση (Vc)	Προχωρημένη αλλοίωση
VI	Περίπλοκη αθηρωματική βλάβη <ul style="list-style-type: none">▪ Ενδοτοιχωματική αιμορραγία▪ Εντοπισμένη εναπόθεση θρόμβου	Προχωρημένη αλλοίωση

Τα αποτελέσματα της ιστολογικής ανάλυσης υπέδειξαν ότι τα δείγματα της ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής χαρακτηρίζονταν από προχωρημένες αθηρωματικές αλλοιώσεις με ενδοτοιχωματική αιμορραγία και ως εκ τούτου εντάσσονταν στην κατηγορία των αθηρωματικών βλαβών τύπου VI (Εικόνα 30Α). Αντίθετα, τα δείγματα αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής χαρακτηρίζονταν από πιο ήπιες αθηρωματικές αλλοιώσεις της κατηγορίας τύπου IV (αθήρωμα), ενώ επίσης παρουσίαζαν και πάχυνση του μέσου χιτώνα (Εικόνα 30Β).

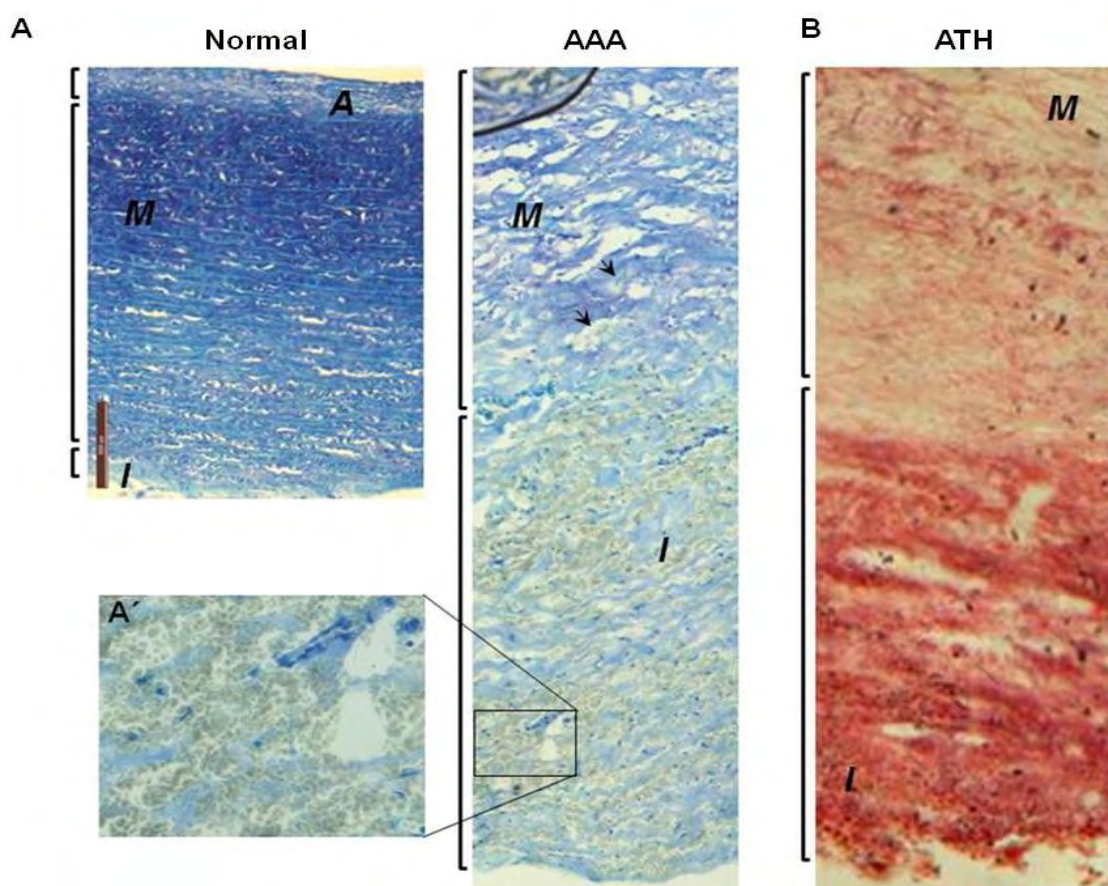


Εικόνα 30: Αντιπροσωπευτικές εικόνες της χρώσης αιματοξυλίνης-ηωσίνης για την εκτίμηση των αθηρωματικών αλλοιώσεων σε τομές αορτικού τοιχώματος (Α) ανευρυσματικής (AAA) και (Β) αθηρωματικής μη ανευρυσματικής (ATH) κοιλιακής αορτής. Μεγέθυνση φωτομικρογραφιών 10x.

B.2.2 Συσσώρευση λιπιδίων στο τοίχωμα ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής

Βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι ο μεταβολισμός των λιπιδίων πιθανώς σχετίζεται με την παρουσία και ανάπτυξη ανευρύσματος κοιλιακής αορτής (ΑΚΑ). Οι μελέτες αυτές σε συνδυασμό με τα ανωτέρω ευρήματα της ιστολογικής ανάλυσης, μας παρακίνησε να διερευνήσουμε το ενδεχόμενο συσσώρευσης λιπιδίων στο τοίχωμα αορτής με ΑΚΑ. Επιπροσθέτως έρευνες υποδεικνύουν ότι η παρουσία αθηρωματικής πλάκας αποτελεί συχνό εύρημα του ανευρυσματικού αορτικού τοιχώματος. Δεδομένου ότι οι διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της αθηρωμάτωσης, στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αθηρωματικής μη ανευρυσματικής αορτής (ATH) ως θετικό δείγμα ελέγχου για τα πειράματα συσσώρευσης λιπιδίων.

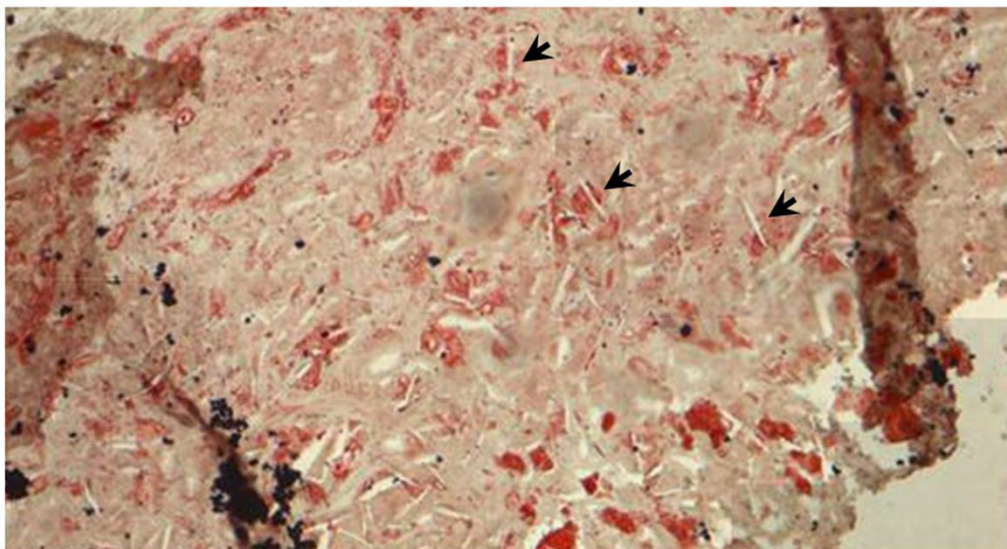
Η χρώση των τομών ανευρυσματικής (AAA) και φυσιολογικής (Normal) κοιλιακής αορτής με το κυανό της τολουιδίνης (Toluidine Blue O, TBO) έδειξε ότι τα λιπίδια συσσωρεύονται στο αορτικό τοίχωμα κοιλιακής αορτής με ΑΚΑ, ενώ το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρήθηκε στα δείγματα φυσιολογικής κοιλιακής αορτής. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν μεγάλου βαθμού εναποθέσεις λιπιδίων στον έσω χιτώνα της ανευρυσματικής αορτής καθώς επίσης συσσώρευση αυτών σε μικρότερο βαθμό στο μεσαίο χιτώνα αυτής (Εικόνα 31Α-Α'). Η συσσώρευση λιπιδίων στο αορτικό τοίχωμα της ανευρυσματικής αορτής ακολουθεί το μοτίβο της αθηρωματικής νόσου όπως φαίνεται από τη χρώση των τομών αθηρωματικής μη ανευρυσματικής αορτής με τη χρωστική Oil Red O (Εικόνα 31Β).



Εικόνα 31: (Α) Αντιπροσωπευτικές εικόνες της χρώσης κυανού της τολουιδίνης σε τομές αορτικού τοιχώματος φυσιολογικής (Normal) και ανευρυσματικής (AAA) κοιλιακής αορτής. Πυκνή λιπιδιακή συσσώρευση (σκούρο πράσινο χρώμα) στον έσω χιτώνα (Α' , μεγέθυνση 40x) και σε μικρότερο βαθμό (μαύρα βέλη) στο μεσαίο χιτώνα των AAA ιστών. (Β) Φωτομικρογραφία της χρώσης Oil Red O σε τομές αθηρωματικής μη ανευρυσματικής (ΑΤΗ) κοιλιακής αορτής. Οι αγκύλες αντιπροσωπεύουν τα όρια των αορτικών χιτώνων όπου: Α: *Adventitia*, έξω χιτώνας, Μ: *Media*, μεσαίος χιτώνας, Ι: *Intima*, έσω χιτώνας. Μεγέθυνση όλων των φωτομικρογραφιών 10x.

Επιπλέον χρώση των τομών ανευρυσματικής κοιλιακής αρτηίας με τη λιπόφιλη χρωστική Oil Red O έδειξε την παρουσία κρυστάλλων χοληστερόλης στον έσω χιτώνα του αορτικού τοιχώματος αυτής (Εικόνα 32).

AAA



Εικόνα 32: Αντιπροσωπευτική φωτομικρογραφία του έσω χιτώνα ανευρυσματικής (AAA) κοιλιακής αρτηίας μετά από χρώση Oil Red O όπου φαίνεται η παρουσία κρυστάλλων χοληστερόλης (μαύρα βέλη). Μεγέθυνση φωτομικρογραφιάς 10x.

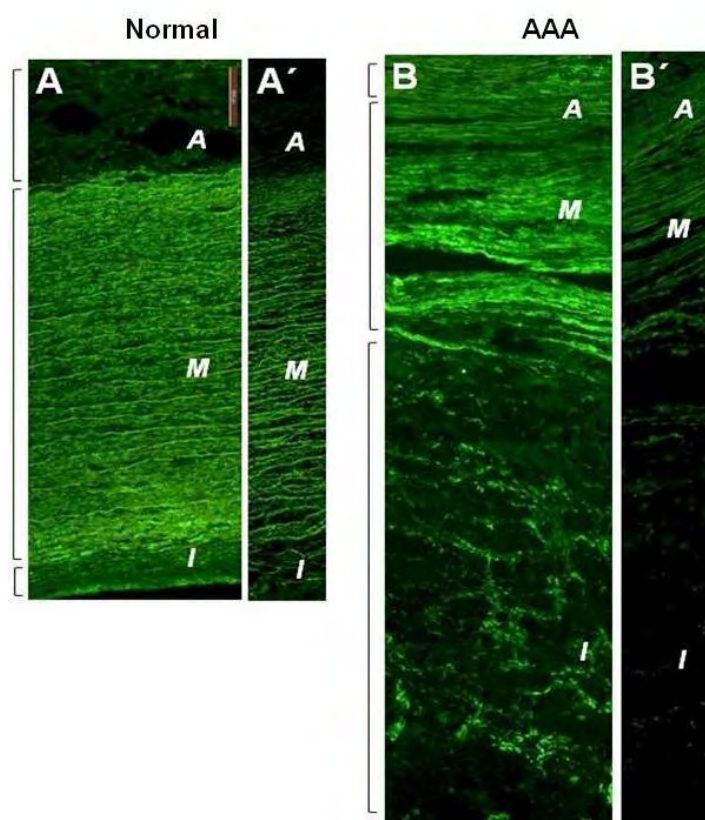
B.2.3 Παρουσία αφρώδων κυττάρων στο τοίχωμα ανευρυσματικής κοιλιακής αρτηίας

Η συσσώρευση λιπιδίων στα τοιχώματα των αγγείων σχετίζεται με την εναπόθεση λιπιδίων εντός των κυττάρων και κατ' επέκταση τη μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα. Στην πλειονότητά τους τα κύτταρα αυτά προέρχονται από μακροφάγα, ενώ τα τελευταία χρόνια έχει αναφερθεί και η μετατροπή λείων μυϊκών κυττάρων που εντοπίζονται στο μεσαίο και έσω χιτώνα αθηρωματικής αρτηίας σε αφρώδη κύτταρα. Τα ευρήματά μας αναφορικά με τη συσσώρευση λιπιδίων στο τοίχωμα αρτηίας με ΑΚΑ μας παρακίνησαν να διερευνήσουμε επιπλέον και την παρουσία αφρώδων κυττάρων σε αυτό.

B.2.3.1 Εντοπισμός των λείων μυϊκών κυττάρων στο αορτικό τοίχωμα ανευρυσματικής και φυσιολογικής κοιλιακής αρτηίας

Κατ' αρχάς θέλαμε να προσδιορίσουμε τη θέση των λείων μυϊκών κυττάρων (ΛΜΚ) πάνω στο αορτικό τοίχωμα. Για το σκοπό αυτό προχωρήσαμε σε

ανοσοϊστοχημική ανίχνευση φθορισμού της α -ακτίνης λείου μυϊκού τύπου (α -smooth muscle actin, α -SM) χαρακτηριστικής πρωτεΐνης του κυτταροσκελετού των ΛΜΚ σε τομές ανευρυσματικής και φυσιολογικής κοιλιακής αορτής και παρατηρήθηκε, όπως αναμενόταν, παρουσία ανοσοδραστικότητας στο μεσαίο χιτώνα των υπό μελέτη ιστών (Εικόνα 33), καθώς επίσης και στον έσω χιτώνα της ανευρυσματικής αορτής.

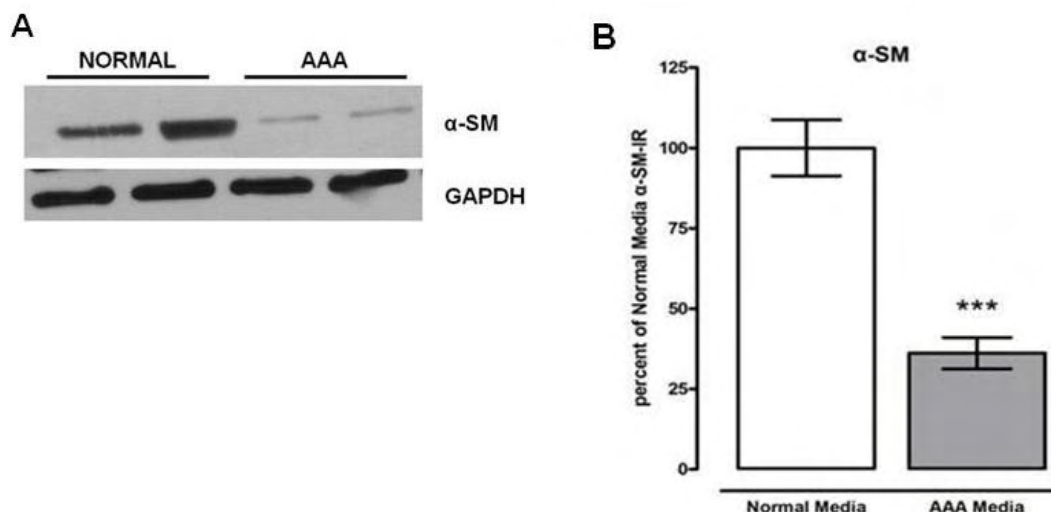


Εικόνα 33: Αντιπροσωπευτικές εικόνες της ανοσοανίχνευσης της α -SM με φθορισμό σε τομές αορτικού τοιχώματος φυσιολογικής (Normal) (A) και ανευρυσματικής (AAA) (B) κοιλιακής αορτής. (A'-B') Τομές ως αρνητικοί μάρτυρες του μη-ειδικού φθορισμού ή αυτοφθορισμού των ινών ελαστίνης. Οι αγκύλες αντιπροσωπεύουν τα όρια των αορτικών χιτώνων όπου: A: *Adventitia*, έξω χιτώνας, M: *Media*, μεσαίος χιτώνας, I: *Intima*, έσω χιτώνας. Μεγέθυνση όλων των φωτομικρογραφιών 10x.

Επιπλέον τα επίπεδα έκφρασης της α -SM βρέθηκαν μειωμένα σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα του υποενδοθηλιακού χώρου¹ (έσω και μεσαίος χιτώνας) της ανευρυσματικής αορτής συγκριτικά με της φυσιολογικής, όπως υποδεικνύεται από την τεχνική Western blot (Εικόνα 34A). Τα μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα της α -SM

¹ Υπενθυμίζεται ότι ο έσω και μεσαίος χιτώνας δεν μπορούσε να διαχωριστεί στην ανευρυσματική αορτή, λόγω παρουσίας αθηρωματικών αλλοιώσεων, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιηθεί ως ενιαίο σύνολο (υποενδοθηλιακός χώρος) στη μελέτη των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης της α -SM.

που παρατηρήθηκαν στο ΑΚΑ επιβεβαιώθηκαν και με ποσοτικό προσδιορισμό της α-SM-ανοσοδραστικότητας όπου παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα αυτής στο μεσαίο χιτώνα της ανευρυσματικής συγκριτικά με της φυσιολογικής αορτής ($P < 0.001$) (Εικόνα 34B).



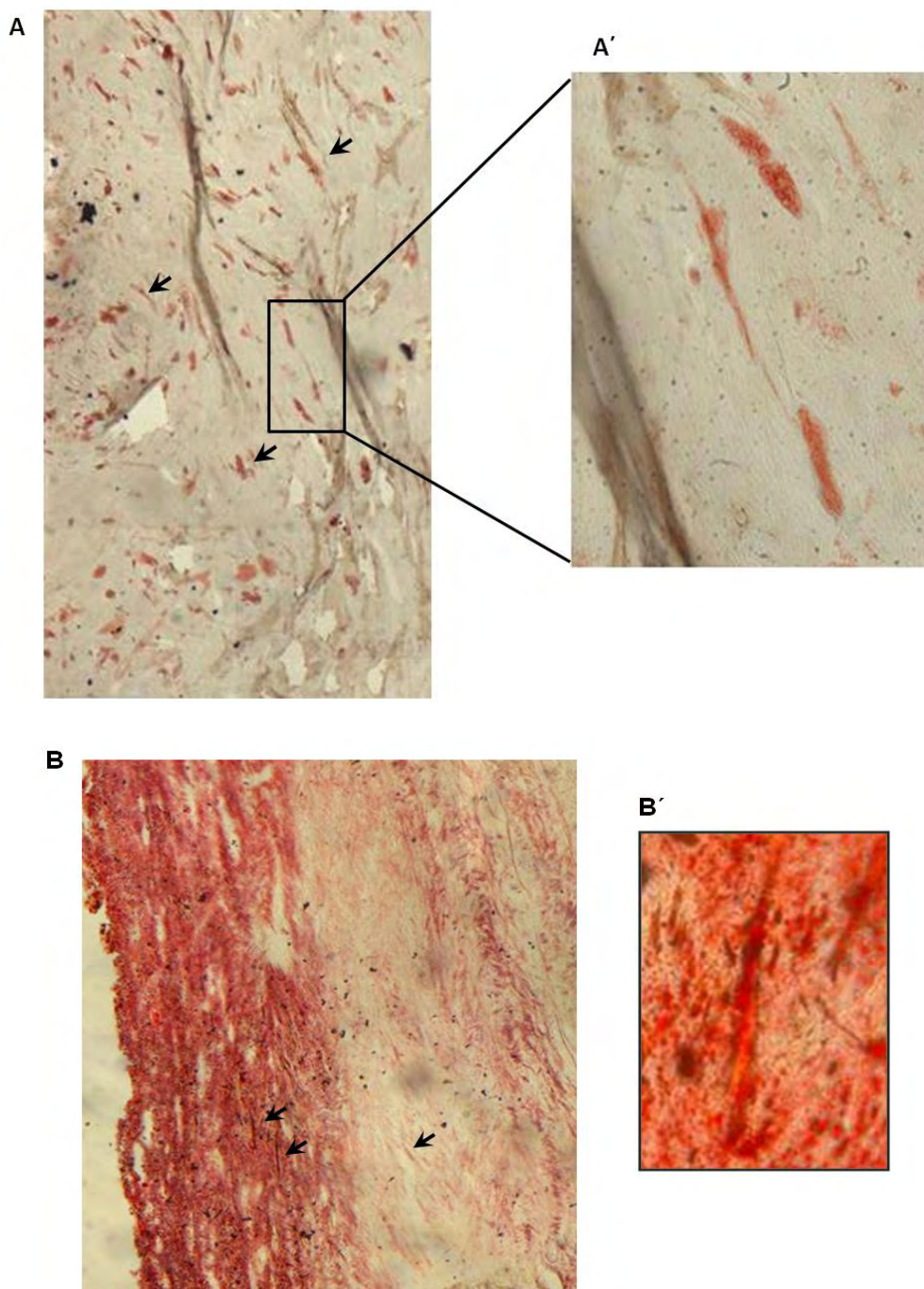
Εικόνα 34: (A) Απεικόνιση της πρωτεϊνικής έκφρασης της α-SM στον υποενδοθηλιακό χώρο ανευρυσματικής (AAA) και φυσιολογικής (Normal) αορτής. Τα επίπεδα πρωτεΐνης είναι ομαλοποιημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH. (B) Ποσοτική απεικόνιση της α-SM-ανοσοδραστικότητας στο μεσαίο χιτώνα (AAA media) ανευρυσματικής και φυσιολογικής (Normal media) κοιλιακής αορτής. *** $P < 0.001$. Τα επίπεδα της ανοσοδραστικότητας είναι ομαλοποιημένα ως προς την ανοσοδραστικότητα του φυσιολογικού μεσαίου χιτώνα.

B.2.3.2 Παρουσία αφρώδων κυττάρων προερχόμενων από λεία μυϊκά κύτταρα στο τοίχωμα ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής

Τα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι λεία μυϊκά κύτταρα (ΛΜΚ) που έχουν μετατραπεί σε αφρώδη παρουσιάζουν μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της χαρακτηριστικής τους πρωτεΐνης, της α-ακτίνης λείου μυϊκού τύπου (α-smooth muscle actin, α-SM). Βασισμένοι στα προηγούμενα αποτελέσματά μας σχετικά με την έκφραση της α-ακτίνης στο τοίχωμα αορτής με ΑΚΑ, θελήσαμε να διερευνήσουμε περαιτέρω αν τα μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα αυτής συνδέονται με τη μετατροπή ΛΜΚ σε αφρώδη κύτταρα στο ΑΚΑ.

Ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της α-ακτίνης λείου μυϊκού τύπου με επακόλουθη χρώση Oil Red O έδειξε την παρουσία αφρώδων κυττάρων προερχόμενων από ΛΜΚ στο τοίχωμα της ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής. Συγκεκριμένα, όπως και στην αθηρωματική μη ανευρυσματική κοιλιακή αορτή, παρατηρήθηκε σημαντική

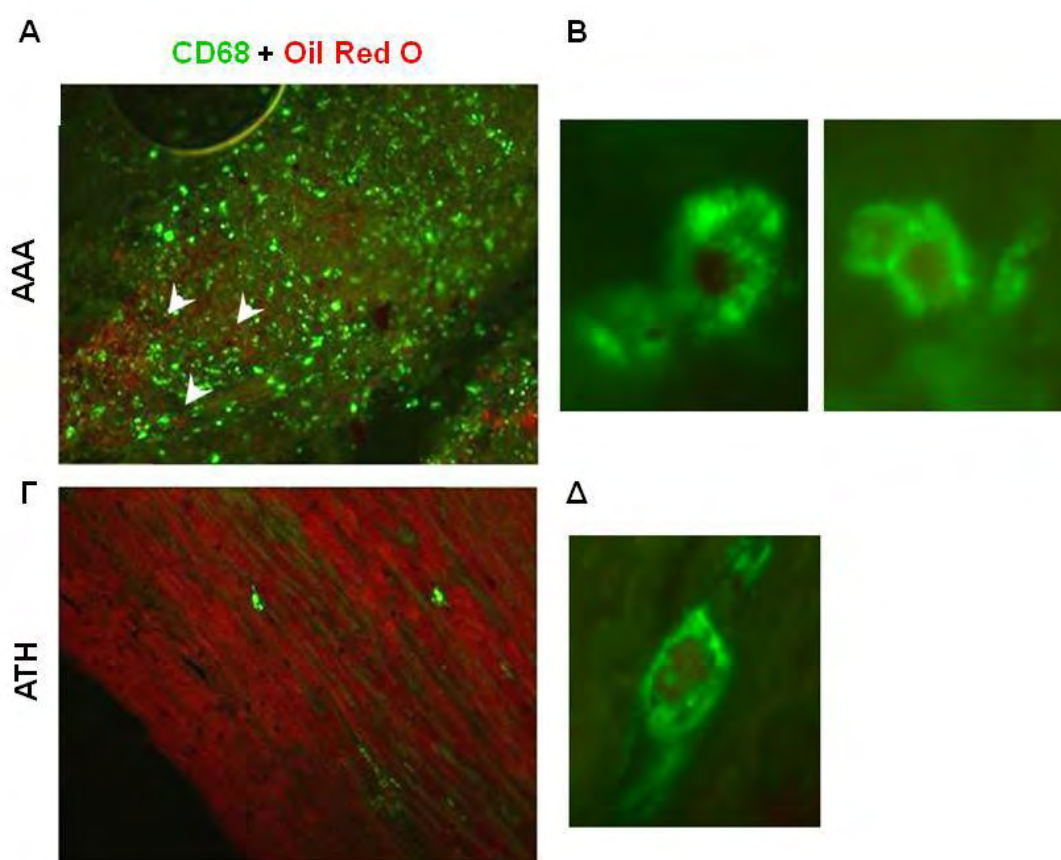
ενδοκυττάρια συσσώρευση λιπιδίων σε ΛΜΚ που εντοπίζονται στον έσω και μέσο χιτώνα της ανευρυσματικής αορτής (Εικόνα 35).



Εικόνα 35: Αντιπροσωπευτικές εικόνες της ανοσοϊστοχημικής ανίχνευσης της α-ακτίνης των λείων μυϊκών κυττάρων (ΛΜΚ) με επακόλουθη χρώση Oil Red O σε τομές αορτικού τοιχώματος (A) ανευρυσματικής (AAA) και (B) αθηρωματικής μη ανευρυσματικής (ATH) κοιλιακής αορτής. Μεγέθυνση φωτομικρογραφιών 10x. Παρατηρείται σημαντική συσσώρευση λιπιδίων (μαύρα βέλη) ενδοκυττάρια των ΛΜΚ στους AAA (A', 40x μεγέθυνση) και ATH (B', 40x μεγέθυνση) ιστούς.

B.2.3.3 Παρουσία αφρωδών κυττάρων προερχόμενα από μακροφάγα στο τοίχωμα ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής

Η παρουσία αφρωδών κυττάρων επιβεβαιώθηκε περαιτέρω με την τεχνική ανοσοϊστοχημείας φθορισμού χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της CD68, πρωτεΐνης χαρακτηριστικής των μακροφάγων και επακόλουθη χρώση με Oil Red O. Παρατηρήθηκε μεγάλος αριθμός μακροφάγων-αφρωδών κυττάρων στο τοίχωμα αορτής με ΑΚΑ, όπως και στους αθηρωματικούς ιστούς, όπως φαίνεται από τις εναποθέσεις μεγάλου αριθμού σταγονιδίων λίπους στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων (Εικόνα 36).

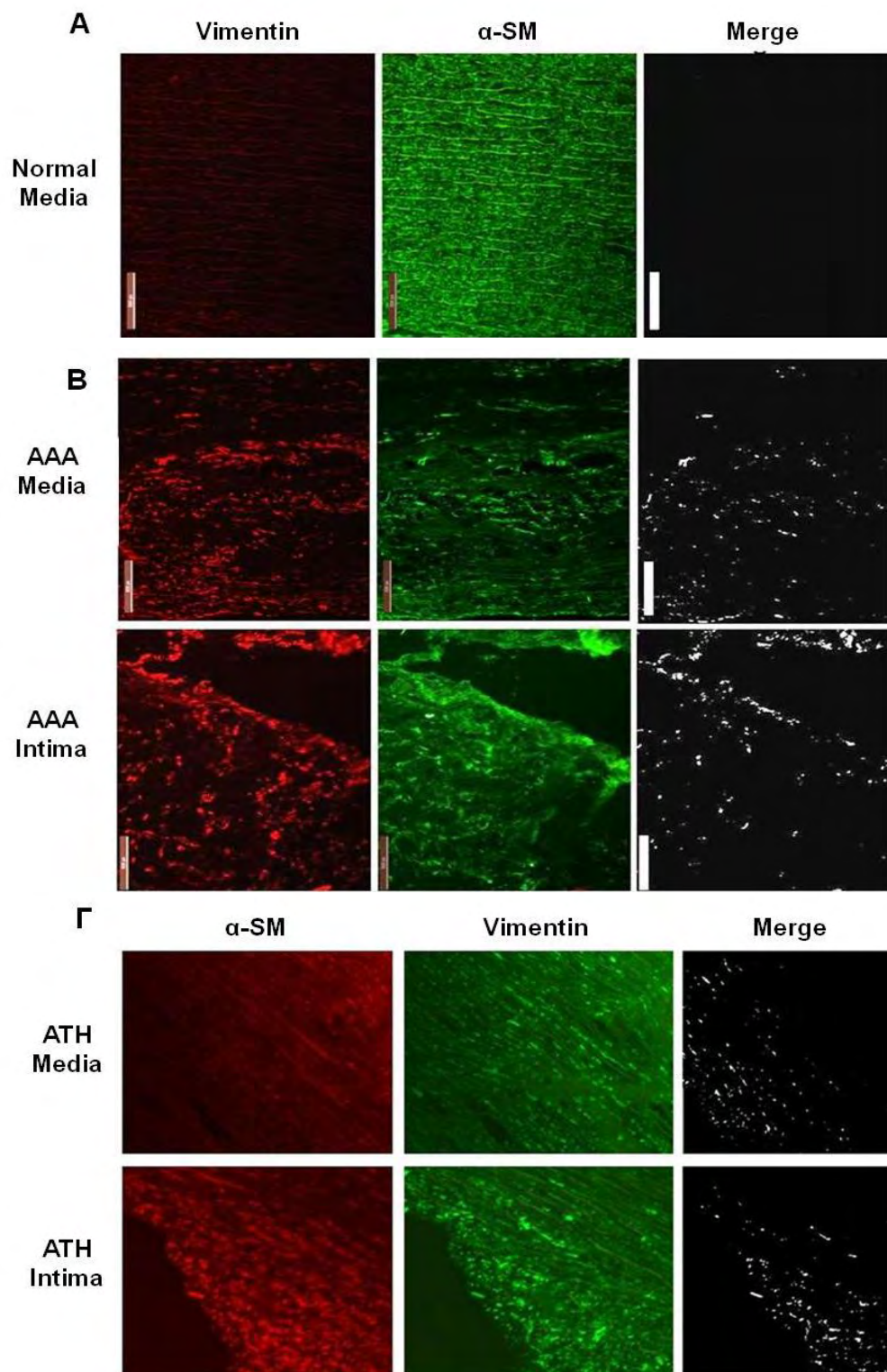


Εικόνα 36: Αντιπροσωπευτικές εικόνες της ανοσοϊστοχημικής ανίχνευσης με φθορισμό της CD68 πρωτεΐνης των μακροφάγων με επακόλουθη χρώση Oil Red O σε τομές αορτικού τοιχώματος (Α) ανευρυσματικής (ΑΑΑ) και (Γ) αθηρωματικής μη ανευρυσματικής (ΑΤΗ) κοιλιακής αορτής. Μεγέθυνση φωτομικρογραφιών 10x. Παρατηρείται σημαντική συσσώρευση λιπιδίων (άσπρα βέλη) ενδοκυττάρια των μακροφάγων στους ΑΑΑ (Β, 40x μεγέθυνση) και ΑΤΗ (Δ, 40x μεγέθυνση) ιστούς.

B.2.4 Φαινότυπος των λείων μυϊκών κυττάρων στο αορτικό τοίχωμα ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής

Μελέτες υποστηρίζουν ότι η συσσώρευση λιπιδίων εντός των λείων μυϊκών κυττάρων (ΛΜΚ) υποδεικνύει τη φαινοτυπική τους διαφοροποίηση από το συσταλτικό στο συνθετικό φαινότυπο. Ορμώμενοι από τα ευρήματά μας σχετικά με την παρουσία αφρωδών κυττάρων από ΛΜΚ στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής, θελήσαμε να προσδιορίσουμε το φαινότυπο αυτών στο τοίχωμα φυσιολογικής και ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε **με ανοσοϊστοχημική ανίχνευση φθορισμού με διπλή σήμανση χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι της α-ακτίνης λείου μυϊκού τύπου (α-smooth muscle actin, α-SM)**, η οποία αποτελεί το βασικότερο δείκτη του συσταλτικού φαινοτύπου των ΛΜΚ καθώς και της **βιμεντίνης (vimentin)**, χαρακτηριστικού πρωτεϊνικού δείκτη του συνθετικού φαινοτύπου των ΛΜΚ.

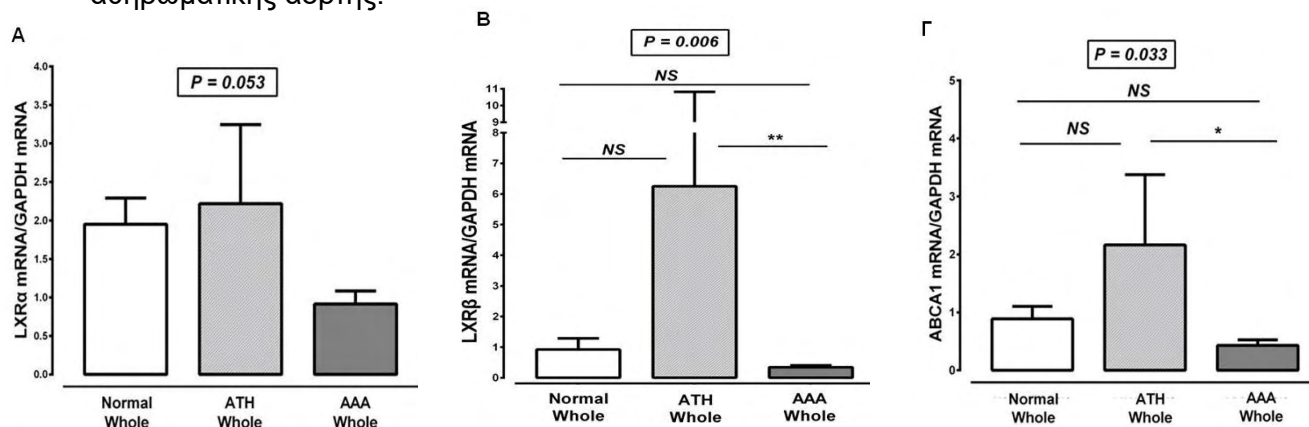
Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε στο μεσαίο χιτώνα της φυσιολογικής αορτής (Normal media) ανοσοδραστικότητα της α-SM και απουσία έκφρασης της βιμεντίνης (Εικόνα 37A). Αντιθέτως στην ανευρυσματική αορτή παρατηρήθηκε παρουσία ανοσοδραστικότητας και των δύο πρωτεϊνών. Αναλυτικότερα υπήρχε μεγάλος αριθμός ΛΜΚ που εντοπίζονται στον έσω (AAA intima) και μεσαίο (AAA media) χιτώνα, όπως υποδεικνύεται από τη παρουσία της α-SM-ανοσοδραστικότητας, τα οποία παρουσίαζαν συγχρόνως ανοσοδραστικότητα βιμεντίνης (Εικόνα 37B. Τα αποτελέσματα μας στην ανευρυσματική αορτή, όσο αφορά στην ανοσοδραστικότητα της α-SM και βιμεντίνης, είναι παρεμφερή με αυτά στους ιστούς της αθηρωματικής μη ανευρυσματικής αορτής, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν ως θετικό δείγμα έλεγχου, δεδομένου ότι η φαινοτυπική διαφοροποίηση των ΛΜΚ στην αθηρωμάτωση είναι καλά χαρακτηρισμένη (Εικόνα 37Γ).



Εικόνα 37: Αντιπροσωπευτικές εικόνες της διπλής ανοσοανίχνευσης με φθορισμό της α -ακτίνης λείου μυϊκού τύπου (α -SM) και της βιμεντίνης (vimentin) στο μεσαίο χιτώνα της φυσιολογικής (Normal Media) (A), ανευρυσματικής (AAA Media) (B) και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής (ATH Media) κοιλιακής αορτής, καθώς και στον έσω χιτώνα ανευρυσματικής (AAA Intima) και αθηρωματικής (ATH Intima) αορτής. Η τρίτη στήλη παρουσιάζει τα σημεία (άσπρες κουκίδες) στα οποία η ανοσοανίχνευση των δύο πρωτεϊνών συνεντοπίζεται.

B.2.5 Μελέτη της μεταγραφικής έκφρασης των γονιδίων LXRα, LXRβ και ABCA1 στο σύνολο του αορτικού τοιχώματος ανευρυσματικής, φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής

Τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα σχετικά με την εναπόθεση λιπιδίων και την παρουσία αφρωδών κυττάρων στο τοίχωμα αορτής με ΑΚΑ υποδηλώνουν διαταραχή του μηχανισμού εξόδου της χοληστερόλης. Προκειμένου να διαπιστωθεί η συμμετοχή των γονιδίων που συμμετέχουν στο μηχανισμό εκροής της χοληστερόλης, διερευνήθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των δύο υποτύπων του πυρηνικού υποδοχέα Liver X Receptor (LXR), LXRα και LXRβ, καθώς και του γονιδίου-στόχου του LXR, της ATP-binding cassette transporter (ABCA1). Αρχικά μελετήσαμε τα επίπεδα mRNA των ανωτέρω γονιδίων σε ολόκληρο το αορτικό τοίχωμα ανευρυσματικής (AAA-Whole), φυσιολογικής (Normal-Whole) και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής (ATH-Whole) κοιλιακής αορτής. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν με τη μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου έδειξαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές όσο αφορά στα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων LXRβ ($P = 0.006$) και ABCA1 ($P = 0.033$) μεταξύ των υπό μελέτη ιστών, ενώ τάση για διαφοροποιημένη έκφραση παρατηρήθηκε στη μεταγραφική έκφραση του LXRα ($P = 0.053$) (Εικόνα 38). Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα mRNA των γονιδίων LXRβ και ABCA1 ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένα στο αορτικό τοίχωμα της ανευρυσματικής αορτής συγκριτικά με της αθηρωματικής. Αντίθετα τα μεταγραφικά τους επίπεδα δεν παρουσίαζαν σημαντικές διαφορές μεταξύ φυσιολογικής και ανευρυσματικής αορτής καθώς και μεταξύ φυσιολογικής και αθηρωματικής αορτής.

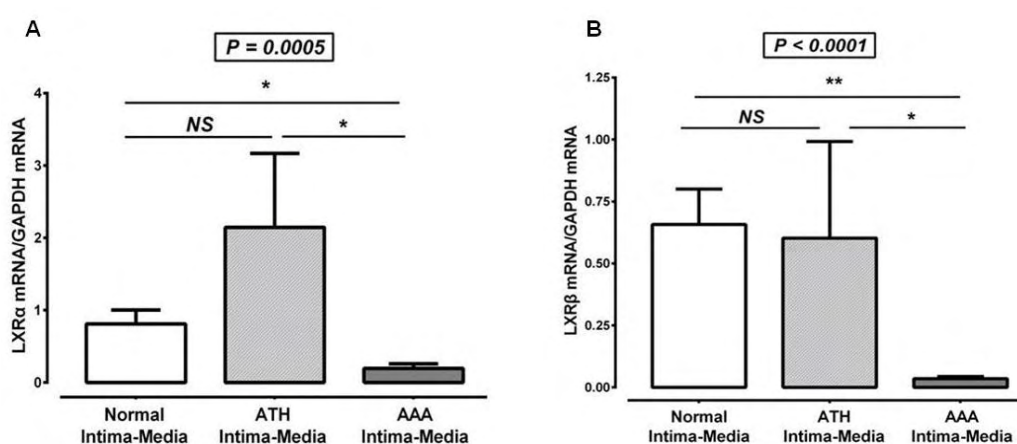


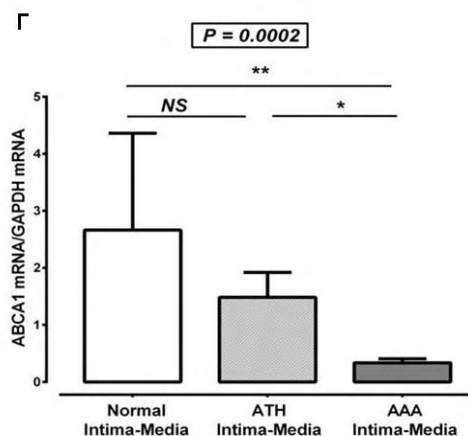
Εικόνα 38: Απεικόνιση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων LXRα (Α), LXRβ (Β) και ABCA1 (Γ) στο συνολικό αορτικό τοίχωμα ανευρυσματικής (AAA-Whole), φυσιολογικής (Normal-Whole) και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής (ATH-Whole) κοιλιακής αορτής. Τα επίπεδα mRNA είναι ομαλοποιημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, NS: non-significant (μη στατιστικά σημαντικό).

B.2.6 Μελέτη της μεταγραφικής έκφρασης των γονιδίων LXR α , LXR β και ABCA1 στον υποενδοθηλιακό χώρο (έσω και μεσαίος χιτώνας) ανευρυσματικής, αθηρωματικής μη ανευρυσματικής και φυσιολογικής κοιλιακής αορτής

Εφόσον η ιστολογική μελέτη υπέδειξε συσσώρευση των λιπιδίων στον έσω και μεσαίο χιτώνα της ανευρυσματικής αορτής, θελήσαμε να μελετήσουμε περαιτέρω την έκφραση των γονιδίων LXR α , LXR β και ABCA1 στους επιμέρους χιτώνες του αορτικού τοιχώματος. Συγκεκριμένα η μελέτη συμπεριλάμβανε τον υποενδοθηλιακό χώρο (έσω και μεσαίος χιτώνας) της ανευρυσματικής (AAA intima-media), αθηρωματικής μη ανευρυσματικής (ATH intima-media) και φυσιολογικής (Normal intima-media) κοιλιακής αορτής. Αξίζει να τονιστεί ότι λόγω παρουσίας αθηρωματικών βλαβών στους παθολογικούς ιστούς, ο έσω και μεσαίος χιτώνας δεν μπορούσε να διαχωριστεί με αποτέλεσμα να χρησιμοποιηθεί ως ενιαίο σύνολο (υποενδοθηλιακός χώρος) για τη μελέτη των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων σε όλους τους υπό μελέτη ιστούς.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης των LXR α , LXR β και ABCA1 με τη μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου έδειξε σημαντικές διαφορές των mRNA επιπέδων τους ($P = 0.005$, $P < 0.0001$, $P = 0.0002$, αντιστοίχως) μεταξύ των υπό μελέτη ιστών (Εικόνα 39). Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των δύο πυρηνικών υποδοχέων, LXR α και LXR β , καθώς και της ABCA1 παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική μείωση στον υποενδοθηλιακό χώρο της αορτής με ΑΚΑ συγκριτικά με της αθηρωματικής μη ανευρυσματικής και φυσιολογικής αορτής. Αντίθετα δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ του υποενδοθηλιακού χώρου φυσιολογικής και αθηρωματικής κοιλιακής αορτής.





Εικόνα 39: Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων LXRα (A), LXRβ (B) και ABCA1 (Γ) στον υποενδοθηλιακό χώρο ανευρυσματικής (AAA Intima-media), αθηρωματικής μη ανευρυσματικής (ATH Intima-media) και φυσιολογικής (Normal Intima-Media) αορτής. Τα επίπεδα mRNA είναι ομαλοποιημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, NS: non-significant (μη στατιστικά σημαντικό).

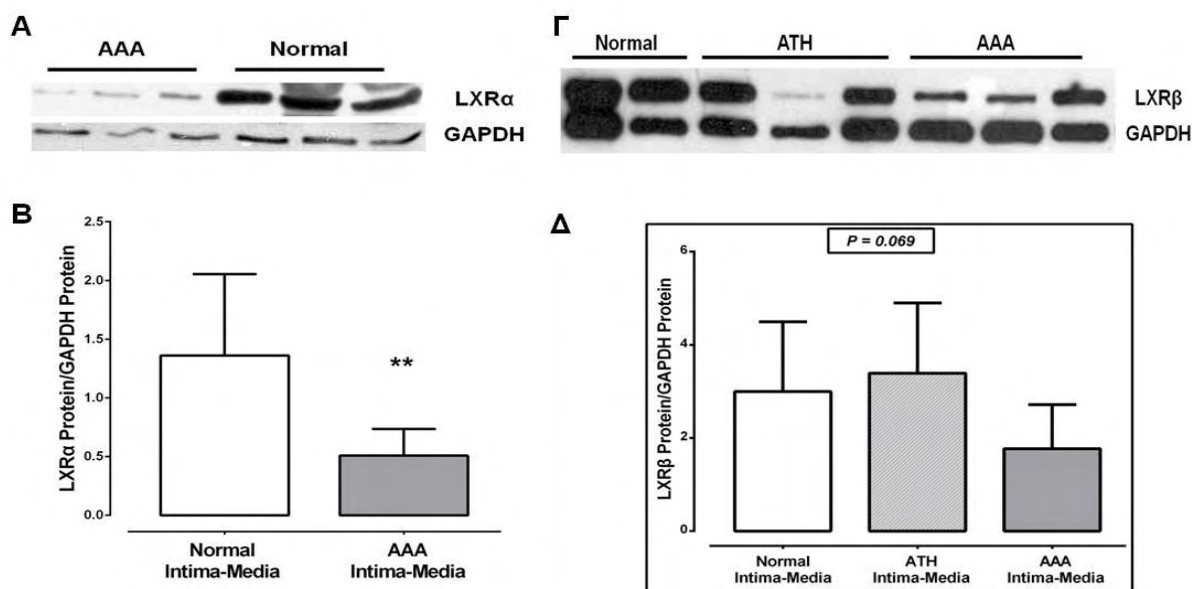
B.2.7 Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης των γονιδίων LXRα και LXRβ στον υποενδοθηλιακό χώρο (έσω και μεσαίο χιτώνα) ανευρυσματικής, αθηρωματικής μη ανευρυσματικής και φυσιολογικής κοιλιακής αορτής

Στη συνέχεια διερευνήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης των LXRα και LXRβ στον υποενδοθηλιακό χώρο (έσω και μεσαίο χιτώνα)² ανευρυσματικής, αθηρωματικής μη ανευρυσματικής και φυσιολογικής κοιλιακής αορτής. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης του πυρηνικού υποδοχέα LXRα, παρατηρήθηκε σημαντικά διαφοροποιημένη έκφραση των πρωτεϊνικών του επιπέδων μεταξύ του ανευρυσματικού υποενδοθηλιακού χώρου (AAA intima-media) και του φυσιολογικού (Normal Intima-Media). Συγκεκριμένα τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης (Western blot) έδειξαν μειωμένη πρωτεϊνική έκφραση του LXRα στον υποενδοθηλιακό χώρο της ανευρυσματικής αορτής συγκριτικά με της φυσιολογικής ($P < 0.01$) (Εικόνα 40A-B).

Επιπροσθέτως, ομοίως με τον LXRα, διαφορές παρουσίαζαν και τα πρωτεϊνικά επίπεδα του LXRβ στους υπό μελέτη ιστούς. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης (Western blot) έδειξαν τάση ($P = 0.069$) για διαφοροποιημένη έκφραση των πρωτεϊνικών επιπέδων μεταξύ του ανευρυσματικού (AAA Intima-Media), αθηρωματικού (ATH Intima-Media) και φυσιολογικού (Normal Intima-Media) υποενδοθηλιακού χώρου. Συγκεκριμένα

² Ομοίως με τα πειράματα σχετικά με τη μελέτη των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων, λόγω παρουσίας αθηρωματικών βλαβών στους παθολογικούς ιστούς, ο έσω και μεσαίος χιτώνας δεν μπορούσε να διαχωριστεί με αποτέλεσμα να χρησιμοποιηθεί ως ενιαίο σύνολο (υποενδοθηλιακός χώρος) στη μελέτη των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων σε όλους τους υπό μελέτη ιστούς.

παρατηρήθηκαν μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του LXRβ στον υποενδοθηλιακό χώρο της ανευρυσματικής συγκριτικά με της αθηρωματικής και φυσιολογικής αρτηρίας, ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ αθηρωματικής και φυσιολογικής αρτηρίας. (Εικόνα 40Γ-Δ).



Εικόνα 40: Απεικόνιση και ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων LXRα (A-B) και LXRβ (Γ-Δ) στον υποενδοθηλιακό χώρο ανευρυσματικής (AAA Intima-Media), αθηρωματικής μη ανευρυσματικής (ATH Intima-Media) αρτηρίας και φυσιολογικής (Normal Intima-Media) αρτηρίας. Τα επίπεδα πρωτεΐνης είναι ομαλοποιημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH. ** $P < 0.01$

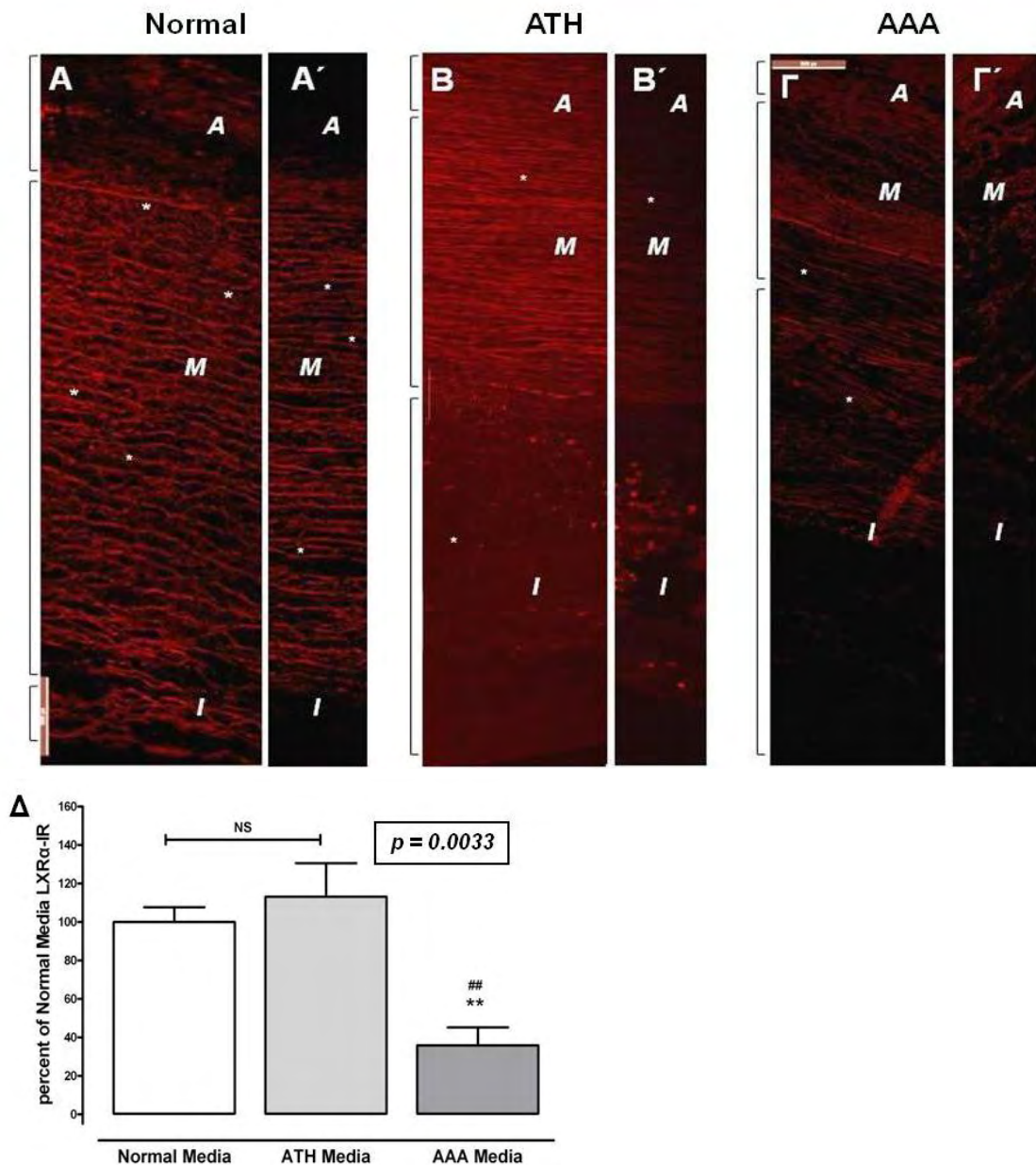
B.2.8 Ανοσοϊστοχημική μελέτη των γονιδίων LXRα, ABCA1 και ApoA1 στο αορτικό τοίχωμα ανευρυσματικής, φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αρτηρίας

Τα παραπάνω ευρήματά μας μας παρακίνησαν να μελετήσουμε περαιτέρω το μοτίβο έκφρασης των μορίων που συμμετέχουν στο μηχανισμό εξόδου της χοληστερόλης μεταξύ των επιμέρους χιτώνων του αορτικού τοιχώματος. Προκειμένου να αποκτήσουμε μια πλησιέστερη εικόνα της έκφρασής τους, προχωρήσαμε σε ανοσοϊστοχημική μελέτη του πυρηνικού υποδοχέα LXRα, καθώς επίσης και των γονιδίων στόχων του LXR, ABCA1 και ApoA1 σε ιστούς ανευρυσματικής, φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αρτηρίας. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της ανοσοϊστοχημείας φθορισμού σε διαδοχικές τομές των υπό μελέτη ιστών χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι των εκάστων πρωτεϊνών. Η παρατήρηση και αξιολόγηση της έντασης του

φθορισμού σε κάθε δείγμα αντιπροσωπεύει τα επίπεδα ανοσοδραστικότητας για κάθε αντίσωμα (Immunoreactivity levels, IR) τα οποία αντικατοπτρίζουν τα επίπεδα έκφρασης της αντίστοιχης πρωτεΐνης στους ιστούς.

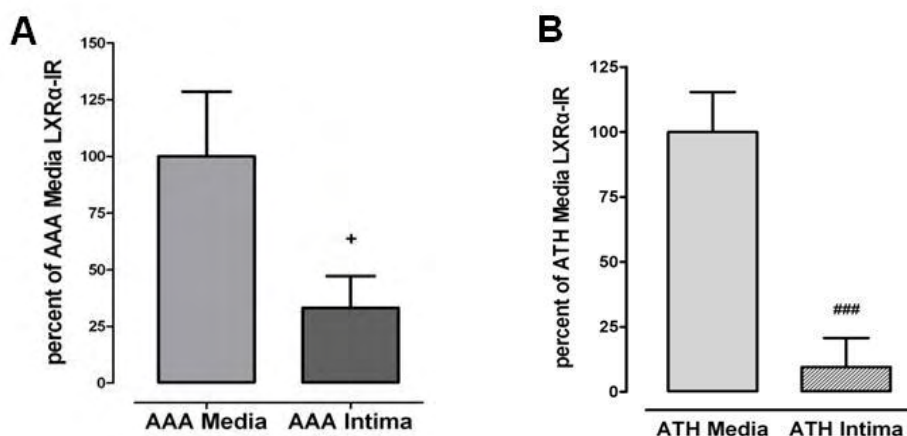
B.2.8.1 Ανοσοϊστοχημική μελέτη του LXRα στο αορτικό τοίχωμα ανευρυσματικής, φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής

Τα ευρήματα από την τεχνική της ανοσοϊστοχημείας φθορισμού υπέδειξαν παρουσία ανοσοδραστικότητας του LXRα στο μεσαίο χιτώνα όλων των υπό μελέτη ιστών καθώς επίσης και στον έσω χιτώνα της ανευρυσματικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής (Εικόνα 41Α-Γ). Αναλυτικότερα κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό της ανοσοδραστικότητας του LXRα, προέκυψε ότι τα επίπεδα αυτής και κατ' επέκταση τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του LXRα παρουσίαζαν σημαντικές διαφορές ($P = 0.0033$) μεταξύ του μεσαίου χιτώνα της ανευρυσματικής, φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι ο μεσαίος χιτώνας αορτής με ΑΚΑ (AAA media) παρουσίαζε σημαντική μειωμένη πρωτεϊνική έκφραση του LXRα συγκριτικά με το μεσαίο χιτώνα της φυσιολογικής (Normal media) και αθηρωματικής (ATH media) κοιλιακής αορτής ($P < 0.01$) (Εικόνα 41Δ). Αντιθέτως τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του LXRα δεν παρουσίαζαν σημαντική μεταβολή μεταξύ του φυσιολογικού και αθηρωματικού μεσαίου αορτικού χιτώνα (Εικόνα 41Δ).



Εικόνα 41: Αντιπροσωπευτικές εικόνες της ανοσοανίχνευσης του LXRα με φθορισμό σε τομές αρτηρικού τοιχώματος φυσιολογικής (Normal) (Α), αθηρωματικής μη ανευρυσματικής (ATH) (Β) και ανευρυσματικής (ΑΑΑ) (Γ) κοιλιακής αρτηρίας. (Α'-Γ') Τομές ως αρνητικοί μάρτυρες του μη-ειδικού φθορισμού ή αυτοφθορισμού των ινών ελαστίνης. Οι αγκύλες αντιπροσωπεύουν τα όρια των αρτηρικών χιτώνων όπου: Α: *Adventitia*, έξω χιτώνας, Μ: *Media*, μεσαίος χιτώνας, Ι: *Intima*, έσω χιτώνας. Μεγέθυνση όλων των φωτομικρογραφιών 10x. (Δ) Ποσοτική απεικόνιση της LXRα-ανοσοδραστικότητας στο μεσαίο χιτώνα της φυσιολογικής (Normal media), αθηρωματικής μη ανευρυσματικής (ATH media) και ανευρυσματικής (AAA media) κοιλιακής αρτηρίας. Τα επίπεδα της ανοσοδραστικότητας είναι ομαλοποιημένα ως προς την ανοσοδραστικότητα του φυσιολογικού μεσαίου χιτώνα. Το σύμβολο “*” αντιστοιχεί σε στατιστικά σημαντικές διαφορές συγκριτικά με το μεσαίο φυσιολογικό αρτηρικό χιτώνα, ενώ το “#” συγκριτικά με το μεσαίο χιτώνα της αθηρωματικής αρτηρίας. ** $P < 0.01$, # $P < 0.01$.

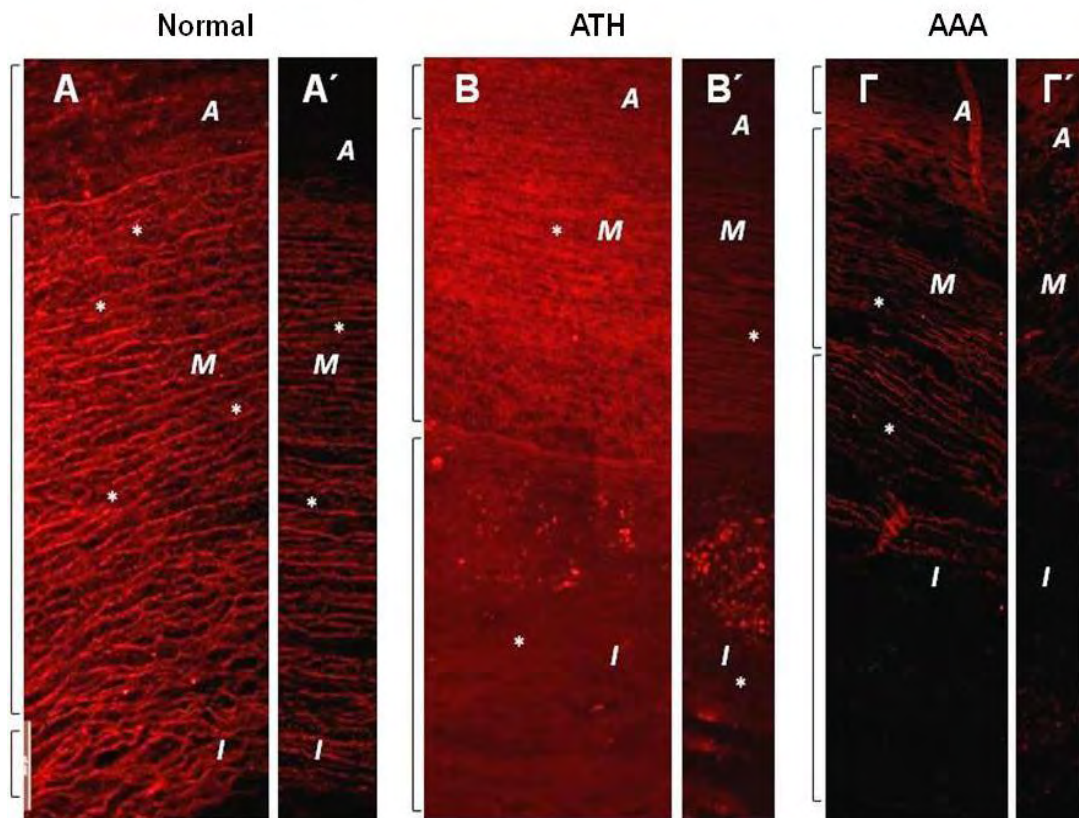
Επιπρόσθετα τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ανοσοδραστικότητα του LXRα ήταν σημαντικά μειωμένη στον έσω χιτώνα της ανευρυσματικής αορτής (AAA intima) σε σύγκριση με το μεσαίο χιτώνα αυτής ($P < 0.05$) (Εικόνα 42A). Αναλογικά ήταν και τα ευρήματα στην αθηρωματική μη ανευρυσματική κοιλιακή αορτή, όπου τα επίπεδα της LXRα-ανοσοδραστικότητας ήταν μειωμένα στον έσω χιτώνα (ATH intima) συγκριτικά με το μεσαίο αορτικό χιτώνα των αθηρωματικών ιστών ($P < 0.001$) (Εικόνα 42B).



Εικόνα 42: Ποσοτική απεικόνιση της LXRα-ανοσοδραστικότητας (A) στο μεσαίο (AAA media) και στον έσω (AAA intima) χιτώνα της ανευρυσματικής αορτής. * $P < 0.05$, καθώς και (B) στο μεσαίο (ATH media) και στον έσω (ATH intima) χιτώνα της αθηρωματικής μη ανευρυσματικής αορτής. ### $P < 0.001$. Τα επίπεδα της ανοσοδραστικότητας είναι ομαλοποιημένα ως προς την ανοσοδραστικότητα του αντίστοιχου μεσαίου χιτώνα.

B.2.8.2 Ανοσοϊστοχημική μελέτη της ABCA1 στο αορτικό τοίχωμα ανευρυσματικής, φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής

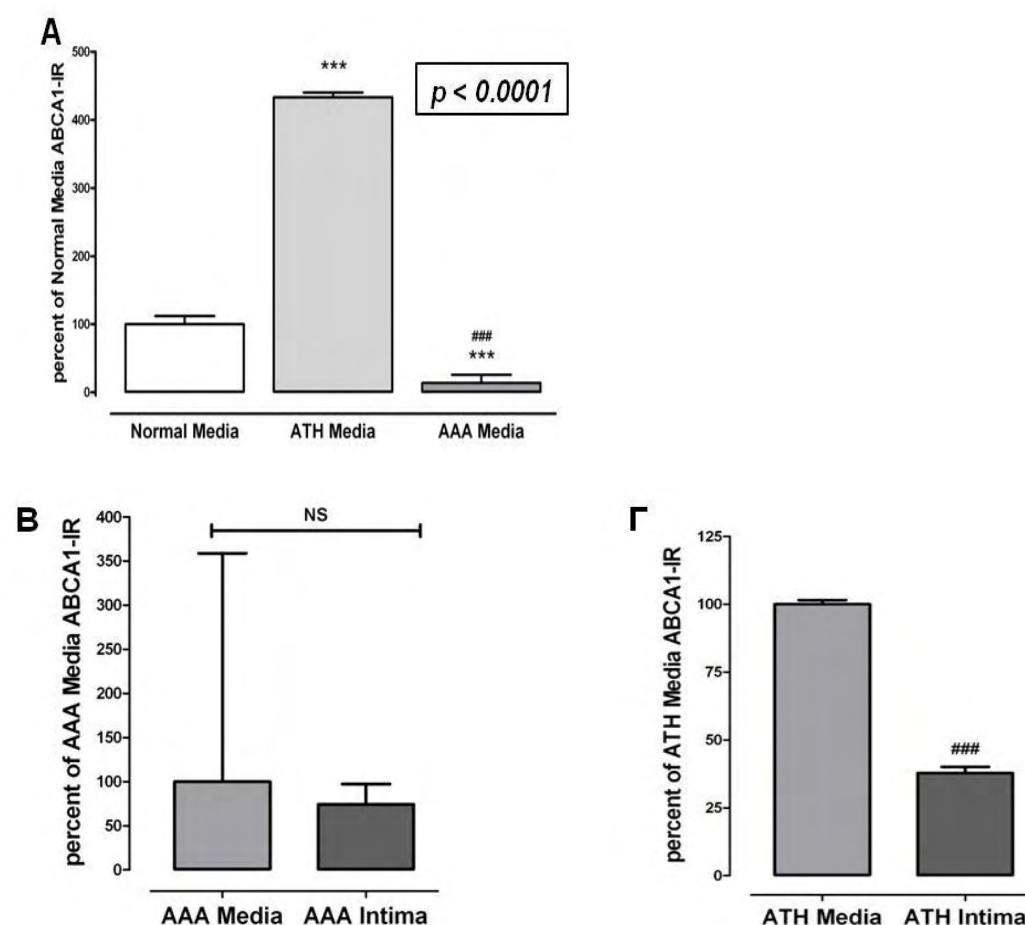
Στη συνέχεια προκειμένου να αποκτήσουμε μια πιο σαφή εικόνα της έκφρασης των μορίων που ενέχονται στην εκροή της χοληστερόλης, μελετήσαμε την έκφραση της ABCA1 με ανοσοϊστοχημεία φθορισμού στο αορτικό τοίχωμα της ανευρυσματικής, φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής αορτής. Η μικροσκοπική παρατήρηση των ιστών έδειξε παρουσία ανοσοδραστικότητας της ABCA1 στο μεσαίο χιτώνα όλων των υπό μελέτη ιστών καθώς επίσης και στον έσω χιτώνα της ανευρυσματικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής (Εικόνα 43A-Γ).



Εικόνα 43: Αντιπροσωπευτικές εικόνες της ανοσοανίχνευσης της ABCA1 με φθορισμό σε τομές αρτηρικού τοιχώματος φυσιολογικής (Normal) (A), αθηρωματικής μη ανευρυσματικής (ATH) (B) και ανευρυσματικής (AAA) (Γ) κοιλιακής αρτηρίας. (A'-Γ') Τομές ως αρνητικοί μάρτυρες του μη-ειδικού φθορισμού ή αυτοφθορισμού των ινών ελαστικής. Οι αγκύλες αντιπροσωπεύουν τα όρια των αρτηρικών χιτώνων όπου: A: *Adventitia*, έξω χιτώνας, M: *Media*, μεσαίος χιτώνας, I: *Intima*, έσω χιτώνας. Μεγέθυνση όλων των φωτομικρογραφιών 10x.

Αναλυτικότερα η ποσοτικοποίηση της ανοσοδραστικότητας της ABCA1 έδειξε σημαντικές διαφορές στα επίπεδα αυτής ($P < 0.0001$) μεταξύ του μεσαίου χιτώνα της ανευρυσματικής, φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αρτηρίας. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι ο μεσαίος χιτώνας αρτηρίας με AKA (AAA media) παρουσίαζε σημαντικά μειωμένη πρωτεϊνική έκφραση της ABCA1 συγκριτικά με το μεσαίο χιτώνα της φυσιολογικής (Normal media) και αθηρωματικής (ATH media) κοιλιακής αρτηρίας ($P < 0.0001$) (Εικόνα 44A), ενώ σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε στο μεσαίο χιτώνα της αθηρωματικής αρτηρίας συγκριτικά με της φυσιολογικής ($P < 0.0001$) (Εικόνα 44A). Επιπλέον παρατηρήθηκε δραματική μείωση και σχεδόν απουσία ανοσοδραστικότητας της ABCA1 στον έσω χιτώνα της ανευρυσματικής αρτηρίας (AAA intima) σε σύγκριση με το μεσαίο χιτώνα αυτής, ενώ τα

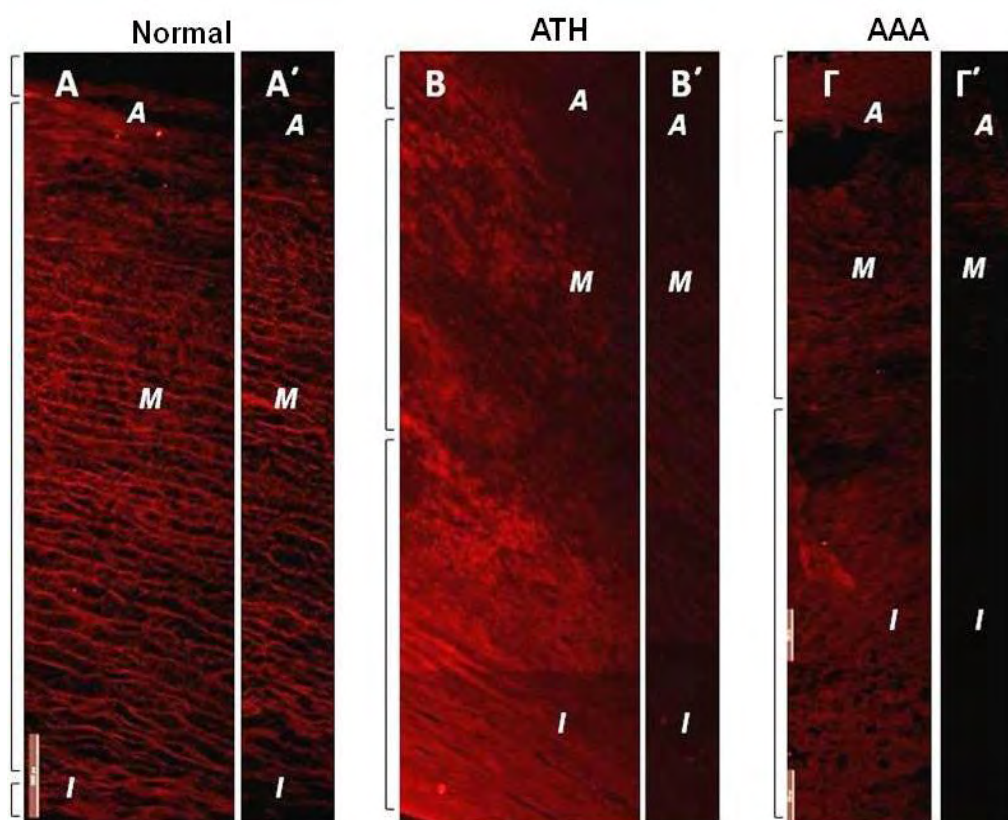
επίπεδά της ήταν σημαντικά μειωμένα στον έσω χιτώνα (ATH intima) συγκριτικά με το μεσαίο αορτικό χιτώνα των αθηρωματικών ιστών ($P < 0.001$) (Εικόνα 44B-Γ).



Εικόνα 44: (A) Ποσοτική απεικόνιση της ABCA1-ανοσοδραστικότητας στο μεσαίο χιτώνα της φυσιολογικής (Normal media), αθηρωματικής μη ανευρυσματικής (ATH media) και ανευρυσματικής (AAA media) κοιλιακής αορτής. Τα επίπεδα της ανοσοδραστικότητας είναι ομαλοποιημένα ως προς την ανοσοδραστικότητα του φυσιολογικού μεσαίου χιτώνα. Το σύμβολο '*' αντιστοιχεί σε στατιστικά σημαντικές διαφορές συγκριτικά με το μεσαίο φυσιολογικό αορτικό χιτώνα, ενώ το '#' συγκριτικά με το μεσαίο χιτώνα της αθηρωματικής αορτής. *** $P < 0.001$, ### $P < 0.01$. Ποσοτική απεικόνιση της ABCA1-ανοσοδραστικότητας (B) στο μεσαίο (AAA media) και στον έσω (AAA intima) χιτώνα της ανευρυσματικής αορτής, καθώς και (Γ) στο μεσαίο (ATH media) και στον έσω (ATH intima) χιτώνα της αθηρωματικής μη ανευρυσματικής αορτής. ### $P < 0.001$. Τα επίπεδα της ανοσοδραστικότητας είναι ομαλοποιημένα ως προς την ανοσοδραστικότητα του αντίστοιχου μεσαίου χιτώνα. NS: non-significant (μη στατιστικά σημαντικό).

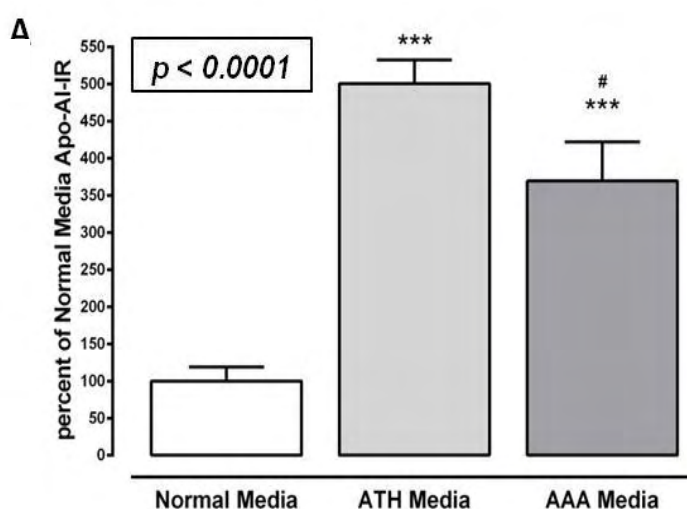
Β.2.8.3 Ανοσοϊστοχημική μελέτη της ΑροΑΙ στο αορτικό τοίχωμα ανευρυσματικής, φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η έκφραση της ΑροΑΙ με ανοσοϊστοχημεία φθορισμού στο αορτικό τοίχωμα της ανευρυσματικής, φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής αορτής. Τα μικροσκοπικά ευρήματα έδειξαν παρουσία ανοσοδραστικότητας της ΑροΑΙ στο μεσαίο χιτώνα όλων των υπό μελέτη ιστών καθώς επίσης και στον έσω χιτώνα της ανευρυσματικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής (Εικόνα 45Α-Γ).



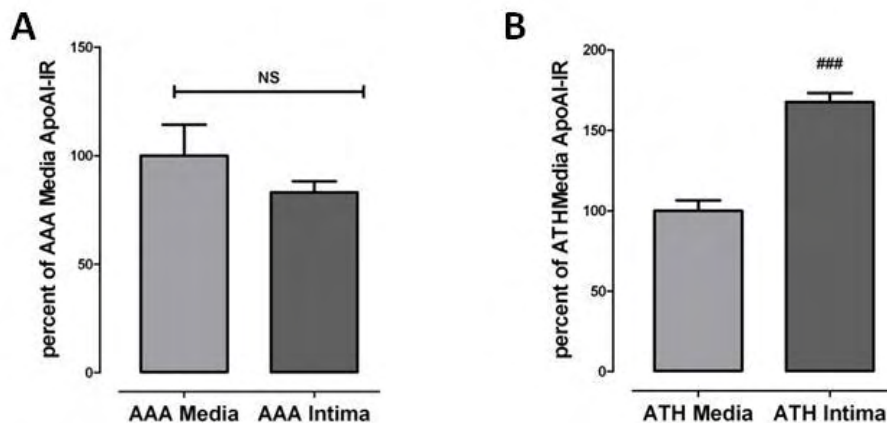
Εικόνα 45: Αντιπροσωπευτικές εικόνες της ανοσοανίχνευσης της ΑροΑΙ με φθορισμό σε τομές αορτικού τοιχώματος φυσιολογικής (Normal) (Α), αθηρωματικής μη ανευρυσματικής (ΑΤΗ) (Β) και ανευρυσματικής (ΑΑΑ) (Γ) κοιλιακής αορτής. (Α'-Γ') Τομές ως αρνητικοί μάρτυρες του μη-ειδικού φθορισμού ή αυτοφθορισμού των ινών ελαστικής. Οι αγκύλες αντιπροσωπεύουν τα όρια των αορτικών χιτώνων όπου: Α: *Adventitia*, έξω χιτώνας, Μ: *Media*, μεσαίος χιτώνας, Ι: *Intima*, έσω χιτώνας. Μεγέθυνση όλων των φωτομικρογραφιών 10x.

Αναλυτικότερα η ποσοτικοποίηση της ανοσοδραστικότητας της ApoAI έδειξε σημαντικές διαφορές στα επίπεδα αυτής ($P < 0.0001$) μεταξύ του μεσαίου χιτώνα της ανευρυσματικής, φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι ο μεσαίος χιτώνας της ανευρυσματικής (AAA media) και αθηρωματικής (ATH media) αορτής παρουσίαζε σημαντικά αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της ApoAI συγκριτικά με το μεσαίο χιτώνα της φυσιολογικής (Normal media) ($P < 0.0001$), ενώ τα επίπεδα αυτής ήταν μειωμένα στο μεσαίο χιτώνα της ανευρυσματικής συγκριτικά με της αθηρωματικής κοιλιακής αορτής ($P < 0.05$) (Εικόνα 46).



Εικόνα 46: Ποσοτική απεικόνιση της ApoAI-ανοσοδραστικότητας στο μεσαίο χιτώνα της φυσιολογικής (Normal media), αθηρωματικής μη ανευρυσματικής (ATH media) και ανευρυσματικής (AAA media) κοιλιακής αορτής. Τα επίπεδα της ανοσοδραστικότητας είναι ομαλοποιημένα ως προς την ανοσοδραστικότητα του φυσιολογικού μεσαίου χιτώνα. Το σύμβολο ‘*’ αντιστοιχεί σε στατιστικά σημαντικές διαφορές συγκριτικά με το μεσαίο φυσιολογικό αορτικό χιτώνα, ενώ το ‘#’ συγκριτικά με το μεσαίο χιτώνα της αθηρωματικής αορτής. *** $P < 0.001$, # $P < 0.05$.

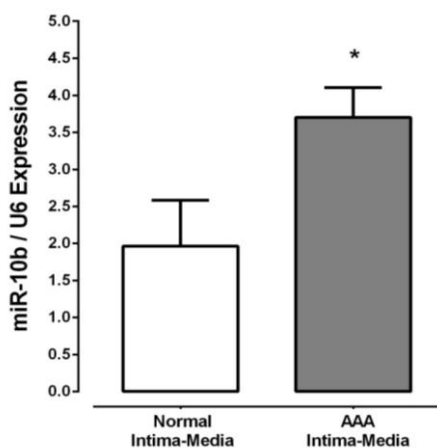
Επιπλέον η ανοσοδραστικότητα της ApoAI ήταν πολύ έντονη στον έσω χιτώνα της ανευρυσματικής αορτής (AAA intima) όπως και το μεσαίο χιτώνα αυτής, ενώ τα επίπεδά της ήταν σημαντικά αυξημένα στον έσω χιτώνα (ATH intima) συγκριτικά με το μεσαίο αορτικό χιτώνα των αθηρωματικών ιστών ($P < 0.001$) (Εικόνα 47).



Εικόνα 47: Ποσοτική απεικόνιση της ApoA1-ανοσοδραστικότητας (A) στο μεσαίο (AAA media) και στον έσω (AAA intima) χιτώνα της ανευρυσματικής αρτηής, καθώς και (B) στο μεσαίο (ATH media) και στον έσω (ATH intima) χιτώνα της αθηρωματικής μη ανευρυσματικής αρτηής. ### $P < 0.001$. Τα επίπεδα της ανοσοδραστικότητας είναι ομαλοποιημένα ως προς την ανοσοδραστικότητα του αντίστοιχου μεσαίου χιτώνα. NS: non-significant (μη στατιστικά σημαντικό).

B.2.9 Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης του miR-10b στον υποενδοθηλιακό χώρο ανευρυσματικής και φυσιολογικής κοιλιακής αρτηής

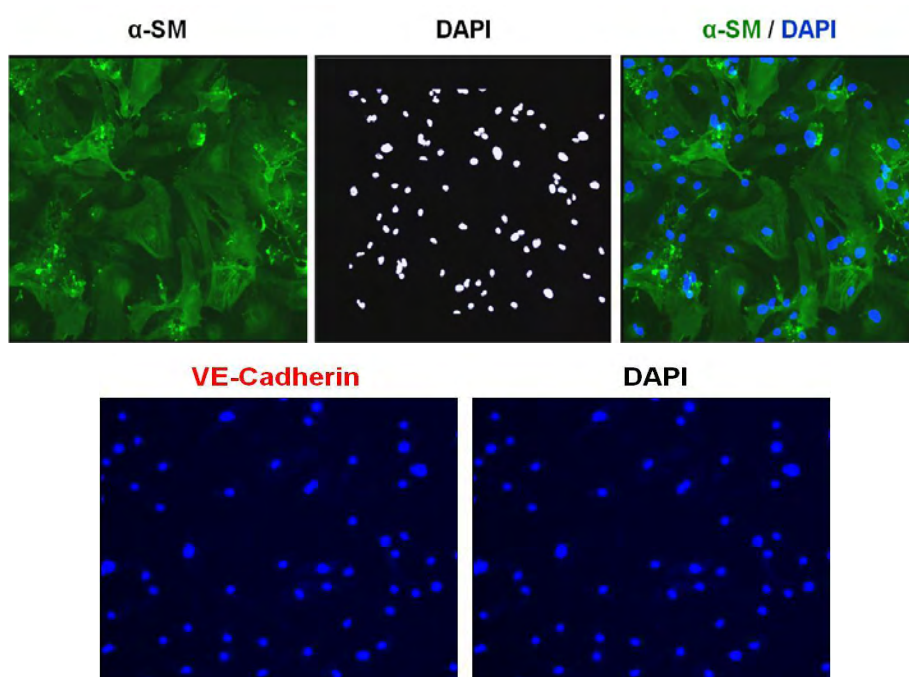
Σύμφωνα με πρόσφατες βιβλιογραφικές αναφορές, το miR-10b έχει συσχετιστεί με τη φαινοτυπική διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων καθώς επίσης ενέχεται και στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπιδίων. Λαμβάνοντας υπ' όψιν όλα τα παραπάνω αποτελέσματά μας, θελήσαμε να διερευνήσουμε το ρόλο του miR-10b στο ανεύρυσμα κοιλιακής αρτηής. Αρχικά προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης του miR-10b στον υποενδοθηλιακό χώρο (έσω και μεσαίος χιτώνας) ανευρυσματικής και φυσιολογικής κοιλιακής αρτηής. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης του miR-10b με τη μέθοδο της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου έδειξε σημαντική αύξηση των επιπέδων του στον υποενδοθηλιακό χώρο της ανευρυσματικής αρτηής συγκριτικά με της φυσιολογικής ($P < 0.05$) (Εικόνα 48).



Εικόνα 48: Μεταγραφική έκφραση του miR-10b στον υποενδοθηλιακό χώρο ανευρυσματικής (AAA Intima-Media) και φυσιολογικής (Normal Intima-Media) κοιλιακής αρτηής. Τα επίπεδα του miR-10b είναι ομαλοποιημένα ως προς το μικρό πυρηνικό RNA U6. * $P < 0.05$

B.2.10 Επιβεβαίωση της απομόνωσης και καλλιέργειας ανευρυσματικών λείων μυϊκών κυττάρων

Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε την απομόνωση και καλλιέργεια των ΛΜΚ από τον υποενδοθηλιακό χώρο αορτής με ΑΚΑ, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του ανοσοφθορισμού με αντισώματα έναντι της α-ακτίνης λείου μυϊκού τύπου (α -SM), χαρακτηριστικής πρωτεΐνης των ΛΜΚ καθώς και της VE-Cadherin, χαρακτηριστικής πρωτεΐνης των ενδοθηλιακών κυττάρων για τον έλεγχο πιθανής πρόσμιξης της καλλιέργειας από άλλους κυτταρικούς τύπους της αορτής. Παρατηρήθηκε ότι ο μόνος κυτταρικός τύπος της καλλιέργειας ήταν τα ΛΜΚ καθώς παρουσίαζαν ανοσοδραστικότητα της α -SM (Εικόνα 49). Επίσης παρατηρήθηκε απουσία ανοσοδραστικότητας της VE-Cadherin γεγονός που υποδεικνύει την απουσία προσμίξεων της καλλιέργειας από άλλους κυτταρικούς τύπους (Εικόνα 49).

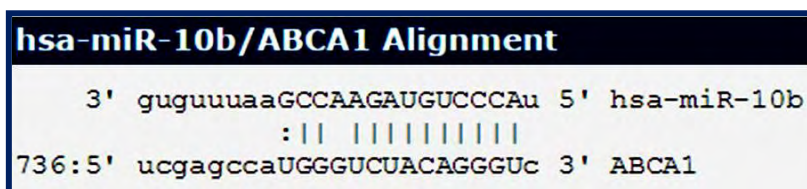


Εικόνα 49: Ανευρυσματικά λεία μυϊκά κύτταρα (ΛΜΚ) σε καλλιέργεια. Σήμανση των κυττάρων με αντίσωμα έναντι (Α) της α-ακτίνης λείου μυϊκού τύπου (α -SM) (πράσινο) και (Β) της VE-Cadherin (κόκκινο). Η χρώση των πυρήνων των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με DAPI.

B.2.11 Ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων που ενέχονται στην έξοδο της χοληστερόλης από το miR-10b μέσω της επίδρασης του αναστολέα του (anti-miR-10b) στα ανευρυσματικά λεία μυϊκά κύτταρα

Στη συνέχεια διερευνήθηκε ο ρόλος του miR-10b στη ρύθμιση των γονιδίων που εμπλέκονται στο μηχανισμό εξόδου της χοληστερόλης. Αρχικά με τη χρήση

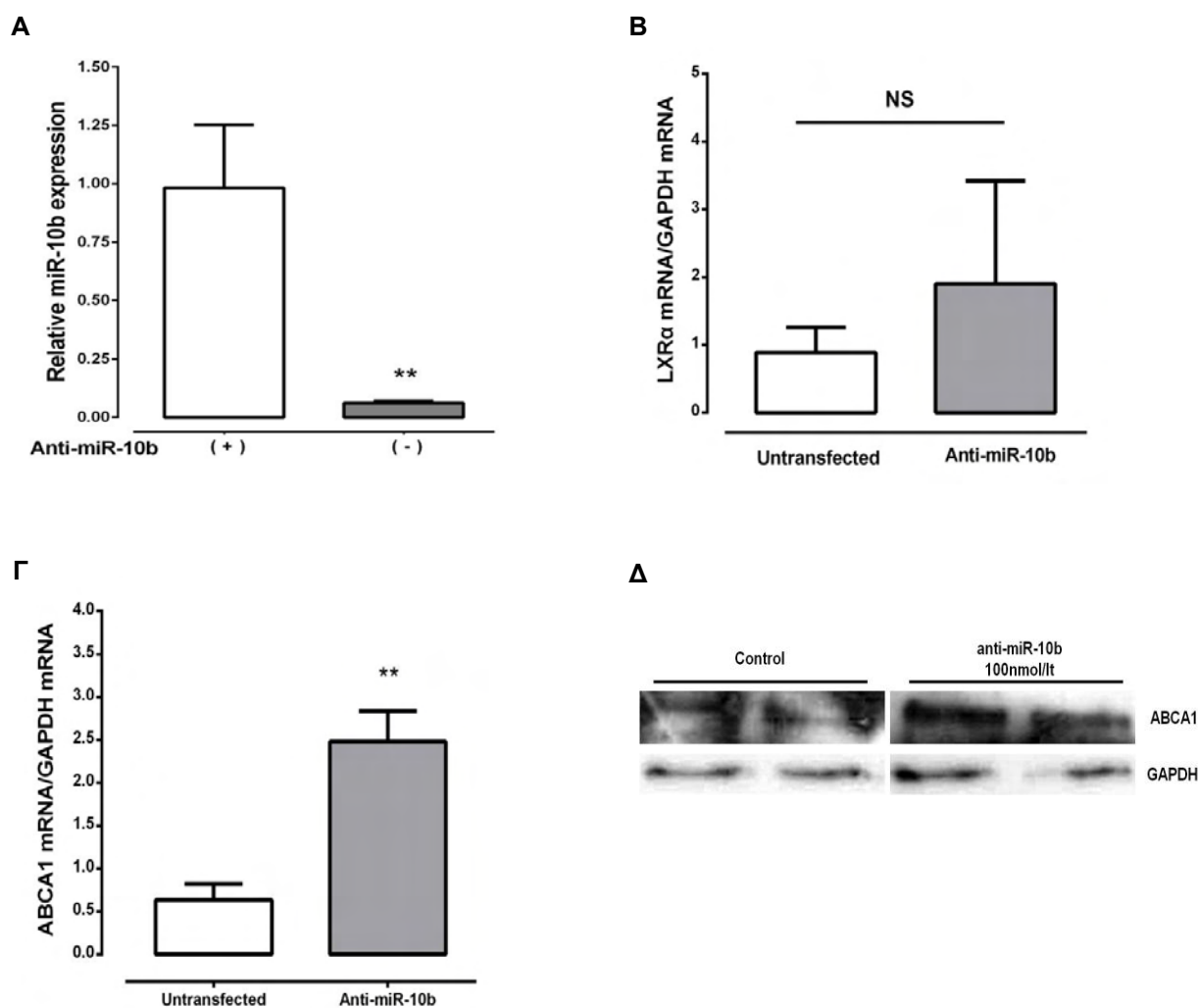
υπολογιστικών προγραμμάτων πραγματοποιήθηκε ανάλυση της 3' αμετάφραστης περιοχής του mRNA της ABCA1 και του LXRα για την ανεύρεση λειτουργικών θέσεων σύνδεσης του miR-10b. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν την ύπαρξη αλληλουχίας που αναγνωρίζει το miR-10b στην 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA της ABCA1 μέσω της οποίας ασκεί τη δράση του (Εικόνα 50), ενώ ο LXRα δε διαθέτε αλληλουχία συμπληρωματική με το miR-10b.



Εικόνα 50: Απεικόνιση της θέσης σύνδεσης του miR-10b στην 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA της ABCA1 όπως βρέθηκε μετά τη χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής.

Στη συνέχεια προκειμένου να μελετηθεί σε κυτταρικό επίπεδο ο ρόλος του miR-10b στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στο μηχανισμό εξόδου της χοληστερόλης (LXRα και ABCA1), χορηγήσαμε σε καλλιεργημένα ανευρυσματικά λεία μυϊκά κύτταρα (AKA-ΛΜΚ) 100nmol/l του αναστολέα του miR-10b (anti-miR-10b) για χρονικό διάστημα 48h. Η χρήση του αναστολέα του miR-10b ήταν επιτυχής καθώς κύτταρα στα οποία χορηγήθηκε το anti-miR-10b παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης του miR-10b συγκριτικά με αυτά στα οποία δεν χορηγήθηκε ο αναστολέας ($P < 0.001$) (Εικόνα 51Α).

Στη συνέχεια μελετήθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του πυρηνικού υποδοχέα LXRα καθώς επίσης και τα μεταγραφικά και πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου-στόχου του LXRα, της ABCA1. Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης της ABCA1 σε AKA-ΛΜΚ στα οποία χορηγήθηκε ο αναστολέας του miR-10b συγκριτικά με αυτά τα οποία δεν διαμολύνθηκαν με το anti-miR-10b ($P < 0.01$) (Εικόνα 51Γ), ενώ σε συμφωνία με τα mRNA επίπεδα της ABCA1, τα πρωτεϊνικά επίπεδα αυτής εμφανίστηκαν ομοίως αυξημένα μετά τη χορήγηση του anti-miR-10b (Εικόνα 51Δ). Αντιθέτως η αναστολή του miR-10b δεν επηρέασε τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του LXRα (Εικόνα 51Β).

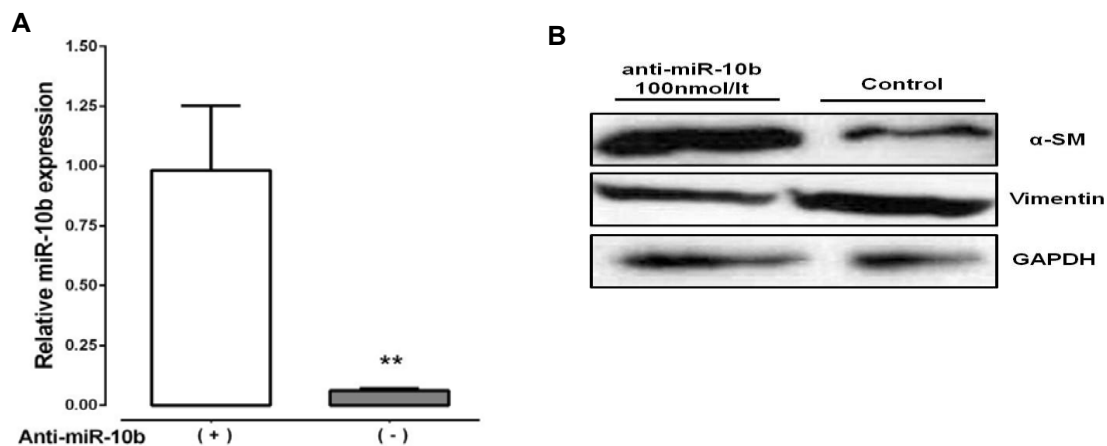


Εικόνα 51: Μεταγραφική έκφραση του miR-10b (A) σε καλλιέργειες ΑΚΑ-ΛΜΚ μετά από τη χορήγηση 100nmol/lit anti-miR-10b για 48h. Τα επίπεδα έκφρασης του miR-10b είναι ομαλοποιημένα ως προς το μικρό πυρηνικό RNA U6. Μεταγραφική έκφραση των γονιδίων LXRα (B) και ABCA1 (Γ) καθώς και απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης της ABCA1 (Δ) σε καλλιέργειες ΑΚΑ-ΛΜΚ μετά τη χορήγηση 100nmol/lit anti-miR-10b για 48h. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων είναι ομαλοποιημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH. ** $P < 0.01$, NS: non-significant (μη στατιστικά σημαντικό).

B.2.12 Προσδιορισμός του φαινοτύπου των ανευρυσματικών λείων μυϊκών κυττάρων μετά από επίδραση με τον αναστολέα του miR-10b

Στη συνέχεια προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος του miR-10b στην παθογένεια του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής, μελετήθηκε η επίδραση του στο φαινότυπο των λείων μυϊκών κυττάρων, τα οποία υιοθετούν τον παθολογικό συνθετικό φαινότυπο στο ΑΚΑ. Έγινε χορήγηση 100nmol/lit του αναστολέα του miR-10b (anti-miR-10b) για χρονικό διάστημα 48h σε καλλιεργημένα ανευρυσματικά λεία μυϊκά κύτταρα (ΑΚΑ-ΛΜΚ). Στη συνέχεια μελετήθηκε η πρωτεϊνική έκφραση της α-

ακτίνης λείου μυϊκού τύπου (α -SM) καθώς και της βιμεντίνης (Vimentin), χαρακτηριστικών πρωτεϊνών του συστατικού και συνθετικού φαινοτύπου των ΛΜΚ, αντιστοίχως. Η χρήση του αναστολέα του miR-10b ήταν επιτυχής καθώς κύτταρα στα οποία χορηγήθηκε το anti-miR-10b παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης του miR-10b συγκριτικά με αυτά στα οποία δεν χορηγήθηκε ο αναστολέας ($P < 0.001$) (Εικόνα 52A). Παρατηρήθηκε αύξηση της πρωτεϊνικής έκφρασης της α -SM και μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της βιμεντίνης σε ΑΚΑ-ΛΜΚ στα οποία είχε γίνει επίδραση με τον αναστολέα του miR-10b σε σχέση με αυτά που δεν τους χορηγήθηκε το anti-miR-10b (Εικόνα 52B).



Εικόνα 52: (A) Μεταγραφική έκφραση του miR-10b σε καλλιέργειες ΑΚΑ-ΛΜΚ μετά από τη χορήγηση 100nmol/l anti-miR-10b για 48h. Τα επίπεδα έκφρασης του miR-10b είναι ομαλοποιημένα ως προς το μικρό πυρηνικό RNA U6. ** $P < 0.01$. (B) Απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων της α -SM και Vimentin σε καλλιέργειες ΑΚΑ-ΛΜΚ μετά τη χορήγηση 100nmol/l anti-miR-10b για 48h. Τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών είναι ομαλοποιημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH.

B.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής (ΑΚΑ) αποτελεί μία εκφυλιστική πάθηση του αορτικού τοιχώματος που έχει συνδεθεί με υψηλά ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας. Μελέτες αναφέρουν ότι πλήττει το 4-8% του πληθυσμού ηλικίας άνω των 60 ετών, ενώ η ρήξη του έχει συσχετιστεί με υψηλό ποσοστό θνητότητας της τάξης του 85-90%. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι περίπου 15000 άτομα παγκοσμίως πεθαίνουν κάθε χρόνο από τη ρήξη του ανευρύσματος [7-9]. Πρόκειται για μία πολυπαραγοντική νόσο όπου σύμπλεγμα γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων ενέχεται στην ανάπτυξη και εξέλιξή της. Μεταξύ των αιτιολογικών παραγόντων συγκαταλέγονται η προχωρημένη ηλικία, το άρρεν φύλο, το κάπνισμα και η γενετική προδιάθεση καθώς το 15-20% των ασθενών παρουσιάζει οικογενειακό ιστορικό ανευρύσματος [41,50].

Όσο αφορά στην παθογένεια του ΑΚΑ πρόκειται για μία πολύπλοκη διαδικασία, όπου οι μηχανισμοί που ενέχονται στην ανάπτυξή του παραμένουν μέχρι σήμερα αδιευκρίνιστοι σε μεγάλο βαθμό. Έρευνες υποστηρίζουν ότι κύρια παθολογικά χαρακτηριστικά του ανευρύσματος είναι η φλεγμονή, η πρωτεολυτική αποδόμηση του συνδετικού ιστού καθώς και η απόπτωση των λείων μυϊκών κυττάρων (ΛΜΚ) [6,90,97,117,239-241]. Οι προαναφερθείσες διεργασίες οδηγούν σε εκφύλιση και αναδιαμόρφωση της αρχιτεκτονικής του αορτικού τοιχώματος με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η δυναμική του και να παρατηρείται τοπική λέπτυνση της αορτής όπου με την αιματική ροή αυτή διογκώνεται και δημιουργείται το ανεύρυσμα

Επιπροσθέτως ενδιαφέρον παρουσιάζουν βιβλιογραφικά δεδομένα τα οποία αναδεικνύουν την ύπαρξη και ρήξη της αθηρωματικής πλάκας ως έναν πιθανό παθογενετικό μηχανισμό του ΑΚΑ, ενώ παράλληλα σημαντικός αριθμός μελετών συνηγορεί στην περαιτέρω συσχέτιση μεταξύ του ανευρύσματος και της αθηρωματικής νόσου καθώς οι δύο παθήσεις παρουσιάζουν κοινούς προδιαθεσικούς παράγοντες [114-116]. Επιπλέον συχνό ιστολογικό εύρημα του ανευρύσματος είναι οι αθηρωματικές αλλοιώσεις οι οποίες οδηγούν σε πάχυνση του υποενδοθηλιακού χώρου στο αορτικό τοίχωμα της ανευρυσματικής αορτής [113-114,118]. Η δημιουργία ενός μεγαλύτερου σε πάχος υποενδοθηλιακού χώρου θεωρείται παθολογικό εύρημα καθώς φέρει στοιχεία του έσω και μεσαίου χιτώνα της αορτής, ενώ πολλές φορές στη βιβλιογραφία είναι δυνατόν να αναφέρεται μόνο ως έσω χιτώνας. Η παθοφυσιολογία της αθηρωματικής νόσου είναι συνυφασμένη με διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων οι οποίες οδηγούν στο σχηματισμό ή/και ρήξη της αθηρωματικής πλάκας. Η διαταραχή του μεταβολισμού των λιπιδίων καθώς

και του μηχανισμού εξόδου της χοληστερόλης έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση λιπιδίων και αφρωδών κυττάρων στο αορτικό τοίχωμα καθώς επίσης έχει συσχετιστεί με τη φαινοτυπική διαφοροποίηση των ΛΜΚ διαδραματίζοντας με αυτόν τον τρόπο σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη της αθηρωμάτωσης [119-120].

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τον παραλληλισμό των δύο παθήσεων, ερευνητικές ομάδες εστίασαν το ενδιαφέρον τους στη μελέτη του μεταβολισμού των λιπιδίων αναφορικά με την ανάπτυξη του ανευρύσματος [178-188]. Τα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα περιορίζονται στη συσχέτιση κυκλοφορούντων επιπέδων λιποπρωτεϊνών με την παρουσία του ΑΚΑ υποδεικνύοντας ότι ο μεταβολισμός των λιπιδίων πιθανότατα ενέχεται στην ανάπτυξη της νόσου, χωρίς όμως να έχουν αποσαφηνιστεί οι μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων συμβάλλει στην παθογένεση του ανευρύσματος. Αν και δεδομένα υποστηρίζουν ότι χαμηλά επίπεδα της λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (HDL) και υψηλά επίπεδα της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL) [178-181] στον ορό του αίματος καθώς και αυξημένα επίπεδα σφιγγολιπιδίων [187] έχουν συσχετιστεί με το ΑΚΑ, δεν υπάρχουν μελέτες που να συνδέουν τα επίπεδα αυτών στον ιστό αορτής καθώς και την εκροή της χοληστερόλης με τον παθοφυσιολογικό μηχανισμό του ανευρύσματος.

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η συσσωρευμένη χοληστερόλη στα κύτταρα και στο αορτικό τοίχωμα έχει τοξική δράση γεγονός που υποδηλώνει ότι κρίνεται απαραίτητη η σωστή λειτουργία του μηχανισμού ανάστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης. Ο παραπάνω μηχανισμός είναι υπεύθυνος για την απομάκρυνση της περίσσειας της χοληστερόλης από τα κύτταρα με σκοπό τη διατήρηση του λιπιδικού τους φορτίου σε φυσιολογικά επίπεδα, ενώ διαταραχές του έχουν συσχετιστεί με τη συσσώρευση των λιπιδίων στην αορτή και κατ' επέκταση την αιτιοπαθογένεια καρδιαγγειακών νοσημάτων [129-131,139-142]. Δεδομένης της σημασίας που έχει η διατήρηση της ομοιοστασίας του μεταβολισμού των λιπιδίων για τη φυσιολογική κατάσταση του αορτικού τοιχώματος, σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση της έκφρασης γονιδίων που ενέχονται στο μηχανισμό εκροής της χοληστερόλης καθώς επίσης και ο ρόλος του στην παθογένεια του ανευρύσματος.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ιστολογική μελέτη για τη διερεύνηση της παρουσίας λιπιδίων στο αορτικό τοίχωμα κοιλιακής αορτής. Ιστολογική ανάλυση των δειγμάτων ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής υπέδειξε την παρουσία κρυστάλλων χοληστερόλης και λιπιδίων στο τοίχωμα αυτής, όπως βρέθηκε και στο τοίχωμα αθηρωματικής αορτής σε συμφωνία με προγενέστερες μελέτες [131,238], ενώ απουσία αυτών παρατηρήθηκε στη φυσιολογική κοιλιακή αορτή. Ιδιαίτερο

ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι ο βαθμός της συσσώρευσης των λιπιδίων στο ΑΚΑ παρουσιάζει σημαντικές μεταβολές μεταξύ των διαφορετικών χιτώνων του αορτικού τοιχώματος όπως έχει αναφερθεί και στην αθηρωμάτωση [131,143,238]. Ειδικότερα παρατήθηκαν κρυστάλλοι χοληστερόλης και μεγάλου βαθμού εναποθέσεις λιπιδίων στον υποενδοθηλιακό χώρο αορτής με ΑΚΑ, ενώ πολύ μικρότερος ήταν ο βαθμός της συσσώρευσής τους στο μεσαίο αορτικό χιτώνα. Τα παραπάνω ευρήματά μας έρχονται σε συμφωνία και ενισχύουν προγενέστερες μελέτες οι οποίες αναφέρουν το σχηματισμό κρυστάλλων χοληστερόλης επίσης στον έσω χιτώνα του τοιχώματος ανευρυσματικής αορτής [189]. Επιπροσθέτως παρατηρήθηκε αποδιοργάνωση της αρχιτεκτονικής του αορτικού τοιχώματος με ΑΚΑ η οποία ήταν ιδιαίτερα έντονη στον έσω χιτώνα, όπου δηλαδή υπάρχουν και οι μεγάλης συγκέντρωσης εναποθέσεις λιπιδίων. Όλα τα παραπάνω συνηγορούν στο ότι τα λιπίδια παγιδεύονται στο τοίχωμα ανευρυσματικής αορτής και υποδηλώνουν πιθανή απορρύθμιση του μηχανισμού εκροής της χοληστερόλης στην ανευρυσματική νόσο.

Έχει διαπιστωθεί ότι κατά την ανάπτυξη και εξέλιξη των αθηρωματικών πλακών, λεία μυϊκά κύτταρα που φυσιολογικά εντοπίζονται στο μεσαίο αορτικό χιτώνα μεταναστεύουν στον υποενδοθηλιακό χώρο της αορτής. Η επικρατούσα θεωρία υποστηρίζει ότι η μετανάστευση των ΛΜΚ λαμβάνει χώρα ως απόκριση σε ερεθίσματα του μικροπεριβάλλοντος του αορτικού τοιχώματος όπως η πυροδότηση φλεγμονωδών διεργασιών με επακόλουθη συσσώρευση φλεγμονωδών κυττάρων που στην πλειονότητά τους είναι μακροφάγα καθώς και η συσσώρευση λιπιδικών προϊόντων. Ειδικότερα φαίνεται ότι μακροφάγα που απαντώνται στον υποενδοθηλιακό χώρο της αορτής προσλαμβάνουν μέσω των εκκαθαριστικών υποδοχέων την οξειδωμένη μορφή της LDL (ox-LDL) με αποτέλεσμα να μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα [130-138]. Η πρόσληψη της ox-LDL από τα μακροφάγα προκαλεί απελευθέρωση φλεγμονωδών μεσολαβητών τα οποία προσελκύουν τα ΛΜΚ στον έσω αορτικό χιτώνα. Μελέτες έχουν περιγράψει ότι τα ΛΜΚ που έχουν μεταναστεύσει έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν ox-LDL όπως τα μακροφάγα με επακόλουθο την εναπόθεση λιπιδίων στο εσωτερικό τους και τη περαιτέρω μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα [132,144,168]. Η συσσώρευση αυτή των αφρωδών κυττάρων επιφέρει πάχυνση του υποενδοθηλιακού χώρου η οποία αποτελεί και το πρώτο μικροσκοπικό εύρημα των αθηρωματικών πλακών [129,131]. Τα ευρήματα αναφορικά με τη συσσώρευση των λιπιδίων στο ΑΚΑ, έδωσε το έναυσμα να διερευνηθεί και η παρουσία αφρωδών κυττάρων στην ανευρυσματική

αορτή. Αρχικά εστιάσθηκε το ενδιαφέρον μας στα ΛΜΚ τα οποία κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στην παθοφυσιολογία του ΑΚΑ καθώς υφίστανται απόπτωση και μείωση της πυκνότητας τους συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην εκφύλιση του μεσαίου χιτώνα αορτικού τοιχώματος με ανεύρυσμα. Βασισμένοι σε μελέτες που αναφέρουν την παρουσία των ΛΜΚ και στον υποενδοθηλιακό χώρο αθηρωματικής αορτής [165], θελήσαμε να προσδιορίσουμε τον εντοπισμό τους στο αορτικό τοίχωμα του ανευρύσματος. Με ανοσοανίχνευση της α-ακτίνης λείου μυϊκού τύπου, χαρακτηριστικού πρωτεϊνικού δείκτη των κυττάρων, παρατηρήσαμε, για πρώτη φορά, ανοσοδραστικότητα αυτής στο μεσαίο χιτώνα ανευρυσματικής και φυσιολογικής αορτής, όπως αναμενόταν, καθώς επίσης και στον έσω χιτώνα του ανευρύσματος. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι στην ανευρυσματική νόσο λεία μυϊκά κύτταρα απαντώνται και στον υποενδοθηλιακό χώρο σε αντίθεση με τη φυσιολογική αορτή όπου ο εντοπισμός των ΛΜΚ περιορίζεται στο μεσαίο χιτώνα. Επιπλέον σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες [108], μειωμένα βρέθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της α-ακτίνης λείου μυϊκού τύπου και στο μεσαίο χιτώνα αλλά και στον υποενδοθηλιακό χώρο της ανευρυσματικής αορτής συγκριτικά με της φυσιολογικής.

Τα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι μειωμένα επίπεδα της α-ακτίνης λείου μυϊκού τύπου έχουν συσχετιστεί με μετατροπή των ΛΜΚ σε αφρώδη κύτταρα [75,168]. Τα αποτελέσματά μας όσο αφορά τα επίπεδα έκφρασης της α-ακτίνης στο ΑΚΑ, μας παρακίνησαν να διερευνήσουμε την παρουσία αφρωδών κυττάρων λείας μυϊκής προέλευσης στο ανεύρυσμα. Ιστολογική ανάλυση με τη χρήση λιποδιαλυτών χρώσεων και σήμανση με αντίσωμα έναντι της α-ακτίνης λείου μυϊκού τύπου έδειξε για πρώτη φορά ότι, ομοίως με τα ευρήματά μας στην αθηρωματική αορτή, μεγάλος αριθμός ΛΜΚ που εντοπίζονται στον υποενδοθηλιακό χώρο της ανευρυσματικής αορτής έχει μετατραπεί σε αφρώδη κύτταρα όπως υποδεικνύεται από την παρουσία μεγάλης συγκέντρωσης σταγονιδίων λίπους στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Διάσπαρτα ΛΜΚ που έχουν συσσωρεύσει λιπίδια παρατηρήθηκαν και στον μεσαίο χιτώνα της ανευρυσματικής αορτής, ενώ παράλληλα ανοσοανίχνευση της πρωτεΐνης CD68, η οποία αποτελεί δείκτη των μακροφάγων, με επακόλουθη χρήση λιποδιαλυτής χρώσης ανέδειξε εναποθέσεις λιπιδίων και σε μακροφάγα κύτταρα κυρίως του έσω αορτικού χιτώνα στο ανεύρυσμα.

Ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν μελέτες που αναφέρουν ότι η συσσώρευση των λιπιδίων σε λεία μυϊκά κύτταρα των αθηρωματικών αλλοιώσεων

σχετίζεται με τροποποιήσεις στο φαινότυπό τους [165]. Συγκεκριμένα έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η έκθεση των ΛΜΚ σε λιπίδια και προϊόντα τους όπως η ox-LDL συνεπάγεται τη μεταστροφή της φαινοτυπικής τους κατάστασης από το φυσιολογικό συσταλτικό φαινότυπο στον παθολογικό συνθετικό [75,81]. Οι δύο φαινότυποι παρουσιάζουν μεταξύ τους σημαντικές διαφορές που αφορούν στη μορφολογία τους, στις κυτταρικές τους λειτουργίες αλλά και στον εντοπισμό τους στο αορτικό τοίχωμα. Ειδικότερα αναφέρεται ότι τα ΛΜΚ του συνθετικού φαινοτύπου, σε αντίθεση με αυτά του συσταλτικού, εντοπίζονται στον υποενδοθηλιακό χώρο αθηρωματικής αορτής και εμφανίζουν αυξημένη τάση συσσώρευσης λιπιδίων διότι εκφράζουν ειδικούς υποδοχείς πρόσληψης αυτών. Επιπροσθέτως πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης χαρακτηριστικών πρωτεϊνικών δεικτών του συγκεκριμένου κυτταρικού τύπου μεταξύ των δύο φαινοτύπων. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα συσταλτικών πρωτεϊνών όπως η α-ακτίνη λείου μυϊκού τύπου και η δεσμίνη και αυξημένα επίπεδα έκφρασης της βιμεντίνης σηματοδοτούν τη φαινοτυπική διαφοροποίηση των ΛΜΚ προς το συνθετικό φαινότυπο [75,78,81-84].

Καθώς τροποποιήσεις του φαινοτύπου των ΛΜΚ έχουν συσχετιστεί με παθολογικές καταστάσεις της αορτής, ερευνητικές ομάδες επικεντρώθηκαν στη διαλεύκανση της φαινοτυπικής κατάστασης των κυττάρων στο ανεύρυσμα. Οι μέχρι σήμερα βιβλιογραφικές αναφορές υποστηρίζουν ότι τα ανευρυσματικά λεία μυϊκά κύτταρα παρουσιάζουν μια ξεχωριστή μορφολογία και φαινοτυπική κατάσταση [109-112], χωρίς ωστόσο να υπάρχει αναφορά που να συσχετίζει το φαινότυπό τους με τα επίπεδα λιπιδίων στην ανευρυσματική νόσο κοιλιακής αορτής. Βασισμένοι στην παρατήρησή μας σχετικά με παρουσία λείων μυϊκών κυττάρων στον υποενδοθηλιακό χώρο αορτής με ΑΚΑ καθώς και οι μεγάλοι βαθμού εναποθέσεις λιπιδίων που παρατηρήσαμε στο κυτταρόπλασμά τους, μας παρότρυνε να διερευνήσουμε τη φαινοτυπική τους κατάσταση στην πάθηση. Ανοσοϊστοχημική μελέτη έδειξε για πρώτη φορά ότι σε μεγάλο αριθμού λείων μυϊκών κυττάρων του υποενδοθηλιακού χώρου και μεσαίου χιτώνα του αορτικού τοιχώματος με ΑΚΑ παρατηρήθηκε έκφραση της α-ακτίνης λείου μυϊκού τύπου και της βιμεντίνης, χαρακτηριστικών πρωτεϊνών του συσταλτικού και συνθετικού φαινοτύπου, αντιστοίχως. Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι παρεμφερή με τις παρατηρήσεις μας σχετικά με την έκφραση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών στην αθηρωματική αορτή όπου η αλλαγή του φαινοτύπου των ΛΜΚ είναι καλά μελετημένη. Η έκφραση της βιμεντίνης που ανιχνεύτηκε σε ανευρυσματικά ΛΜΚ υποδεικνύει ότι η φαινοτυπική διαφοροποίηση αυτών λαμβάνει

χώρα και στην ανευρυσματική νόσο καθιστώντας τη μετάβαση προς το συνθετικό φαινότυπο παθολογικό χαρακτηριστικό του ανευρύσματος. Η παραπάνω υπόθεση ενισχύεται και από την παρατήρησή μας ότι έκφραση βιμεντίνης δεν βρέθηκε σε ΛΜΚ της φυσιολογικής αορτής υποδεικνύοντας τη διατήρηση του συσταλτικού τους φαινοτύπου.

Στα πλαίσια των μελετών σχετικά με τη συσσώρευση των λιπιδίων και την παρουσία αφρωδών κυττάρων στο αορτικό τοίχωμα αθηρωματικής αορτής, έχει περιγραφεί ότι τα παραπάνω χαρακτηριστικά αποδίδονται σε απορρύθμιση της ισορροπίας στους μηχανισμούς εισόδου-εξόδου των λιπιδίων. Ειδικότερα έχει αναφερθεί ότι οι εναποθέσεις των λιπιδίων στην αορτή είτε εξωκυττάρια είτε ενδοκυττάρια σχετίζονται με διαταραγμένη λειτουργία του μηχανισμού της ανάστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης [119-120,140]. Κύρια μόρια του μηχανισμού είναι ο πυρηνικός υποδοχέας LXR που δρα ως μεταγραφικός παράγοντας και επάγει την έκφραση της πρωτεΐνης-μεταφορέα ABCA1 η οποία λειτουργεί ως αντλία λιπιδίων και μεταφέρει τη χοληστερόλη εκτός του κυττάρου μέσω της απολιποπρωτεΐνης AI (ApoAI) [149-151,156-160]. Αρχικά διερευνήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των δύο ισοτύπων του υποδοχέα LXR, των LXRα και LXRβ, καθώς και του γονιδίου-στόχου του, της ABCA1, στο σύνολο του αορτικού τοιχώματος ανευρυσματικής, φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής. Παρατηρήθηκε ότι παρόλο που τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των ανωτέρω γονιδίων δεν διέφεραν μεταξύ ανευρυσματικής και φυσιολογικής αορτής καθώς και μεταξύ αθηρωματικής συγκριτικά με τη φυσιολογική, παρουσίαζαν ωστόσο διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ των παθολογικών ιστών. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν μειωμένα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των LXRβ και ABCA1 στην αορτή με AKA σε σύγκριση με την αθηρωματική, ενώ τα επίπεδα του LXRα εμφάνιζαν τάση για μείωση στο συνολικό αορτικό τοίχωμα του ανευρύσματος. Τα ευρήματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με προγενέστερη μελέτη από τους Soumian και συν. οι οποίοι ανέφεραν μειωμένα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης της ABCA1 στο AKA με τη διαφορά ότι αυτά περιγράφηκαν συγκριτικά με αθηρωματική στεφανιαία αρτηρία [190].

Η ιστολογική ανάλυση που διεξήχθη στα πλαίσια της παρούσας διατριβής και υπέδειξε συσσώρευση λιπιδίων στον υποενδοθηλιακό χώρο του ανευρυσματικού αορτικού τοιχώματος, αποτέλεσε το έναυσμα της μελέτης για τη διερεύνηση του προτύπου έκφρασης των γονιδίων που συμμετέχουν στην εκροή της χοληστερόλης στους επιμέρους χιτώνες του τοιχώματος της αορτής. Η μελέτη έδειξε, για πρώτη

φορά, ότι τα επίπεδα έκφρασης των δύο ισομορφών του LXR, LXRα και LXRβ, καθώς και της ABCA1 διαφοροποιούνται μεταξύ του υποενδοθηλιακού χώρου ανευρυσματικής, αθηρωματικής και φυσιολογικής αορτής. Πιο συγκεκριμένα μειωμένα βρέθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων LXRα, LXRβ και της ABCA1 στον υποενδοθηλιακό χώρο αορτής με ΑΚΑ συγκριτικά με της αθηρωματικής και φυσιολογικής αορτής, ενώ τα επίπεδα τους δε μεταβάλλονταν μεταξύ του υποενδοθηλιακού χώρου αθηρωματικής και φυσιολογικής κοιλιακής αορτής. Σε συμφωνία με τα μεταγραφικά επίπεδα των LXRα και LXRβ, μειωμένη βρέθηκε και η πρωτεϊνική τους έκφραση τον υποενδοθηλιακό χώρο του αορτικού τοιχώματος με ΑΚΑ. Τα παραπάνω αποτελέσματα σχετικά με την έκφραση των γονιδίων LXRα και LXRβ τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο υποδεικνύουν χαμηλή μεταγραφική δραστηριότητα και των δύο ισοτύπων του LXR υποδοχέα, γεγονός που αποτελεί πιθανή εξήγηση για τη μειωμένη έκφραση της ABCA1 που παρατηρήσαμε στο ΑΚΑ καθώς η έκφρασή της επάγεται από τον πυρηνικό υποδοχέα LXR.

Εν συνεχεία προκειμένου να αποκτήσουμε μια πλησιέστερη εικόνα της έκφρασης γονιδίων του μηχανισμού εκροής της χοληστερόλης, διερευνήθηκε για πρώτη φορά περαιτέρω η κατανομή της έκφρασής τους στους επιμέρους χιτώνες του αορτικού τοιχώματος. Το ενδιαφέρον μας επικεντρώθηκε στο μεσαίο και έσω χιτώνα της αορτής όπου παρατηρήσαμε τις εναποθέσεις των λιπιδίων και την παρουσία αφρωδών κυττάρων. Προκειμένου να αποκτηθεί μια πλησιέστερη εικόνα της έκφρασής τους, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική μελέτη του πυρηνικού υποδοχέα LXRα, καθώς επίσης και του γονιδίου στόχου του LXR, της ABCA1 σε ιστούς ανευρυσματικής, φυσιολογικής και αθηρωματικής μη ανευρυσματικής κοιλιακής αορτής η οποία έδειξε, για πρώτη φορά, σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασής τους μεταξύ των υπό μελέτη ιστών. Διαπιστώθηκε ότι ο μεσαίος χιτώνας της ανευρυσματικής αορτής παρουσιάζει μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης των LXRα και ABCA1 συγκριτικά με το μεσαίο χιτώνα της φυσιολογικής και αθηρωματικής κοιλιακής αορτής. Αντιθέτως, αυξημένα βρέθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ABCA1 στο μεσαίο χιτώνα αθηρωματικού αορτικού τοιχώματος συγκριτικά με το φυσιολογικό, ενώ διαφορές δεν παρουσιάζει η έκφραση του LXRα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον επιδεικνύουν τα αποτελέσματά μας αναφορικά με το πρότυπο έκφρασης των παραπάνω πρωτεϊνών μεταξύ των χιτώνων του ίδιου αορτικού τοιχώματος. Συγκεκριμένα ο προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης των LXRα και ABCA1 ανέδειξε δραματικά μειωμένα επίπεδά τους στον έσω χιτώνα

της ανευρυσματικής αορτής συγκριτικά με το μεσαίο χιτώνα αυτής. Η κατανομή της έκφρασής τους εντός του ίδιου αορτικού τοιχώματος ακολουθεί το μοτίβο της αθηρωματικής νόσου όπου επίσης παρατηρήσαμε μεγάλο βαθμού μείωση της έκφρασης των LXRα και ABCA1 σε πρωτεϊνικό επίπεδο στον έσω χιτώνα συγκριτικά με το μεσαίο χιτώνα κοιλιακής αορτής με αθηρωμάτωση. Η παρατήρηση της τροποποίησης των πρωτεϊνικών επιπέδων της ABCA1 μεταξύ του έσω και μεσαίου χιτώνα στην αθηρωματική κοιλιακή αορτής συμφωνεί με αποτελέσματα πρόσφατης μελέτης η οποία ανέφερε σημαντική μείωση της ABCA1 στον έσω χιτώνα στεφανιαίας αρτηρίας με αθηρωμάτωση [143].

Τα αποτελέσματα της παρούσης διατριβής σχετικά με τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων LXRα, LXRβ και ABCA1 στο ΑΚΑ υποδηλώνουν απορρύθμιση της λειτουργίας του μηχανισμού εκροής της χοληστερόλης στην πάθηση. Ως εκ τούτου συνιστούν πιθανή εξήγηση για τη συσσώρευση των λιπιδίων που παρατηρήθηκε στο ΑΚΑ, ενώ το πρότυπο κατανομής της πρωτεϊνικής τους έκφρασης εντός του ίδιου του τοιχώματος εξηγεί και τις μεγάλου βαθμού εναποθέσεις των λιπιδίων που ανιχνεύτηκαν στον έσω χιτώνα της ανευρυσματικής αορτής. Επιπλέον η παραπάνω παρατήρηση σε συνδυασμό με τα ευρήματά μας σχετικά με την παρουσία λείων μυϊκών- και μακροφάγων- αφρωδών κυττάρων στο ΑΚΑ υποδηλώνει ότι ένα υποσύνολο των κυττάρων παρουσιάζει διαταραχές του μηχανισμού εκροής της χοληστερόλης με αποτέλεσμα τη συσσώρευση των λιπιδίων στο κυτταρόπλασμά τους. Επίσης λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι η έκθεση των ΛΜΚ σε λιπίδια συνδέεται με τροποποίηση της φαινοτυπικής τους κατάστασης, θα μπορούσε να προταθεί ότι η διαταραγμένη λειτουργία του μηχανισμού εξόδου των λιπιδίων στο ΑΚΑ σχετίζεται και με τη φαινοτυπική διαφοροποίηση που παρατηρήθηκε στα ανευρυσματικά ΛΜΚ έχοντας ως αποτέλεσμα τη μετάβασή τους από το συσταλτικό στο συνθετικό φαινότυπο. Επιπροσθέτως οι παρατηρούμενες διαφορές στα πρωτεϊνικά επίπεδα των LXRα και ABCA1 στο μεσαίο χιτώνα των παθολογικών ιστών στην επιμέρους σύγκριση του εκάστοτε χιτώνα με το μεσαίο της φυσιολογικής αορτής ενδεχομένως υποδεικνύει ότι διαταραχές του μηχανισμού εξόδου της χοληστερόλης στο ΑΚΑ επηρεάζουν τόσο το μεσαίο όσο και τον έσω χιτώνα του αορτικού τοιχώματος, ενώ αντιθέτως στην αθηρωματική αορτή φαίνεται ότι περισσότερο πλήττεται ο έσω αορτικός χιτώνας αναδεικνύοντας το ανεύρυσμα σε μια πιο επιβαρυντική και προχωρημένη παθολογία της αορτής συγκριτικά με την αθηρωμάτωση.

Στα πλαίσια της διερεύνησης της έκφρασης γονιδίων που ενέχονται στο μηχανισμό εκροής της χοληστερόλης στο ΑΚΑ, προσδιορίσθηκε περαιτέρω η έκφραση της απολιποπρωτεΐνης ΑΙ, ΑροΑΙ, κύριο πρωτεϊνικό συστατικό της λιποπρωτεΐνης HDL. Σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές οι οποίες περιγράφουν αυξημένα επίπεδα απολιποπρωτεϊνών στο τοίχωμα αθηρωματικής αορτής [242-246], ανοσοανίχνευση της ΑροΑΙ υπέδειξε αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της απολιποπρωτεΐνης στο μεσαίο χιτώνα αθηρωματικής κοιλιακής αορτής συγκριτικά με το μεσαίο χιτώνα της φυσιολογικής, ενώ η ΑροΑΙ εμφάνιζε ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα έκφρασης στον έσω χιτώνα αορτής με αθηρωμάτωσης συγκριτικά με το μεσαίο χιτώνα αυτής. Ομοίως με την αθηρωματική αορτή, αυξημένα βρέθηκαν για πρώτη φορά και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ΑροΑΙ στο τοίχωμα αορτής με ΑΚΑ συγκριτικά με τη φυσιολογική αορτή, ενώ ιδιαίτερα έντονη ήταν η ανοσοδραστικότητά της σε περιοχές του τοιχώματος όπου η ιστολογική ανάλυση υπέδειξε τις εναποθέσεις λιπιδίων.

Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι ενώ παρατηρήθηκαν αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της ΑροΑΙ στο ΑΚΑ, προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει μειωμένα επίπεδα της απολιποπρωτεΐνης στο ορό των ασθενών [178,183] καθώς επίσης και της HDL [23,178-179], όπου η απολιποπρωτεΐνη ΑΙ συνιστά κυρίαρχο πρωτεϊνικό της συστατικό. Ενώ υπήρχε μία μακροχρόνια άποψη ότι τα επίπεδα των ΑροΑΙ και HDL στο πλάσμα περιφερικού αίματος παρέχουν μια καλή εικόνα της βιολογικής τους δραστηριότητας και των επιπέδων τους στο αορτικό τοίχωμα, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι τα κυκλοφορούντα επίπεδα της ΑροΑΙ δεν αντικατοπτρίζουν τα επίπεδα της στον ιστό αορτικού τοιχώματος [247]. Συγκεκριμένα οι DiDonato και συν. (2013) αναφέρουν ότι η ΑροΑΙ που ανιχνεύεται στο τοίχωμα αθηρωματικής αορτής είναι ιδιαίτερα οξειδωμένη, λιγότερο διαλυτή και διαθέτει μειωμένη λειτουργικότητα με επακόλουθο τη διαταραχή στην εκροή της χοληστερόλης υποδεικνύοντας μια πιθανή εξήγηση για το μοτίβο έκφρασης της απολιποπρωτεΐνης στην αθηρωματική αορτή [247]. Τα ευρήματα της παραπάνω μελέτης σε συνδυασμό με τη συσσώρευση των λιπιδίων που παρατηρήσαμε στο ανεύρυσμα υποδηλώνουν ότι η ΑροΑΙ εγκλωβίζεται στο αορτικό τοίχωμα στο ΑΚΑ με αποτέλεσμα τα αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασής της που προσδιορίσαμε στην ανευρυσματική νόσο κοιλιακής αορτής.

Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν εμπλοκή του μηχανισμού ανάστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης ΑΚΑ γεγονός που μας παρότρυνε σε επόμενο στάδιο της παρούσας διατριβής να διερευνήσουμε τους μοριακούς

μηχανισμούς που ενέχονται στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την έξοδο της χοληστερόλης με σκοπό την ανάδειξη πιθανών μελλοντικών θεραπευτικών στόχων.

Η επιστημονική έρευνα τα τελευταία χρόνια έχει στρέψει το ενδιαφέρον της στη διερεύνηση της συμμετοχής επιγενετικών μηχανισμών στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που έχουν συσχετιστεί με την παθολογία του ΑΚΑ [248-249]. Στα πλαίσια αυτής της προσέγγισης, σημαντική θέση κατέχουν τα microRNAs τα οποία συνιστούν μικρές μη κωδικές αλληλουχίες RNA που δρουν ως ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης [191,250-251]. Τα microRNAs αποτελούν αρνητικούς ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης καθώς την αποσιωπούν είτε καταστέλλοντας τη μετάφραση είτε αποδομώντας το mRNA το οποίο στοχεύουν [191,194,252]. Η ικανότητά τους να ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων έχει αναδείξει ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθολογία αρκετών νοσημάτων, ενώ επίσης τα έχει καταστήσει πιθανούς θεραπευτικούς στόχους για την αντιμετώπισή τους. Μελέτες έχουν αναγνωρίσει ένα σημαντικό αριθμό miRNAs που υπερεκφράζονται και υποεκφράζονται στο ΑΚΑ [206-218], ενώ αρκετά είναι και τα βιβλιογραφικά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι τα miRNAs ενέχονται και στη ρύθμιση γονιδίων του μεταβολισμού των λιπιδίων [219-231]. Ένα νέο microRNA το οποίο προσφάτως αποδείχθηκε ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση γονιδίων του μηχανισμού εξόδου των λιπιδίων είναι το miR-10b [232] για το οποίο μέχρι στιγμής δεν έχει αναφερθεί λειτουργικός ρόλος με το ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής.

Στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκε για πρώτη φορά ο ρόλος του συγκεκριμένου microRNA στο μηχανισμό ανάστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης καθώς και η εμπλοκή του στη φαινοτυπική διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων στο ανεύρυσμα. Αρχικά προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασής του σε ιστό αορτικού τοιχώματος και διαπιστώθηκε για πρώτη φορά ότι το miR-10b υπερεκφράζεται στον υποενδοθηλιακό χώρο ανευρυσματικής αορτής συγκριτικά με της φυσιολογικής. Η παρατήρηση ότι η έκφραση του miR-10b είναι αυξημένη στο ΑΚΑ στην περιοχή του αορτικού τοιχώματος όπου παρατηρήθηκε αφενός μειωμένη έκφραση των γονιδίων του μηχανισμού εκροής της χοληστερόλης και αφετέρου τη φαινοτυπική διαφοροποίηση των ΛΜΚ έδωσε το έναυσμα για περαιτέρω μελέτη του ρόλου του στο ανεύρυσμα.

Συνεχίζοντας διερευνήθηκε σε ένα πρώτο στάδιο το ενδεχόμενο πιθανής επίδρασης του συγκεκριμένου microRNA στα γονίδια που ενέχονται στην έξοδο των λιπιδίων από τα κύτταρα. Δεδομένου ότι τα microRNAs ενέχονται στη ρύθμιση της

γονιδιακής έκφρασης μέσω πρόσδεσης στην 3' αμετάφραστη περιοχή (3'UTR) του mRNA που στοχεύουν, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων ανάλυση της 3'UTR περιοχής του mRNA της ABCA1 και του LXRα για την ανεύρεση λειτουργικών θέσεων σύνδεσης του miR-10b. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν την ύπαρξη αλληλουχίας που αναγνωρίζει το miR-10b στην 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA της ABCA1 μέσω της οποίας ασκεί τη δράση του, ενώ ο LXRα δε διαθέτει αλληλουχία συμπληρωματική με το miR-10b. Καθώς τα υπολογιστικά προγράμματα παρέχουν πληροφορίες μόνο για την αντιστοίχιση των microRNAs με τα mRNAs-στόχους, ακολούθησε πειραματική μελέτη προκειμένου να ελεγχθεί σε κυτταρικό επίπεδο η αλληλεπίδραση του miR-10b με τα αντίστοιχα mRNA-στόχους. Δεδομένης της έλλειψης πρωτογενών καλλιιεργειών ΛΜΚ του συσταλτικού φαινοτύπου [76,82,88-89] και προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος του υπερεκφραζόμενου στο ΑΚΑ miR-10b, επιδράσαμε με τον αναστολέα του σε καλλιέργειες ανευρυσματικών λείων μυϊκών κυττάρων. Η χρήση του αναστολέα του miR-10b είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των μεταγραφικών και πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης της ABCA1, κύριας πρωτεΐνης για τη μεταφορά των λιπιδίων εκτός του κυττάρου, ενώ η αποσιώπηση του συγκεκριμένου microRNA δεν είχε κάποια επίδραση στα μεταγραφικά επίπεδα του LXRα υποδοχέα υποδεικνύοντας ότι το miR-10b εμπλέκεται στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης της ABCA1. Τα ευρήματά μας αυτά ενισχύουν προηγούμενη μελέτη που αναφέρει ότι το miR-10b καταστέλλει την έκφραση της ABCA1 σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο σε μακροφάγα κύτταρα αθηρωματικής αορτής [232].

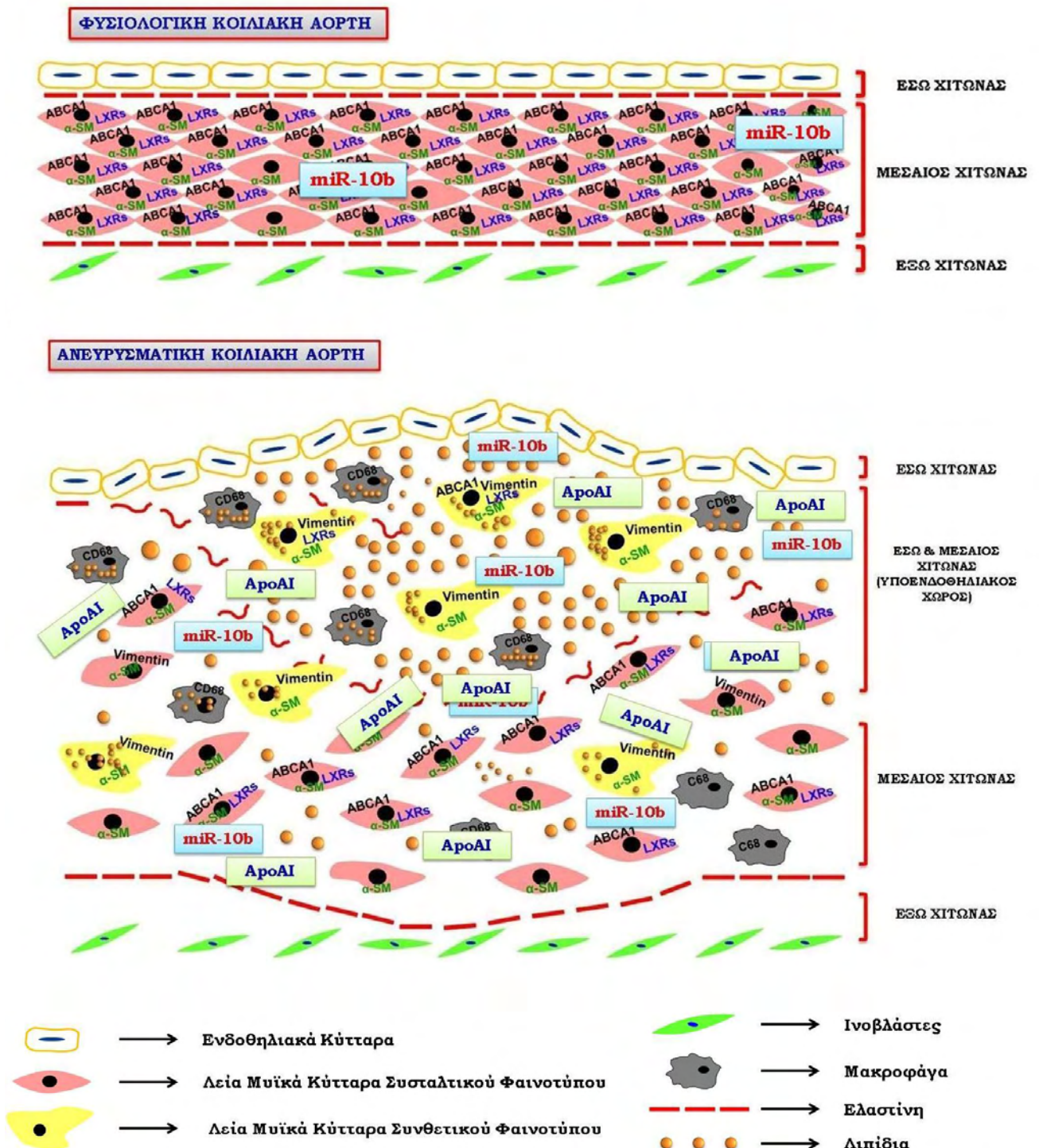
Μετά την επιβεβαίωση της εμπλοκής του miR-10b στη ρύθμιση της έκφρασης της ABCA1 τα επίπεδα της οποίας βρέθηκαν μειωμένα στο ΑΚΑ, μελετήθηκε για πρώτη φορά η επίδρασή του στο φαινότυπο των λείων μυϊκών κυττάρων τα οποία βρέθηκε ότι υιοθετούν τον παθολογικό συνθετικό φαινότυπο στο ανεύρυσμα. Η εμπλοκή του miR-10b σε τροποποιήσεις φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των ΛΜΚ περιγράφηκε από μία πρόσφατη μελέτη όπου αυξημένη έκφραση του miR-10b σε αθηρωματικές αλλοιώσεις της στεφανιαίας αρτηρίας συσχετίστηκαν με μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα της α-ακτίνης λείου μυϊκού τύπου [237]. Προς αυτήν την κατεύθυνση πραγματοποιήθηκε αναστολή της έκφρασης του miR-10b σε καλλιέργειες λείων μυϊκών κυττάρων του ανευρύσματος και διαπιστώθηκε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης της α-ακτίνης λείου μυϊκού τύπου καθώς και μείωση της πρωτεϊνικής έκφρασης της βιμεντίνης, χαρακτηριστικών πρωτεϊνικών δεικτών του συσταλτικού και συνθετικού φαινοτύπου των ΛΜΚ, αντιστοίχως. Η

διαφοροποιημένη έκφραση που παρατηρήθηκε στα επίπεδα των ανωτέρω πρωτεϊνών μετά την αποσιώπηση του miR-10b συνηγορούν υπέρ του πιθανού ρόλου του miR-10b στη μετάβαση των ΛΜΚ από στο φυσιολογικό συσταλτικό στον παθολογικό συνθετικό φαινότυπο στην ανευρυσματική νόσο κοιλιακής αορτής.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα διατριβή, διερευνήθηκε η έκφραση γονιδίων που ενέχονται στο μηχανισμό ανάστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης, η εμπλοκή τους στην παθολογία του ανευρύσματος καθώς και οι μοριακοί μηχανισμοί ρύθμισης της έκφρασης τους στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής. Συγκεκριμένα αναδείχθηκε, για πρώτη φορά, απορρύθμιση του μηχανισμού εκροής της χοληστερόλης στο ανεύρυσμα όπως υποδεικνύεται από τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης των δύο υποτύπων του πυρηνικού υποδοχέα LXR, LXRα και LXRβ, και του γονιδίου στόχου του, της ABCA1 καθώς και τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της ApoA1 στο αορτικό τοίχωμα της ανευρυσματικής αορτής. Οι παρατηρούμενες διαταραχές στην έκφραση των παραπάνω μορίων φαίνεται ότι επάγουν τη συσσώρευση λιπιδίων στο τοίχωμα της αορτής καθώς και στο κυτταρόπλασμα ορισμένων μακροφάγων και λείων μυϊκών κυττάρων έχοντας ως αποτέλεσμα τη μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην παθογένεια του ανευρύσματος. Επιπλέον η μελέτη έδειξε ότι η διαταραγμένη λειτουργία του μηχανισμού εξόδου των λιπιδίων στα λεία μυϊκά κύτταρα του ανευρύσματος συνηγορεί υπέρ τροποποιήσεων της φαινοτυπικής τους κατάστασης με επακόλουθο τη μετάβαση τους από το φυσιολογικό συσταλτικό φαινότυπο στον παθολογικό συνθετικό φαινότυπο, επιβαρύνοντας με αυτόν τον τρόπο την παθοφυσιολογία της ανευρυσματικής αορτής. Επιπλέον στα πλαίσια της διατριβής περιγράφηκε, για πρώτη φορά, συμμετοχή του miR-10b στην παθολογία της ανευρυσματικής νόσου μέσω επιγενετικής ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων που ρυθμίζουν την έξοδο των λιπιδίων από τα κύτταρα καθώς και της επίδρασής του στα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνικών δεικτών, χαρακτηριστικών των δύο φαινοτύπων των λείων μυϊκών κυττάρων. Συγκεκριμένα αναδείχθηκε ότι αναστολή του υπερεκφραζόμενου στο ΑΚΑ miR-10b επάγει την αύξηση των επιπέδων έκφρασης της ABCA1, μορίου με πρωτεύοντα ρόλο στο μηχανισμό εκροής της χοληστερόλης, καθώς επίσης φαίνεται ότι επιδρά θετικά στα επίπεδα έκφρασης της α-ακτίνης λείου μυϊκού τύπου χαρακτηριστικής πρωτεΐνης του συσταλτικού φαινοτύπου των ΛΜΚ, ενώ ανασταλτική δράση έχει στην έκφραση της βιμεντίνης, η οποία χαρακτηρίζει τα ΛΜΚ στο συνθετικό φαινότυπο. Συνεπώς φαίνεται ότι η σημασία της αποσιώπησης της δράσης του συγκεκριμένου microRNA έγκειται στη λειτουργία του μηχανισμού ανάστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης,

στην αποτροπή της συσσώρευσης των λιπιδίων και της μετατροπής κυττάρων του αρτηρικού τοιχώματος σε αφρώδη κύτταρα, διεργασιών που σχετίζονται με εκφύλιση και αναδιοργάνωση του αρτηρικού τοιχώματος, καθώς και στην αποκατάσταση του φυσιολογικού φαινοτύπου των λείων μυϊκών κυττάρων συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στη διατήρηση της δυναμικής του αρτηρικού τοιχώματος (Εικόνα 53). Όλα τα παραπάνω αναδεικνύουν τη χρήση του αναστολέα του miR-10b ως πιθανό μοριακό στόχο για την αναστολή της εξέλιξης του ανευρύσματος κοιλιακής αρτηρίας. Διαγραμματικά τα αποτελέσματα της παρούσης διατριβής μπορούν να απεικονιστούν ως εξής (Εικόνα 53):

A



B



Γ



Εικόνα 53: Διαγραμματική απεικόνιση της συμβολής του μηχανισμού εκροής της χοληστερόλης (Α-Β) και του ρόλου του miR-10b (Γ) στο Ανεύρυσμα Κοιλιακής Αορτής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Rutherford. R.B., *Vascular Surgery*. Philadelphia: W,B, Saunders. 2005
2. Gray. H., *Anatomy of the Human Body*. 20th ed. Philadelphia: Lea & Febifer, 1918
3. Johnston. K.W., Rutherford. R.B., Tilson. M.D., Suggested standards for reporting on arterial aneurysms. Subcommittee on Reporting Standards for Arterial Aneurysms, Ad Hoc Committee on Reporting Standards, Society for Vascular Surgery and North American Chapter, International Society for Cardiovascular Surgery. *J Vasc Surg*. 1991. 13(3):452-8
4. Cao. P., Giannoukas. A.D., Mol. F.L., Veller. M., *Vascular Aneurysms*. University of Thessaly Press.
5. Koutsias. S., Antoniou. G., Karathanos. C., Endovascular treatment of infrarenal abdominal aortic aneurysm with short and angulated neck in high-risk patient. *Case Rep Vasc Med*. 2013. 2013:898024
6. Nordon. I.M., Hinchliffe. R.J., Loftus. I.M., Thompson. M.M., Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Nat Rev Cardiol*. 2011. 8(2):92-102
7. van den Vliet. J.A., Boll. A.P., Abdominal aortic aneurysm. *Lancet*. 1997. 349:863-866
8. Kent. K.C., *Clinical practice. Abdominal aortic aneurysms*. *N Engl J Med*. 2014. 371(22):2101-8
9. Roger. V.L., Go. A.S., Lloyd-Jones. D.M., et al., Executive summary: heart disease and stroke statistics—2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2012. 125(1): 188-97
10. Αντωνίου. Γ., Καραθάνος. Χ., Σπανός. Κ., και συν., Προσυμπτωματικός έλεγχος (screening) ανευρύσματος κοιλιακής αορτής: Νεότερα δεδομένα και ανασκόπηση της βιβλιογραφίας. *Ελληνική Αγγειοχειρουργική*. 2008. 14:153-9
11. Parodi. J.C., Palmaz. J.C., Barone. H.D., Transfemoral intraluminal graft implantation for abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg*. 1991. 5(6):491-9
12. Gillum. R.F., Epidemiology of aortic aneurysm in the United States. *J Clin Epidemiol*. 1995. 48(11):1289-98
13. Kuvivaniemi. H., Elmore. J.R., Opportunities in Abdominal Aortic Aneurysm research: epidemiology, genetics, and pathophysiology. *Ann Vasc Surg*. 2012. 26(6):862-70
14. Scott. R.A., Bridgewater. S.G., Ashton. H.A., Randomized clinical trial of screening for abdominal aortic aneurysm in women. *Br J Surg*. 2002. 89(3):283-5
15. Moll. F.L., Powell. J.T., Fraedrich. G., et al., Management of abdominal aortic aneurysm clinical practice guidelines of the European society for vascular surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2011. Suppl 1:S1-S58
16. Roger. V.L., Go. A.S., Lloyd-Jones. D.M., et al., Heart disease and stroke statistics—2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2012.
17. Wilmink. A.B., Quick. C.R., Epidemiology and potential for prevention of abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg*. 1998. 85:155
18. Cowan. JA.Jr., Dimick. J.B., Henke. P.K., et al., Epidemiology of aortic aneurysm repair in the United States from 1993 to 2003. *Ann N Y Acad Sci*. 2006. 1085:1-10
19. Ashton. H.A., Baxton. M.J., Day. N.E., et al., The Multicentre Aneurysm Screening Study (MASS) into the effect of abdominal aortic aneurysm screening on mortality in men: a randomized controlled trial. *Lancet*. 2002. 360(9345):1531-9
20. Norman. P.E., Jamrozik. K., Lawrence-Brown. M.M., Population based randomized controlled trial on impact of screening on mortality from abdominal aortic aneurysm. *BMJ*. 2004. 329(7477):1259
21. Lindholt. J.S., Juul. S., Fasting. H., Henneberg. E.W., Screening for abdominal aortic aneurysms: single centre randomized controlled trial. *BMJ*. 2005. 330(7494):750
22. Wilmik. A.B., Hubbard. C.S., Day. N.E., Quick. C.R., The incidence of small abdominal aortic aneurysms and the change in normal infrarenal aortic diameter: Implications for screening. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2001. 21(2):165-70
23. Forsdahl. S.H., Singh. K., Solberg. S., Jacobsen. B.K., Risk factors for abdominal aortic aneurysms: a 7-year prospective study: the Tromø study, 1994-2001. *Circulation*. 2009. 119(6):2202-8

24. Vardulaki. K.A., Prevost. T.C., Walker. N.M., et al., Incidence among men of asymptomatic abdominal aortic aneurysms: estimated from 500 screen detected cases. *J Med Screen*. 1999. 6(1):50-4
25. Lederle. F.A., Johnson. G.R., Wilson. S.E., et al., Yield of repeated screening for abdominal aortic aneurysm after 4-year interval. Aneurysm detection and management veterans affairs Cooperative Study investigators. *Arch Intern Med*. 2000. 160(8):1117-21
26. Salem. M.K., Rayt. H.S., Hussien. G., et al., Should Asian men be included in abdominal aortic aneurysm screening programmes? *Eur J Vasc Endovasc*. 2009. 38(6):748-9
27. Acosta. S., Ogren. M., Bengtsson. H., et al., Increasing incidence of ruptured abdominal aortic aneurysm: a population-based study. *J Vasc Surg*. 2006. 44(2):237-43
28. Kent. L.C., Zwolak. R.M., Egorova. N.M., et al., Analysis of risk factors for abdominal aortic aneurysm in a cohort of more than 3 million individuals. *J Vasc Surg*. 2010. 52(3):539-48
29. Singh. K., Bønaa. K.H., Jacobsen. B.K., et al., Prevalence and risk factors of abdominal aortic aneurysms in a population-based study: The Tromsø Study. *Am J Epidemiol*. 2001. 154(3):235-44
30. Howard. D.P., Banerjee. A., Fairhed. J.F., et al., Age-specific incidence, risk factors and outcome of acute abdominal aortic aneurysms in a defined population. *Br J Surg*. 2015. 102(8):907-15
31. Bengtsson. H., Berggrist. D., Sternby. N.H., Increasing prevalence of abdominal aortic aneurysm: a necropsy study. *Eur J Surg*. 1992. 158(1):19-23
32. Hannawa. K.K., Eliason. J.L., Upchurch. G.R.Jr., Gender differences in abdominal aortic aneurysms. *Vascular*. 2009. Suppl:S30-9
33. Norman. P.E., Powell. J.T., Abdominal aortic aneurysm prognosis in women is worse than in men. *Circulation*. 2007. 115(22):2865-9
34. Ailawadi. G., Eliason. J.L., Roelofs. K.J., Gender differences in experimental abdominal aortic aneurysm formation. *Arterioscler Thromb Biol*. 2004. 24(11): 2116-22
35. Pyo. R., Lee. J.K., Shipley. J.M., Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase 9) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest*. 2000. 105(11):1641-9
36. Martin-McNulty. B., Tham. D.M., da Cunha. V., et al., 17 beta-estradiol attenuates development of angiotensin II-induced aortic abdominal aneurysm in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003. 23(9):1627-32
37. Lederle. F.A., Nelson. D.B., Joseph. A.M., Smoker's relative risk for aortic aneurysm compared with other smoking-related diseases: a systematic review. *J Vasc Surg*. 2003. 38(2):329-34
38. Wilming. T.B., Quick. C.R., Day. N.E., The association between cigarette smoking and abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 1999. 30(6):1099-105
39. Blanchard. J.F., Armenian. H.K., Friesen. P.P., Risk factors for abdominal aortic aneurysm: results of a case-control study. *Am J Epidemiol*. 2000. 151(6): 575-83
40. Wanhainen. A., Bergqvist. D., Boman. K., et al., Risk factors associated with abdominal aortic aneurysm: a population based study with historical and current data. *J Vasc Surg*. 2005. 41(3):390-6
41. Cornuz. J., Sidoti Pinto. C., Tevaearai. H., Egger. M., Risk factors for asymptomatic abdominal aortic aneurysm: systemic review and meta-analysis of population screening studies. *Eur J Public Health*. 2004. 14(4):343-9
42. Brown. L.C., Powell. J.T., Risk factors for aneurysm rupture in patients kept under ultrasound surveillance. UK Small Aneurysm Trial Participants. *Ann Surg*. 1999. 230(3):289-96
43. Gadowski. G.R., Ricci. M.A., Hendley. E.D., Plicher. D.B., Hypertension accelerates the growth of experimental aortic aneurysm. *J Surg Res*. 1993. 54(5):431-6
44. Aijan. R., Porter. K.E., Scott. D.J., Diabetes and the abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2010. 39(2):200-7
45. Lederle. F.A., Johnson. G.R., Wilson. S.E., et al., Prevalence and associations of abdominal aortic aneurysm detected through screening. Aneurysm Detection and Management (ADAM) Veterans Affairs Cooperative Study Group. *Ann Intern Med*, 1997. 126(6):441-9
46. Golledge. J., Karan. M., Moran. C.S., et al., Reduced expansion rate of abdominal aortic aneurysms in patients with diabetes may be related to monocyte-matrix interactions. *Eur Heart J*. 2008. 29(5):665-72

47. Sandford. R.M., Bown. M.J., London. N.J., Sayers. R.D., The genetic basis of abdominal aortic aneurysm: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2007. 33(4):381-90
48. Clifton. M.A., Familial abdominal aortic aneurysms. *Br J Surg.* 1977. 64(11):765-6
49. van Vlijmen-van Keulen. C.J., Pals. G., Rauwerd. J.A., Familial abdominal aortic aneurysm: a systematic review of a genetic background. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2000. 24(2):105-10
50. Larsson. E., Granath. F., Swedenborg. J., Hultgren. R., A population-based case-control study of the familial risk of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg.* 2009. 49(1):47-50
51. Hinterseher. I., Tromp. G., Kuivaniemi. H., Genes and abdominal aortic aneurysm. *Ann Vasc Surg.* 2011. 25(3):388-412
52. Ogata. T., Mackean. G.L., Cole. C.W., et al., The lifetime prevalence of abdominal aortic aneurysms among siblings of aneurysm patients is eightfold higher than among siblings of spouses: an analysis of 187 aneurysm families in Nova Scotia, Canada. *J Vasc Surg.* 2005. 42(5):819-7
53. Frydman. G., Walker. P.J., Summers. K., et al., The value of screening in siblings of patients with abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2003. 26(4):396-400
54. Majumder. P.P., St Jean. P.L., Ferrell. R.E., et al., On the inheritance of abdominal aortic aneurysm. *Am J Hum Genet.* 1991. 48(1):164-70
55. Johansen. K., Koepsell. T., Familial tendency for abdominal aortic aneurysms. *JAHA.* 1986. 256(14):1934-6
56. Wahlgren. C.M., Larsson. E., Magnusson. P.K., et al., Genetic and environmental contributions to abdominal aortic aneurysm development in a twin population. *J Vasc Surg.* 2010. 51(1):3-7
57. Golledge. J., Kuivaniemi. H., Genetics of abdominal aortic aneurysm. *Curr Opin Cardiol.* 2013. 28(3):290-6
58. Shibamura. H., Olson. J.M., van Vlijmen-van Keulen. C.J., et al., Genome scan for familial abdominal aortic aneurysm using sex and family history as covariates suggests genetic heterogeneity and identifies linkage to chromosome 19q13. *Circulation.* 2004. 109(17):2103-8
59. Van Vlijmen-van Keulen. C.J., Rauwerda. J.A., Pals. G., Genome-wide linkage in three Dutch families maps a locus for abdominal aortic aneurysms to chromosome 19q13.3. *Eur J Endovasc Surg.* 2005. 30(1):29-35
60. Biros. E., Norman. P.E., Walker. P.J., et al., A single nucleotide polymorphism in exon 3 of the kallikrein 1 gene is associated with large but not small abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis.* 2011. 217(2):452-7
61. Lilvis. J.H., Kyo. Y., Tromp. G., et al., Analysis of positional candidate genes in the AAA1 susceptibility locus for abdominal aortic aneurysms on chromosome 19. *BMC Med Genet.* 2011. 19:12-14
62. Baas. A.F., Medic. J., van't Slot. R., et al., Association study of single nucleotide polymorphism on chromosome 19q13 with abdominal aortic aneurysm. *Angiology.* 2010. 61(3):243-7
63. Kuivaniemi. H., Ryer. E.J., Elmore. J.R., et al., Update on abdominal aortic aneurysm research: from clinical to genetic studies. *Scientifica (Cairo).* 2014. 2014:564734
64. Helgadottir. A., Thorgeirsson. G., Magnusson. K.P., et al., The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. *Nat Genet.* 2008. 40(2):217-24
65. Elmore. J.R., Obmann. M.A., Kuivaniemi. H., et al., Identification of a genetic variant associated with abdominal aortic aneurysms on chromosome 3p12.3 by genome wide association. *J Vasc Surg.* 2009. 49(6):1525-31
66. Gretarsdottir. S., Baas. A.F., Thorleifsson. G., et al., Genome-wide association study identifies a sequence variant within the DAB2IP gene conferring susceptibility to abdominal aortic aneurysm. *Nat Genet.* 2010. 42(8):692-7
67. Bradley. D.T., Hughes. A.E., Badger. S.A., et al., A variant in LDLR is associated with abdominal aortic aneurysm. *Circ Cardiovasc Genet.* 2013. 6(5):98-504
68. Bown. M.J., Jones. G.T., Harrison. S.C., et al., Abdominal aortic aneurysm is associated with a variant in low-density lipoprotein receptor-related protein 1. *Am J Hum Genet.* 2011. 89(5):619-27
69. Choke. E., Cockerill. G.W., Laing. K., et al., Whole genome-expression profiling reveals a role for immune and inflammatory response in abdominal aortic aneurysm rupture. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2009. 37(3):305-10

70. Pugsley. M.K., Tabrizchi. R., The vascular system. An overview of structure and function. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2000. 44(2):333-40
71. Junqueira. L.C., Carneiro. J., Basic Histology Text and Atlas, 11th Edition. McGraw-Hill. 2005
72. Michael Schuliga (2015). Smooth Muscle and Extracellular Matrix Interactions in Health and Disease, Muscle Cell and Tissue, Dr. Kunihiro Sakuma (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/60403. Available from: <http://www.intechopen.com/books/muscle-cell-and-tissue/smooth-muscle-and-extracellular-matrix-interactions-in-health-and-disease>
73. Majesky. M.W., Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007. 27(6):1248-58
74. Schwartz. S.M., Heimark. R.L., Majesky. M.W., Developmental mechanisms underlying pathology of arteries. *Physiol Rev*. 1990. 70(4):1177-209
75. Owens. G.K., Kumar. M.S., Wamhoff. B.R., Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev*. 2004. 84(3):767-801
76. Shanahan. C.M., Weissberg. P.L., Smooth muscle cell phenotypes in atherosclerotic lesions. *Curr Opin Lipidol*. 1999. 10(6):507-13
77. Sho Shinohara, Satoko Shinohara, Takanori Kihara and Jun Miyake (2012). Regulation of Differentiated Phenotypes of Vascular Smooth Muscle Cells, Current Basic and Pathological Approaches to the Function of Muscle Cells and Tissues - From Molecules to Humans, Dr. Haruo Sugi(Ed.),InTech,DOI: 10.5772/48573. Available from: <http://www.intechopen.com/books/current-basic-and-pathological-approaches-to-the-function-of-muscle-cells-and-tissues-from-molecules-to-humans/regulation-of-differentiated-phenotypes-of-vascular-smooth-muscle-cells>
78. Rensen. S.S., Doerendans. P.A., van Eys. G.J., Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J*. 2007. 15(3):100-8
79. Rzczidlo. E.M., Martin. K.A., Powell. R.J., Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *J Vasc Surg*. 2007. Suppl A:A25-32
80. Gittenberger-de Groot. A.C., DeRuiter. M.C., Bergwerff. M., Poelmann. R.E., Smooth muscle cell origin and its relation to heterogeneity in development and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999. 19(7):1589-94
81. Hao. H., Gabbiani. G., Bochaton-Piallat. M.L., Arterial smooth muscle heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003. 23(9):1510-20
82. Chamley-Campbell. J., Campbell. G.R., Ross. R., The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev*. 1979. 59(1):1-61
83. Owens. G.K., Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev*. 1995. 75(3):487-517
84. Sobue. K., Hayashi. K., Nishida. W., Expressional regulation of smooth muscle cell-specific genes in association with phenotypic modulation. *Mol Cell Biochem*. 1999. 190(1-2):105-18
85. Shanahan. C.M., Weissberg. P.L., Smooth muscle cell heterogeneity: patterns of gene expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998. 18(3):333-8
86. Vukovic. I., Arsenijevic. N., Lackovic. V., Todorovic. V., The origin and differentiation potential of smooth muscle cells in coronary atherosclerosis. *Exp Clin Cardiol*. 2006. 11(2):123-8
87. Thyberg. J., Blomgren. K., Hedin. U., Dryjski. M., Phenotypic modulation of smooth muscle cells during the formation of neointimal thickenings in the rat carotid artery after balloon injury: An electron-microscopic and stereological study. *Cell Tiss Res*. 1995. 281(3):421-33
88. Song. J., Rolfe. B.E., Campbell. J.H., Campbell. G.R., Changes in three dimensional architecture of microfilaments in cultured vascular smooth muscle cells during phenotypic modulation. *Tissue Cell*. 1998. 30(3):324-333
89. Worth. N.F., Rolfe. B.E., Song. J., Campbell. G.R., Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganization of contractile and cytoskeletal proteins. *Cell Moti Cytoskeleton*. 2001. 49(3):130-45
90. Kuivaniemi. H., Ryer. E.J., Elmore. J.R., Understanding the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2015. 13(9):975-87
91. Wassef. M., Baxter. B.T., Chisholm. R.L., et al., Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms: a multidisciplinary research program supported by the National Heart, Lung, and Blood Institute. *J Vasc Surg*. 2001. 34(4):730-8

92. Ailawandi. G., Eliason. J.L., Upchurch. GR. Jr., Current concepts in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg.* 2003. 38(3):584-8
93. Lindholt. J.S., Shi. G.P., Inflammation, immune response, and infection in abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2006. 31(5):453-63
94. Curci. J.A., Thompson. R.W., Adaptive cellular immunity in aortic aneurysms: cause, consequence, or context? *J Clin Invest.* 2004. 114(2):168-71
95. Gregory. A.K., Capella. J., Features of autoimmunity in the abdominal aortic aneurysm. *Arch Surg.* 1996. 131(1):85-8
96. Curci. J.A., Digging in the "Soil" of the aorta to understand the growth of abdominal aortic aneurysms. *Vascular.* 2009. S21-9
97. Hellenthal. F.A., Buurman. W.A., Wodzig. W.K., Schuring. G.W., Biomarkers of abdominal aortic aneurysm progression. Part 1: extracellular matrix degeneration. *Nat Rev Cardiol.* 2009. 6(7):464-74
98. Freestone. T., Turner. R.J., Coady. A., Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995. 15(8):1145-51
99. McMilan. W.D., Tamarina. N.A., Cipollone. M., Size matters: the relationship between MMP-9 expression and aortic diameter. *Circulation.* 1997. 96(7):2228-32
100. Airhart. N., Brownstein. B.H., Cobb. J.P., et al., Smooth muscle cells from abdominal aortic aneurysms are unique and can independently and synergistically degrade insoluble elastin. *J Vasc Surg.* 2014. 60(4):1033-41
101. Melrose. J., Whitelock. J., Xu. Q., Ghosh. P., Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms: possible role of differential production of proteoglycans by smooth muscle cells. *J Vasc Surg.* 1998. 28(4):676-86
102. Lopez-Candales. A., Holmes. D.R., Liao. S., Thompson. R.W., Decreased vascular smooth muscle cell density in medial degeneration of human abdominal aortic aneurysms. *Am J Path.* 150(3):993-1007
103. Henderson. E.L., Geng. Y.J., Sukhova. G.K., et al., Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms. *Circulation.* 1999. 99(1):96-104
104. Satta. J., Mennander. A., Soini. Y., Increased medial TUNEL-positive staining associated with apoptotic bodies is linked to smooth muscle cell diminution during evolution of abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg.* 2002. 16(4):462-6
105. Holmes. D.R., Lopez-Candales. A., Liao. S., Thompson. R.W., Smooth muscle cell apoptosis and p53 expression in human abdominal aortic aneurysms. *Ann N Y Acad Sci.* 1996. 800:286-7
106. Zhang. J., Schmidt. J., Ryschich. E., et al., Increased apoptosis and decreased density of medial smooth muscle cells in human abdominal aortic aneurysms. *Clin Med J (Engl).* 2003. 116(10):1549-52
107. Rowe. V.L., Stevens. S.L., Reddick. T.T., et al., Vascular smooth muscle cell apoptosis in aneurysmal, occlusive, and normal human aortas. *J Vasc Surg.* 2000. 31(3):567-76
108. Annabi. B., Shedid. D., Ghosn. P., et al., Differential regulation of matrix metalloproteinase activities in abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 2002. 35(3):593-46
109. Patel. M.I., Ghosh. O., Melrose. J., Appleberg. M., Smooth muscle cell migration and proliferation is enhanced in abdominal aortic aneurysms. *Aust N Z J Surg.* 1996. 66(5):305-8
110. Liao. S., Curci. J.A., Kelley. B.J., et al., Accelerated replicative senescence of medial smooth muscle cells derived from abdominal aortic aneurysms compared to the adjacent inferior mesenteric artery. *J Surg Res.* 2000. 92(1):85-95
111. Ailawadi. G., Moehle. C.W., Pei. H., et al., Smooth muscle phenotypic modulation is an early event in aortic aneurysms. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009. 138(6):1392-9
112. Riches. K., Angelini. T.G., Mudhar. G.S., et al., Exploring smooth muscle phenotype and function in a bioreactor model of abdominal aortic aneurysms. *J Transl Med.* 2013. 11:208
113. Kramer. C.K., Cerilli. L.A., Hagspiel. K., et al., Magnetic resonance imaging identifies the fibrous cap in atherosclerotic abdominal aortic aneurysm. *Circulation.* 2004. 109(8): 1016-21
114. Zarins. C.K., Xu. C., Glagoc. S., Atherosclerotic enlargement of the human abdominal aorta. *Atherosclerosis.* 2001. 155(1):157-64

115. Johnsen. S.H., Forsdahl. S.H., Singh. K., Jacobsen. B.K., Atherosclerosis in abdominal aortic aneurysms: a causal event or a process running in parallel? The Tromsø Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010. 30(6):1263-8
116. Gollege. J., Norman. P.E., Atherosclerosis and abdominal aortic aneurysm: cause, response, or common risk factors? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010. 30(6):1075-77
117. Thompson. R.W., Geraghty. P.J., Lee. J.K., Abdominal aortic aneurysms: basic mechanisms and clinical implication. *Curr Probl Surg.* 2002. 39(2):110-230
118. Gregory T Jones (2011). *The Pathohistology of Abdominal Aortic Aneurysm, Diagnosis, Screening and Treatment of Abdominal, Thoracoabdominal and Thoracic Aortic Aneurysms*, Prof. Reinhart Grundmann (Ed.), InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/diagnosis-screening-and-treatment-of-abdominal-thoracoabdominal-and-thoracic-aortic-aneurysms/the-pathohistology-of-abdominal-aortic-aneurysm>
119. Glass. C.K., Witztum. J.L., Atherosclerosis: the road ahead. *Cell.* 2001. 104(4):503-16
120. Lusis. A.J., Atherosclerosis. *Nature.* 2000. 407(6801):233-41
121. Farese. R.V.Jr., Herz. J., Cholesterol metabolism and embryogenesis. *Trends Genet.* 1998. 14(3):115-20
122. Tabas. I., Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J Clin Invest.* 2002. 110(7):905-11
123. Dietschy. J.M., Turley. S.D., Spady. D.K., Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J Lipid Res.* 1993. 34(10):1637-59
124. Tabas. I., Kreiger. M., Lipoprotein receptors and cellular metabolism in health and disease. In *Molecular basis of heart disease*. K.R. Chien, editor. W.B. Saunders. Co. New York, USA. 1999. 428-57
125. Holtzman. J.L., Atherosclerosis and oxidant stress: a new perspective. Springer. 2007
126. Gimbrone. M.A. J., Topper. J.N., Nagel. T., et al., Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2000. 902:230-9
127. Badimon. L., Starey. R.F., Vilahur. G., Update on lipids, inflammation and atherothrombosis. *Thromb Haemost.* 2011. S1:S34-42
128. Libby. P., Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002. 420(6917):868-74
129. Yu. X.H., Fu. Y.C., Zhang. D.W., et al., Foam cells in atherosclerosis. *Clin Chim Acta.* 2013. 424:245-52
130. Li. A.C., Glass. C.K., The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med.* 2002. 8(11):1235-42
131. Stary, H.C., Chandler. A.B., Dinsmore. R.E., et al., A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of Atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996. 15(9): p. 1512-31
132. Allahverdian. S., Francis. G.A., Cholesterol homeostasis and high-density lipoprotein formation in arterial smooth muscle cells. *Trends Cardiovasc Med.* 2010. 20(3):96-102
133. Maxfield. R.F., Tabas. I., Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature.* 2005. 438(7066):612-21
134. Taye. A., El-Sheikh. A.A., Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 pathways. *Eur J Clin Invest.* 2013. 43(7):740-5
135. Steinl. D.C., Kaufmann. B.A., Ultrasound imaging for risk assessment in atherosclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2015. 16(5):9749-69
136. Simons. K., Ikonen. E., How cells handle cholesterol. *Science.* 2000. 290(5497):1721-6
137. Björkhem. I., Do oxysterols control cholesterol homeostasis? *J Clin Invest.* 2002. 110(6):725-30
138. Tabas. I., Free cholesterol-induced cytotoxicity a possible contributing factor to macrophage foam cell necrosis in advanced atherosclerotic lesions. *Trends Cardiovasc Med.* 1997. 7(7):256-63
139. Glomset. J.A., The plasma lecithins: cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res.* 1968. 9(2):155-67

140. Ross. R., Glomset. J.A., Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science*. 1973. 180(4093):1332-9
141. Ohashi. R., Mu. H., Wang. X., et al., Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *QJM*. 2005. 98(12):845-56
142. Cuchel. M., Rader.D.J., Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation*. 2006. 113(21):2548-55
143. Choi. H.Y., Rahmani. M., Wong. B.W., et al., ATP-binding cassette transporter A1 expression and apolipoprotein A-I binding are impaired in intima-type arterial smooth muscle cells. *Circulation*. 2009. 119(25):3223-31
144. Allahverdian. S., Chehroudi. A.C., McManus. B.M., et al., Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis. *Circulation*. 2014. 129(15):1551-9
145. Navab. M., Reddy. S.T., Van Lenten. B.J., Fogelman. A.M., HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. *Nat Rev Cardiol*. 2011. 8(4):222-32
146. Sviridov. D., Nester. P., Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2002. 161(2):245-54
147. Curtiss. K., Valenta. D.T., Hime. N.J., Rye. K.A., What is so special about apolipoprotein AI in reverse cholesterol transport? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006. 26(1):12-9
148. Khuseynova. N., Koenig. W., Apolipoprotein A-I and the risk for cardiovascular diseases. *Curr Atheroscler Rep*. 2006. 8(5): 365-73
149. Oram. J.F., Vaughan. A.M., ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL apolipoprotein. 2000. 11(3):253-60
150. Soumian. S., Albrecht. C., Davies. A.H., Gibbs. R.G., ABCA1 and atherosclerosis. *Vasc Med*. 2005. 10(2):109-19
151. Attie. A.D., Kastelein. J.P., Hayden. M.R., Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility to atherosclerosis. *J Lipid Res*. 2001. 42(11):1717-26
152. Bodzioch. M., Orso. E., Klucken. J., et al., The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet*. 1999. 22(4):347-51
153. Oram. J.F., Molecular basis of cholesterol homeostasis: lessons from Tangier disease and ABCA1. *Trends Mol Med*. 2002. 8(4):168-73
154. Albrecht. C., Soumian. S., Amey. J.S., et al., ABCA1 expression in carotid atherosclerotic plaques. *Stroke*. 2004. 35(12):2801-6
155. Forcheron. F., Legedz. L., Chinetti. G., et al., Genes of cholesterol metabolism in human atheroma: overexpression of perilipin and genes promoting cholesterol storage and repression of ABCA1 expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005. 25(8):1711-7
156. Schwartz. K., Lawn. R.M., Wade. D.P., ABC1 gene expression and ApoA-I-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000. 274(3):794-802
157. Venkateswaran. A., Laffitte. B.A., Joseph. S.B., et al., Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 2000. 97(22):12097-102
158. Edwards. P.A., Kennedy. M.A., Mak. P.A., LXRs; oxysterol-activated nuclear receptors that regulated genes controlling lipid homeostasis. *Vascul Pharmacol*. 2002. 38(4):249-56
159. Tontonoz. P., Mangelsdorf. D.J., Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol*. 2003. 17(6):985-93
160. Repa. J.J., Mangelsdorf. D.J., The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2000. 16:459-81
161. Nomiyama. T., Bruemmer. D., Liver X receptors as therapeutic targets in metabolism and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2008. 10(1):88-95
162. Geyeregger. R., Zeyda. M., Stulnig. T.M., Liver X receptors in cardiovascular and metabolic disease. *Cell Mol Life Sci*. 2006. 63(5):524-39
163. Calkin. A.C., Tontonoz. P., Liver x receptor signaling pathways and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010. 30(8):1513-8
164. Fiévet. C., Staels. B., Liver X receptor modulators: effects on lipid metabolism and potential use in the treatment of atherosclerosis. *Biochem Pharmacol*. 2009. 77(8):1316-27
165. Rudijanto. A., The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Med Indones*. 2007. 39(2):86-93

166. Pidkovka. N.A., Cherepanova. O.A., Yoshida. T., et al., Oxidized phospholipids induce phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *Circ Res.* 2007. 101(8):792-801
167. Levitan. I., Volkov. S., Subbaiah. P.V., Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal.* 2010. 13(1):39-75
168. Doran. A.C., Meller. N., McNamara. C.A., Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008. 28(5):812-9
169. Mietus-Snyder. M., Gowri. M.S., Pitas. R.E., Class A scavenger receptor up-regulation in smooth muscle cells by oxidized low density lipoprotein. Enhancement by calcium flux and concurrent cyclooxygenase-2 up-regulation. *J Bio Chem.* 2000. 275(23):17661-70
170. Ruan. X.Z., Moorhead. J.F., Tao. J.L., et al., Mechanisms of dysregulation of low-density lipoprotein receptor expression in vascular smooth muscle cells by inflammatory cytokines. *Arterioscler Thromb Basc Biol.* 2006. 26(5):1150-5
171. Rong. J.X., Shapiro. M., Trogan. E., Fisher. E.A., Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2003. 100(23):13531-6
172. Wolfbauer. G., Glick. J.M., Minor. L.K., Rothblat. G.H., Development of the smooth muscle foam cell: uptake of macrophage lipid inclusions. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1986. 83(20):7760-4
173. Klouche. M., Rose-John. S., Schmiedt. W., Bhakdi. S., Enzymatically degraded, nonoxidized LDL induces human vascular smooth muscle cell activation, foam cell transformation, and proliferation. *Circulation.* 2000. 101(15):1799-805
174. Naqao. S., Murao. K., Imachi. H., et al., Platelet derived growth factor regulates ABCA1 expression in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 2006. 580(18):4371-6
175. Choi. H.Y., Rahmani. M., Wong. B.W., et al., ATP-binding cassette transporter A1 expression and apolipoprotein A-I binding are binding in intima-type arterial smooth muscle cells. *Circulation.* 2009. 119(25):3223-31
176. Allahverdian. S., Francis. G.A., Cholesterol homeostasis and high-density lipoprotein formation in arterial smooth muscle cells. *Trends Cardiovasc Med.* 2010. 20(3):96-102
177. Chaabane. C., Coen. M., Bochaton-Piallat. M.L., Smooth muscle cell phenotypic switch: implications for foam cell formation. *Curr Opin Lipidol.* 2014. 25(5):374-9
178. Simoni. G., Gianotti. A., Ardia. A., et al., Screening study of abdominal aortic aneurysm in a general population: lipid parameters. *Cardiovasc Surg.* 1996. 4(4):445-8
179. Golledge. J., van Bockxmeer. F., Jamrozik. K., et al., Association between serum lipoproteins and abdominal aortic aneurysm. *Am J Cardiol.* 2010. 105(10):1480-4
180. Hobbs. S.D., Claridge. M.W., Quick. C.R., et al., LDL cholesterol is associated with small abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2003. 26(6):618-22
181. Lindholt. J.S., Heegard. N.H., Vammen. S., et al., Smoking, but not lipids, lipoprotein (a) and antibodies against oxidized LDL, is correlated to the expansion of abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2001. 21(1):51-6
182. Rizzo. M., Krayenbühl. P.A., Pernice. V., et al., LDL size and subclasses in patients with abdominal aortic aneurysm. *Int J Cardiol.* 2009. 134(3):406-8
183. Ahnström. J., Gottsäter. A., Lindblad. B., Dahlbäck. B., Plasma concentrations of apolipoproteins A-I, B and M in patients with abdominal aortic aneurysms. *Clin Biochem.* 2010. 43(4-5):407-10
184. Kalyanasundaram. A., Elmore. J.R., Manazer. J.R., et al., Simvastatin suppresses experimental aortic aneurysm expansion. *J Vasc Surg.* 2006. 43(1):117-24
185. Saratzis. A., Kitas. G.D., Saratzis. N., Melas. N., Can statins suppress the development of abdominal aortic aneurysms? A review of the current evidence. *Angiology.* 2010. 61(2):137-44
186. Rupérez. F.J., Ramos-Mozo. P., Teul. J., et al., Metabolomic study of plasma of patients with abdominal aortic aneurysm. *Anal Bioanal Chem.* 2012. 403(6):1651-60
187. Ciborowski. M., Teul. J., Martin-Ventura. J.L., et al., Metabolomics with LC-QTOF-MS permits the prediction of disease stage in aortic abdominal aortic aneurysm based on plasma metabolic fingerprint. *PLoS One.* 2012. 7(2):e31982
188. Tanaka. H., Zaima. N., Sasaki. T., et al., Adventitial vasa vasorum arteriosclerosis in abdominal aortic aneurysm. *PLoS One.* 2013. 8(2):e57398
189. Hellenthal. F.A., Geenen. I.L., Teijink. J.A., et al., Histological features of human abdominal aortic aneurysm are not related to clinical characteristics. *Cardiovasc Pathol.* 2009. 18(5):286-93

190. Soumian. S., Gibbs. R., Davies. A., Albrecht. C., mRNA expression of genes involved in lipid efflux and matrix degradation in occlusive and ecstatic atherosclerotic disease. *J Clin Pathol.* 2005. 58(12):1255-60
191. Bartel. D.P., MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanisms, and function. *Cell.* 2004. 116(2):287-97
192. Friedman. R.C., Fahr. K.K., Burge. C.B., Bartel. D.P., Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009. 19(1):92-105
193. Li. C., Feng. Y., Coukos. G., Zhang. L., Therapeutic microRNA strategies in human cancer. *AAPS J.* 2009. 11(4):747-57
194. Lytle. J.R., Yario. T.A., Steitz. G.A., Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5'UTR as in the 3'UTR. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2007. 104(23):9667-72
195. Lee. Y., Jeon. K., Lee. T.T., et al., MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 2002. 21(17):4663-70
196. Biggar. K.K., Storey. K.B., Insight into post-transcriptional gene regulation: stress-responsive microRNAs and their role in the environmental stress survival of tolerant animals. *J Exp Biol.* 2015. 218(Pt 9):1281-9
197. Zeng. Y., Principles of micro-RNA production and maturation. *Oncogene.* 2006. 25(46):6156-62
198. Lee. Y., Kim. M., Han. J., et al., MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004. 23(20):4051-60
199. Cai. X., Hagedorn. C.H., Cullen. B.R., Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA.* 2004. 10(12):1957-66
200. Han. J., Lee. Y., Yeom. K.H., et al., The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 2004. 18(24):3016-27
201. Han. J., Lee. Y., Yeom. K.H., et al., Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha DGCR8 complex. *Cell.* 2006. 125(5):887-901
202. Lund. E., Guttinger. S., Calado. A., et al., Nuclear export of microRNAs precursors. *Science.* 2004. 303(564):95-8
203. Winter. J., Jung. S., Keller. S., et al., Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol.* 2009. 11(3):228-234
204. Calin. G.A., Croce. C.M., MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer.* 2006. 6(11):857-866
205. Sonkoly. E., Pivarcsi. A., Advances in microRNAs: implications for immunity and inflammatory diseases. *J Cell Mol Med.* 13(1):24-38
206. Maegdefessel L., Spin. J.M., Adam. M., et al., Micromanaging abdominal aortic aneurysms. *Int J Mol Sci.* 2013. 14(7):14374-94
207. Busch. A., Busch. M., Scholz. C.J., et al., Aneurysm miRNA signature differs, depending on disease localization and morphology. *Int J Mol Sci.* 2016. 17(1):pii:8
208. Kim. C.W., Kumar. S., Son. D.J., et al., Prevention of abdominal aortic aneurysm by anti-microRNA-712 or anti-microRNA-205 in angiotensin II-infused mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 34(7):1412-21
209. Maegdefessel. L., Azuma. J., Toh. R., et al., Inhibition of microRNA-29b reduces murine abdominal aortic aneurysm development. *J Clin Invest.* 2012. 122(2):497-506
210. Maegdefessel. L., Azuma. J., Toh. R., et al., MicroRNA-21 blocks abdominal aortic aneurysm development and nicotine-augment expansion. *Sci Transl Med.* 4(122):122ra22
211. Maegdfessel. L., Spin. J.M., Raaz. U., et al., MicroRNA-24 limits aortic vascular inflammation and murine abdominal aortic aneurysm development. *Nat Commun.* 2014. 5:5214
212. Cheuk. B.L., Cheng. S.W., Identification and characterization of microRNAs in vascular smooth muscle cells from patients with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 2014. 59(1):202-9
213. Kin.K., Miyagawa. S., Fukushima. S., et al., Tissue- and plasma-specific MicroRNA signatures for atherosclerotic abdominal aortic aneurysm. *J Am Heart Assoc.* 2012. 1(5):e000745
214. Pahl. M.C., Derr. K., Gäbel. G., et al., MicroRNA expression signature in human abdominal aortic aneurysms. *BMC Med Genomics.* 2012. 5:25
215. Stather. P.W., Sylvius. N., Sidloff. D.A., et al., Identification of microRNAs associated with abdominal aortic aneurysms and peripheral arterial disease. *Br J Surg.* 2015. 102(7):755-66

216. Sidloff. D.A., Stather. P.W., Choke. E., et al., A systematic review and meta-analysis of the association between markers of hemostasis and abdominal aortic aneurysm presence and size. *J Vasc Surg.* 2014. 59(2):528-35
217. Stather. P.W., Sidloff. D.A., Dattani. N., et al., Meta-analysis and meta-regression analysis of biomarkers for abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg.* 2014. 101(11):1358-72
218. Zhang. W., Shang. T., Huang. C., et al., Plasma microRNAs serve as potential biomarkers for abdominal aortic aneurysm. *Clin Biochem.* 2015. 48(15):988-92
219. Dávalos. A., Fernández-Hernando. C., From evolution to revolution: miRNAs as pharmacological targets for modulating cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Pharmacol Res.* 75:60-72
220. Fernández-Hernando. C., Ramírez. C.M., Goedeke. L., Suárez. Y., MicroRNAs in metabolic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013. 33(2):178-85
221. Rottiers. V., Näär. V., MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012. 13(4):239-50
222. Novák. J., [Bienertová-Vašků. J.](#), Kára. T., Novák. M., MicroRNAs involved in the lipid metabolism and their possible implications for atherosclerosis development and treatment. *Mediators Inflamm.* 2014. 2014:275867
223. Hulsmans. H., De Keyzer. D., Holvoet. P., MicroRNAs regulating oxidative stress and inflammation in relation to obesity and atherosclerosis. *FASEB J.* 2011. 25(8):2515-17
224. Rayner. K.J., Suarez. Y., Dávalos. A., et al., MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science.* 2010. 328(5985):1570-3
225. Gerin. I., Clerbaux. L.A., Haumont. O., Expression of miR-33 from an SREBP2 intron inhibits efflux export and fatty acid oxidation. *J Biol Chem.* 2010. 285(44):33652-61
226. Zhong. D., Hung. G., Zhang. Y., et al., MicroRNA-1 and microRNA-206 suppress LXR α -induced lipoprotein lipogenesis in hepatocytes. *Cell Signal.* 2013. 25(6):1429-37
227. Kim. J., Yoon. H., Ramírez. C.H., et al., MiR-106b impairs cholesterol efflux and increases A β levels by repressing ABCA1 expression. *Exp Neurol.* 2012. 235(2):476-83
228. Ramírez. C.M., Dávalos. A., Goedeke. L., et al., MicroRNA-758 regulates cholesterol efflux through posttranscriptional repression of ATP-binding cassette transporter A1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011. 31(11):2707-14
229. Sun. D., Zhang. J., Xie. J., et al., MiR-26 controls LXR-dependent cholesterol efflux by targeting ABCA1 and ARL7. *FEBS Lett.* 2012. 586(10):1472-9
230. Zhang. M., Wu. J.F., Chen. W.J., et al., MicroRNA-27a/b regulates cholesterol efflux, influx, and esterification/hydrolysis in THP-1. *Atherosclerosis.* 2014. 234(1):54-64
231. Ramírez. C.M., Rottlan. N., Vlassov. A.V., et al., Control of cholesterol metabolism and plasma high density lipoprotein levels by microRNA-144. *Circ Res.* 2013. 112(12):1532-601
232. Wang. D., Xia. M., Yan. X., et al., Gut microbiota metabolism of anthocyanin promotes reverse cholesterol transport in mice via repressing miR-10b. *Circ Res.* 2012. 118(8):967-81
233. Tehler. D., Høyland-Kroghsbo. N.M., Lund. A.H., The miR-10 microRNA precursor family. *RNA Biol.* 2011. 8(5):728-34
234. Tanzer. A., Amemiya. C.T., Kim. C.B., Stadler. P.F., Evolution of microRNAs located within Hox gene clusters. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 2005. 304(1):75-85
235. Han. X., Yan. S., Weije. Z., et al., Critical role of miR-10b in transforming growth factor- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Cancer Gene Ther.* 2014. 21(2):60-7
236. Bidzhikov. K., Gan. L., Denecke. B., et al., MicroRNA expression signatures and parallels between monocyte subsets and atherosclerotic plaque in human. *Thromb Haemost.* 2012. 107(4):619-25
237. Yu. X., Li.Z., Chen. G., Wu. W.K., MicroRNA-10b induces vascular cell proliferation through Akt pathway by targeting TIP30. *Curr Vasc Pharmacol.* 2015. 13(5):679-86
238. Stary. H.C., Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000. 20(5):1177-8
239. Golledge. J., Muller. J., Daugherty. A., Norman. P., Abdominal aortic aneurysm: pathogenesis and implications for management. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006. 26(12):2605-13
240. Sakalihasan. N., Limet. R., Defawe. O.D., Abdominal aortic aneurysm. *Lancet.* 2005. 365(9470):1577-89

241. Lindeman. J.H., The pathophysiological basis of abdominal aortic aneurysm progression: a critical appraisal. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2015. 13(7):839-51
242. Ishikawa. Y., Akasaka. Y., Ishii. T., et al., Distribution and synthesis of apolipoprotein J in the atherosclerotic aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998. 18(4):665-72
243. Jürgens. G., Chen. Q., Esterbauer. H., et al., Immunostaining of human autopsy aortas with antibodies to modified apolipoprotein B and apoprotein(a). *Arterioscler Thromb.* 1993. 13(11):1689-99
244. Kaesberg. B., Harrach. B., Dieplinger. H., Robenek. H., In situ immunolocalization of lipoproteins in human arteriosclerotic tissue. *Arterioscler Thromb.* 1993. 13(1):133-46
245. Bocan. T.M., Guyton. J.R., Human aortic fibrolipid lesions. Progenitor lesion for fibrous plaques, exhibiting early formation of cholesterol-rich core. *Am J Pathol.* 1985. 120(2):193-206
246. Mackness. B., Hunt. R., Durrington. P.N., Mackness. M.I., Increased immunolocalization of paraoxonase, clustering, and apolipoprotein A-I in the human artery wall with the progression of atherosclerosis. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 1997. 17(7):1233-8
247. DiDonato. J.A., Huang. Y., Aulak. K.S., et al., Function and distribution of apolipoprotein A1 in the artery wall are markedly distinct from those in plasma. *Circulation.* 2013. 128(15):1644-55
248. Krishna. S.M., Dear. A.E., Norman. P.E., Gollidge. J., Genetic and epigenetic mechanisms and their possible role in abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis.* 2010. 212(1):16-29
249. Ryer. E.J., Ronning. K.E., Erdman. R., et al., The potential role of DNA methylation in abdominal aortic aneurysms. *Int J Mol Sci.* 2015. 16(5):11259-75
250. Bartel. D.P., MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009. 136(2):215-33
251. Alvarez-Garcia. I., Miska. E.A., MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development.* 2005. 132(21):4653-62
252. Pillai. R.S., Bhattacharyya. S.N., Filipowicz. W., Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol.* 2007. 17(3):118-26