

ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΑΝΟΙΚΤΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
«ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Τα Long non coding RNAs (lncRNAs) ως πιθανοί βιοδείκτες
διάγνωσης ή/και εξέλιξης της καρδιαγγειακής νόσου.»**



Βασιλική Χατζηδάκη

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Αικατερίνη Κωνσταντίνου

Πάτρα, Ιούλιος 2024

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του φοιτητή («συγγραφέας/δημιουργός») που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του συγγραφέα/δημιουργού. Ο συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων



**«Τα Long non coding RNAs (lncRNAs) ως πιθανοί βιοδείκτες
διάγνωσης ή/και εξέλιξης της καρδιαγγειακής νόσου.»**

Βασιλική Χατζηδάκη

Επιτροπή Επίβλεψης Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Αικατερίνη Κωνσταντίνου

Συνεργαζόμενο εκπαιδευτικό προσωπικό

Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:

Ανδρέας Σκορίλας

Καθηγητής-Τμήμα Βιολογίας

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

Πάτρα, Ιούλιος 2024

Ευχαριστώ τον σύζυγό μου για την κατανόηση, την υπομονή και την υποστήριξή του και την μητέρα μου, που πάντοτε βρίσκεται ακούραστα στο πλευρό μου, ενθαρρύνοντας όλες τις προσπάθειές μου για μάθηση και επιμόρφωση με κάθε κόστος. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κυρία Κατερίνα Κωνσταντίνου για τις γνώσεις που πήρα από εκείνη, για την καθοδήγησή και για τη συνολική συνεισφορά της στο παρόν πόνημα.

Στον πατέρα μου.

Περίληψη

Οι καρδιαγγειακές παθήσεις (CVD) αποτελούν την κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως. Στις μέρες μας έχει αποσαφηνιστεί ότι τα καρδιαγγειακά νοσήματα είναι μια κατηγορία νοσημάτων ζωής, εξελίσσονται καθ' όλη τη διάρκεια του βίου και επηρεάζονται από παράγοντες κινδύνου ξεχωριστούς για τον καθένα, καταλήγουν στην ανάπτυξη της υποκλινικής αθηροσκλήρωσης. Η υποκλινική νόσος κορυφώνεται σε εμφανή καρδιαγγειακή νόσο. Η έναρξη της καρδιαγγειακής νόσου από μόνη της, προμηνύει δυσμενή πρόγνωση με αυξημένο κίνδυνο νοσηρότητας και θνησιμότητας και γι αυτό η πρόληψη της νόσου και η έγκαιρη διάγνωση αποτελούν προτεραιότητα. Για το λόγο αυτό η κλινική αξιολόγηση έχει μεγάλη βαρύτητα για τη διαχείριση των ασθενών, η οποία όμως παρουσιάζει αρκετούς περιορισμούς. Στην κλινική πράξη χρησιμοποιούνται διάφορα εργαλεία προκειμένου να επιτευχθεί η έγκαιρη διάγνωση των ασθενών που έχουν αυξημένες πιθανότητες νόσησης. Οι βιοδείκτες αποτελούν ένα μέσο αξιολόγησης και έγκαιρης διάγνωσης των ατόμων υψηλού κινδύνου, με σκοπό την πρόγνωση και τη θεραπεία των ασθενών με καρδιαγγειακή νόσο.

Σε αντίθεση με όσα πιστεύαμε, η πολυπλοκότητα των οργανισμών μπορεί να οφείλεται τόσο στα γονίδια που κωδικοποιούνται όσο και σε εκείνα που δεν κωδικοποιούνται. Η ανάπτυξη της τεχνολογίας αλληλούχησης μας επέτρεψε την εξερεύνηση τέτοιων περιοχών του γονιδιώματος και έφερε στο φώς νέα δεδομένα. Κάθε χρόνο, ανακαλύπτονται νέα lncRNA και σύμφωνα με την έκδοση 6.0 του NONCODE, ειδικά στα lncRNA, υπάρχουν περίπου 173.112 μεταγραφές lncRNA στον άνθρωπο. Τα lncRNA ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων με διάφορους τρόπους, συμπεριλαμβανομένων των επιπέδων στο, μεταγραφικό, μετα-μεταγραφικό, μεταφραστικό, μετα-μεταφραστικό και επιγενετικό, αλληλεπιδρώντας κυρίως με το mRNA, το DNA, την πρωτεΐνη και το miRNA. Φαίνεται να υπάρχουν πολύ καλές προοπτικές από τη χρήση των lncRNA ως βιοδείκτες, καθώς μπορούν να αποτελέσουν χαμηλού κόστους, εξειδικευμένους δείκτες των καρδιαγγειακών νοσημάτων και να αποτελέσουν σημαντικό εργαλείο για την έγκαιρη διάγνωση της νόσου. .

Λέξεις κλειδιά: αθηροσκλήρωση, lncRNAs, βιοδείκτες

Abstract

Cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause of morbidity and mortality worldwide. It has now been clarified that cardiovascular diseases are a category of lifelong diseases, evolving throughout life and, influenced by risk factors unique to each individual, ultimately lead to the development of subclinical atherosclerosis. Subclinical disease culminates in evident cardiovascular disease. The onset of cardiovascular disease itself predicts an adverse prognosis with an increased risk of morbidity and mortality, and thus, disease prevention and early diagnosis are priorities. For this reason, clinical evaluation is of great importance for patient management, although it presents several limitations. Various tools are used in clinical practice to achieve the timely diagnosis of patients who are at increased risk of disease. Biomarkers serve as a means of evaluating and diagnosing high-risk individuals early, aiming at the prognosis and treatment of patients with cardiovascular disease.

Contrary to what we previously believed, the complexity of organisms can be attributed to both coding and non-coding genes. The development of sequencing technology has allowed us to explore such regions of the genome and brought new data to light. Every year, new lncRNAs are discovered, and according to version 6.0 of NONCODE, specifically in lncRNAs, there are approximately 173,112 lncRNA transcripts in humans. lncRNAs regulate gene expression in various ways, including transcriptional, post-transcriptional, translational, post-translational, and epigenetic levels, mainly interacting with mRNA, DNA, protein, and miRNA. The prospects for using lncRNAs as biomarkers appear very promising, as they can serve as low-cost, specialized indicators of cardiovascular diseases and be a significant tool for the early diagnosis of the disease.

Key words: atherosclerosis, lncRNAs, biomarker

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	7
1.1 Ποια είναι τα καρδιαγγειακά νοσήματα.....	7
1.2 Μοριακό υπόβαθρο δημιουργίας και εξέλιξης της αθηρωματικής πλάκας.....	8
1.2.1 Είδη αθηρωματικών βλαβών.....	8
1.2.2 Μοριακό υπόβαθρο δημιουργίας της αθηρωματικής πλάκας.....	13
1.2.2.1 Έναρξη της αθηρωσκλήρωσης.....	13
1.2.2.2 Φλεγμονή και ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού.....	14
1.2.2.3 Ασβεστοποίηση.....	22
1.2.2.4 Η Ευάλωτη Πλάκα.....	25
1.2.3 Σχηματισμός και εξέλιξη των αθηρωματικών βλαβών.....	27
1.2.3.1 Σχηματισμός λιπιδίων ραβδώσεων.....	28
1.2.3.2 Σχηματισμός αθηρώματος.....	30
1.2.3.3 Σχηματισμός αθηρωματικής πλάκας.....	31
1.3 Κλινικά συμπτώματα και κλασικοί βιοδείκτες διάγνωσης και παρακολούθησης των καρδιαγγειακών νοσημάτων.....	33
Κεφάλαιο 2: Στόχος της ΜΔΕ.....	35
Κεφάλαιο 3: Βιοδείκτες.....	37
3.1 Ορισμοί.....	37
3.2 Κατηγορίες βιοδεικτών.....	39
3.3 Σημαντικότητα βιοδεικτών.....	42
3.4 Ποιοτικά χαρακτηριστικά Βιοδεικτών.....	42
3.5 Πως γίνεται η κλινική επικύρωση των βιοδεικτών.....	43
Κεφάλαιο 4: Τα long non coding RNAs.....	47
4.1 Βιογένεση των lncRNAs".....	47
4.1.1 Βιολογικά χαρακτηριστικά των lncRNAs.....	47
4.1.2 Βιογένεση των lncRNAs.....	48
4.2 Μηχανισμοί λειτουργίας των lncRNAs.....	49
4.3 Κυτταρικοί μηχανισμοί που στοχεύονται από lncRNAs.....	51
Κεφάλαιο 5: Μέθοδοι εντοπισμού των lncRNAs και μέθοδοι χρήσης τους στη διάγνωση.....	61
5.1 Μέθοδοι εντοπισμού των lncRNAs.....	61
5.2 Μέθοδοι χρήσης των lncRNAs στη διάγνωση.....	65
Κεφάλαιο 6: lncRNAs και καρδιαγγειακά νοσήματα.....	70
6.1. Στεφανιαία νόσος.....	70
6.1.1. Βιοδείκτες στεφανιαίας νόσου.....	70
6.1.1.1 aHIF.....	70

6.1.1.2 APOA1-AS.....	72
6.1.1.3 AWPPH.....	73
6.1.1.4 CoroMarker.....	73
6.1.1.5 H19.....	74
6.1.1.6 LIPCAR.....	75
6.1.1.7 MALAT1 και MIAT.....	76
6.1.1.8 SMILR.....	77
6.2 Οξύ Έμφραγμα του Μυοκαρδίου.....	78
6.2.1. Βιοδείκτες οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου.....	78
6.2.1.1 aHIF.....	78
6.2.1.2 CDR1AS και ZFAS1.....	80
6.2.1.3 HOTAIR.....	82
6.2.1.4 KCNQ1OT1.....	82
6.2.1.5 ANRIL.....	83
6.2.1.6 MHRT.....	84
6.2.1.7 UCA1.....	85
Κεφάλαιο 7: Συμπεράσματα - Συζήτηση.....	86
Βιβλιογραφία.....	91

1. Εισαγωγή

1.1 Ποια είναι τα καρδιαγγειακά νοσήματα

Με τον όρο καρδιαγγειακές παθήσεις (CVDs), με βάση τον ορισμό που δίνει ο παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) , αναφερόμαστε σε μια ομάδα διαταραχών της καρδιάς και των αιμοφόρων αγγείων, στην οποία περιλαμβάνονται η στεφανιαία νόσος (ασθένεια των αιμοφόρων αγγείων που τροφοδοτούν τον καρδιακό μυ), η εγκεφαλοαγγειακή νόσος (ασθένεια των αιμοφόρων αγγείων που τροφοδοτούν τον εγκέφαλο), η περιφερική αρτηριακή νόσος - (ασθένεια των αιμοφόρων αγγείων που τροφοδοτούν τα χέρια και τα πόδια), η ρευματική καρδιοπάθεια (η οποία είναι μια βλάβη του καρδιακού μυ και των καρδιακών βαλβίδων προερχόμενη από ρευματικό πυρετό, που προκαλείται από το βακτήριο του στρεπτόκοκκου), οι συγγενείς καρδιοπάθειες (γενετικές ανωμαλίες που επηρεάζουν την κανονική ανάπτυξη και λειτουργία της καρδιάς που προκαλούνται από δυσπλασίες της δομής της καρδιάς από τη γέννηση) και η εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση και πνευμονική εμβολή –(θρόμβοι αίματος στις φλέβες των ποδιών, οι οποίοι μπορούν να εκτοπιστούν και να μετακινηθούν προς την καρδιά και τους πνεύμονες) [1]

Στην παρούσα διατριβή, θα ασχοληθούμε με τις ασθένειες εκείνες που προκύπτουν από την δημιουργία αθηρωματικής πλάκας.

Οι καρδιακές προσβολές και τα εγκεφαλικά επεισόδια είναι συνήθως οξεία συμβάντα και προκαλούνται κυρίως από απόφραξη που εμποδίζει τη ροή του αίματος προς την καρδιά ή τον εγκέφαλο. Ο συνηθέστερος λόγος για αυτό είναι η συσσώρευση λιπών στα εσωτερικά τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων που τροφοδοτούν την καρδιά ή τον εγκέφαλο. Τα εγκεφαλικά μπορεί να προκληθούν από αιμορραγία από αιμοφόρο αγγείο στον εγκέφαλο ή από θρόμβους αίματος. [1]

1.2 Μοριακό υπόβαθρο δημιουργίας και εξέλιξης της αθηρωματικής πλάκας

1.2.1 Είδη αθηρωματικών βλαβών

Η αθηροσκλήρωση είναι μια εκφυλιστική διεργασία της οποίας η επίπτωση και η βαρύτητα αυξάνεται με την πρόοδο της ηλικίας. Η κύρια βλάβη που οφείλεται στην αθηροσκλήρωση είναι οι ινολιπώδεις εναποθέσεις στον έσω χιτώνα των αιμοφόρων αγγείων, κυρίως των μεγάλων μυϊκών αρτηριών, οι οποίες ονομάζονται αθηρώματα ή πλάκες και τα συναντάμε κυρίως στις μεγάλου και μεσαίου μεγέθους αρτηρίες. Σε έναν πληθυσμό, όλα τα άτομα παρουσιάζουν αθηροσκλήρωση ως ένα βαθμό, όμως δεν φτάνουν όλοι στο σημείο να

πεθάνουν από αυτό. Ο βαθμός των αλλοιώσεων και ο κίνδυνος ανάπτυξης της νόσου συνδέεται με διάφορους παράγοντες κινδύνου, οι κυριώτεροι από αυτούς είναι:

1. Υπερλιπιδαιμία: είναι η αυξημένες τιμές των λιπιδίων στον ορό και οφείλονται είτε στην πρόσληψη μέσω της δίαιτας ή είναι κάποια γενετικά καθοριζόμενη διαταραχή. Όταν η τιμή της χοληστερόλης ξεπερνά τα 200 mg/dl, τότε ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου είναι αυξημένος. Βεβαία, η τιμή αυτή είναι σχετική και πρέπει πάντα να συνεκτιμώνται και οι υπόλοιποι παράγοντες κινδύνου που αφορούν το άτομο. Επίσης, η τιμή αυτή αφορά όλα τα είδη της χοληστερόλης του ορού, όμως μόνο κάποια είδη από αυτά σχετίζονται ισχυρά με την ανάπτυξη της νόσου. Από τις λιποπρωτεΐνες που συναντάμε στον ορό, οι χαμηλής πυκνότητας (LDLs) και οι πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDLs) φαίνεται να είναι εκείνες που σχετίζονται σοβαρά με την δημιουργία των αθηρωματικών πλακών.
2. Υπέρταση: οι υψηλές τιμές αρτηριακής πίεσης αυξάνουν τις πιθανότητες εμφάνισης αθηροσκλήρωσης. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό δεν είναι απόλυτα διευκρινισμένος, αλλά πιθανολογείται ότι σχετίζεται με τον τραυματισμό του έσω χιτώνα με εντονότερη παρουσία στα σημεία όπου παρατηρείται στροβιλώδης αιματική ροή.
3. Κάπνισμα: οι καπνιστές φαίνεται να παρουσιάζουν διπλάσια θνησιμότητα λόγω στεφανιαίας νόσου, σε σύγκριση με τα άτομα που δεν καπνίζουν.
4. Διαβήτης: άτομα που πάσχουν από διαβήτη αναπτύσσουν πιο συχνά τη νόσο και μάλιστα σε σοβαρότερη μορφή.
5. Παχυσαρκία: τα παχύσαρκα άτομα εμφανίζουν συχνότερα αθηροσκλήρωση.
6. Υπερομοκυστεϊναιμία: το αμινοξύ της ομοκυστεϊνης συμμετέχει στην μετατροπή της μεθειονίνης σε κυστεΐνη και η παρουσία υψηλών τιμών στο αίμα σχετίζεται με την επιταχυνόμενη ανάπτυξη αθηρωμάτων και φλεβικών θρομβώσεων.
7. Ηλικία: η νόσος εξελίσσεται με την πρόοδο της ηλικίας
8. Φύλο: οι άνδρες φαίνεται να είναι περισσότερο ευάλωτοι στη δημιουργία αθηρωμάτων, ενώ στις γυναίκες η νόσος εξελίσσεται ραγδαία μετά την εμμηνόπαυση, όπου τα επίπεδα πλησιάζουν εκείνα των ανδρών.
9. Οικογενειακό ιστορικό: σε κάποιες οικογένειες παρατηρείται αυξημένη επίπτωση της νόσου και αυτό αποδίδεται είτε στο διαιτολόγιο που ακολουθείται ή έχει γενετικό υπόβαθρο, όπως για παράδειγμα στην οικογενή υπερχοληστερολαιμία.
10. Επίπεδο δραστηριότητας: η ένταξη της άσκησης στην καθημερινότητα φαίνεται να συμβάλει θετικά στη μείωση των επιπέδων των λιπιδίων, της αρτηριακής πίεσης και στον έλεγχο του σωματικού βάρους και εν τέλει στο αθηρωματικό φορτίο.
11. Ψυχολογικοί παράγοντες: καταστάσεις συναισθηματικού στρες και κατάθλιψης αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης αθηροσκληρωτικής στεφανιαίας νόσου. [2]

Η δημιουργία αθηρωματικών πλακών είναι μια εξελικτική διαδικασία και οι βλάβες που εμφανίζονται παρουσιάζουν διαβάθμιση στο βαθμό σοβαρότητας. Υπάρχουν έξι είδη

βλαβών, και ανάλογα με το βαθμό προσβολής των αρτηριών μπορούν να χαρακτηριστούν ως πρωιμες ή προχωρημένες. Από αυτές, οι τύποι I και II είναι οι μοναδικοί που απαντώνται σε παιδιά, και κάποιες φορές ίσως εμφανιστούν και σε ενήλικα άτομα.

Μορφολογικά, οι τύποι των βλαβών κατατάσσονται στις εξείς κατηγορίες (Εικόνα 1):

Nomenclature and main histology	Sequences in progression	Main growth mechanism	Earliest onset	Clinical correlation
Type I (initial) lesion isolated macrophage foam cells	<pre>graph TD; I((I)) --> II((II)); II --> III((III)); III --> IV((IV)); IV --> V((V)); IV --> VI((VI)); V --> VI; VI --> V;</pre>	growth mainly by lipid accumulation	from first decade	clinically silent
Type II (fatty streak) lesion mainly intracellular lipid accumulation			from third decade	
Type III (intermediate) lesion Type II changes & small extracellular lipid pools				
Type IV (atheroma) lesion Type II changes & core of extracellular lipid		accelerated smooth muscle and collagen increase	from fourth decade	clinically silent or overt
Type V (fibroatheroma) lesion lipid core & fibrotic layer, or multiple lipid cores & fibrotic layers, or mainly calcific, or mainly fibrotic				
Type VI (complicated) lesion surface defect, hematoma-hemorrhage, thrombus		thrombosis, hematoma		

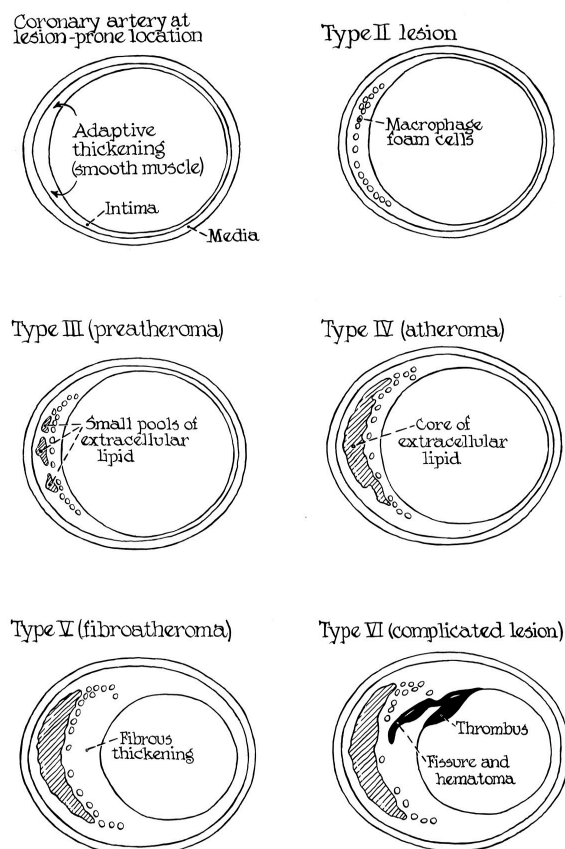
Εικόνα 1. Οι κατηγορίες των αθηρωματικών βλαβών. Το διάγραμμα ροής στην κεντρική στήλη υποδεικνύει μονοπάτια της προοδευτικής εξέλιξης των αθηροσκληρωτικών βλαβών στον άνθρωπο. Οι ρωμαϊκοί αριθμοί υποδεικνύουν ιστολογικά χαρακτηριστικούς τύπους βλαβών που απαριθμούνται στην Εικόνα 2. Η κατεύθυνση των βελών υποδεικνύει την ακολουθία με την οποία μπορεί να αλλάξουν οι χαρακτηριστικές μορφολογίες. Από τον τύπο I στον τύπο IV, οι αλλαγές στη μορφολογία της βλάβης συμβαίνουν κυρίως λόγω της αυξανόμενης συσσώρευσης λιπιδίων. Ο βρόχος μεταξύ των τύπων V και VI δείχνει πώς οι βλάβες αυξάνουν σε πάχος όταν σχηματίζονται θρομβωτικές εναποθέσεις στις επιφάνειές τους. Οι θρομβωτικές εναποθέσεις μπορεί να σχηματιστούν επανειλημμένα σε ποικίλα χρονικά διαστήματα στην ίδια θέση και μπορεί να είναι ο κύριος μηχανισμός για τη σταδιακή απόφραξη αρτηριών μεσαίου μεγέθους.

Πηγή: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.15.9.1512>

- **Βλάβες τύπου I:** οι βλάβες αυτού του τύπου αποτελούνται από τις πρώτες εναποθέσεις λιπιδίων που μπορούν να ανιχνευθούν χημικά καθώς και τις αντιδράσεις που σχετίζονται με τις εναποθέσεις αυτές και τις συναντάμε πιο συχνά σε βρέφη και παιδιά και σε σπάνιες περιπτώσεις σε ενήλικα άτομα. Αυτό που συμβαίνει στο στάδιο αυτό είναι η εναπόθεση λιπιδίων στον έσω χιτώνα με αποτέλεσμα σαν αντίδραση να συσσωρεύονται μακροφάγα και αφρώδη κύτταρα. Το στάδιο αυτό είναι ένα αρχικό στάδιο της νόσου και δεν παρατηρούνται στενώσεις στις αρτηρίες.
- **Βλάβες τύπου II:** οι βλάβες τύπου II είναι πιο ευδιάκριτες από τις βλάβες τύπου I στο μικροσκόπιο και συνήθως εμφανίζονται ως λιπαρές ραβδώσεις κίτρινου χρώματος ή ως κηλίδες στον έσω χιτώνα, ωστόσο έχουν σημειωθεί και βλάβες τύπου II που δεν έχουν την εμφάνιση αυτή. Αποτελούνται κυρίως από αφρώδη κύτταρα μακροφάγων, σταγονίδια λιπιδίων και T λεμφοκύτταρα σε μικρότερο αριθμό σε σχέση με τα μακροφάγα. (Εικόνα 2, Type II)
- **Βλάβες τύπου III:** η βλάβη τύπου III είναι γνωστή ως ενδιάμεση βλάβη, μεταβατική βλάβη ή ασπροαθήρωμα και αποτελεί ένα μεταβατικό στάδιο πριν τις βλάβες τύπου IV, γνωστές ως αθηρώματα, τα οποία θεωρούνται ο πρώτος τύπος προχωρημένης αλλοίωσης. Τα τυπικά ιστολογικά χαρακτηριστικά του τύπου III είναι μικροσκοπικά ορατά εξωκυτταρικά σταγονίδια λιπιδίων και με αποτέλεσμα πάχυνσης του εσωτερικού χιτώνα. (Εικόνα 2, Type III)
- **Βλάβες τύπου IV:** η βλάβη τύπου IV ονομάζεται αθήρωμα και είναι η πρώτη βλάβη που θεωρείται προχωρημένη λόγω της σοβαρής αποδιοργάνωσης του εσωτερικού χιτώνα που προκαλείται από τον χαρακτηριστικό λιπώδη πυρήνα. Ο λιπώδης πυρήνας είναι μια εξωκυτταρική συσσώρευση λιπιδίων, η οποία καταλαμβάνει μια εκτεταμένη αλλά καλά καθορισμένη περιοχή του έσω χιτώνα και φαίνεται να αναπτύσσεται από την αύξηση των μικρών απομονωμένων δεξαμενών εξωκυτταρικών λιπιδίων που χαρακτηρίζουν τις βλάβες τύπου III. Οι πυρήνες αυτοί παχαίνουν το τοίχωμα της αρτηρίας, ωστόσο, το αθήρωμα συχνά δεν περιορίζει τον αυλό των αγγείων. Μεταξύ του λιπώδη πυρήνα και της ενδοθηλιακής επιφάνειας, ο έσω χιτώνας περιέχει μακροφάγα και λεία μυϊκά κύτταρα με ή χωρίς εγκλειστα σταγονίδια λιπιδίων, πρωτεογλυκάνες, αφρώδη κύτταρα και κολλαγόνο. Παρά το ότι οι βλάβες αυτού του τύπου δεν προκαλούν μεγάλη στένωση του αυλού, η κλινική τους σημασία μπορεί να είναι μεγάλη. Λόγω της σύστασης της η περιοχή μπορεί να παρουσιάσει ευκολία στο σχηματισμό βλαβών τύπου VI ευάλωτες σε ρήξη και τελικά το σχηματισμό θρόμβων. (Εικόνα 2, Type IV)
- **Βλάβες τύπου V:** αυτός ο τύπος περιλαμβάνει βλάβες στις οποίες έχει σχηματιστεί νέος ινώδης συνδετικός ιστός. Όταν ο νέος ιστός είναι μέρος μιας βλάβης με λιπιδικό πυρήνα (τύπου IV), τότε μιλάμε για ινοαθήρωμα ή βλάβη τύπου Va. Μια βλάβη τύπου V στην οποία ο λιπιδικός πυρήνας και άλλα μέρη της βλάβης είναι ασβεστοποιημένα μπορεί έχουμε τον τύπο Vb και όταν σε μια βλάβη τύπου V

απουσιάζει ένας λιπιδικός πυρήνας και το λιπίδιο γενικά είναι ελάχιστο τότε ονομάζεται τύπος Vc. Η παρουσία των παραπάνω τύπων συνεπάγεται τη στένωση των αρτηριών και είναι πιθανό να αναπτύξουν ρωγμές, αιμάτωμα ή/και θρόμβους. (Εικόνα 2, Type V)

- **Βλάβες τύπου VI:** Η νοσηρότητα και η θνησιμότητα από αθηροσκλήρωση οφείλεται σε μεγάλο βαθμό σε βλάβες τύπου IV και τύπου V στις οποίες έχουν αναπτυχθεί επιφανειακές διαβρώσεις ή εξελκώσεις, αιμάτωμα ή αιμορραγία και θρομβωτικές εναποθέσεις. Οι βλάβες τύπου IV ή V με ένα ή περισσότερα από αυτά τα χαρακτηριστικά ταξινομούνται ως τύπου VI και ονομάζονται επιπλεγμένες βλάβες και προδιαθέτουν έντονα για οξεία απόφραξη του αυλού των αρτηριών. (Εικόνα 2, Type VI) [3,4]



Εικόνα 2: Σχέδιο διατομών πανομοιότυπου, εγγύτερου τμήματος έξι αριστερών πρόσθιων κατιουσών στεφανιαίων αρτηριών. Η μορφολογία του έσω χιτώνα κυμαίνεται από την προσαρμοστική πάχυνση του έσω χιτώνα που υπάρχει πάντα σε αυτήν την επιρρεπή σε αλλοίωση θέση έως μια βλάβη τύπου VI σε προχωρημένη αθηροσκληρωτική νόσο. Άλλες διατομές δείχνουν αλληλουχία τύπων αθηρωματικών αλλοιώσεων που μπορεί να οδηγήσουν στον τύπο VI. Πανομοιότυπες μορφολογίες μπορεί να βρεθούν και σε άλλα επιρρεπή σε βλάβες τμήματα των στεφανιαίων και πολλών άλλων αρτηριών.

Πηγή: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.15.9.1512>

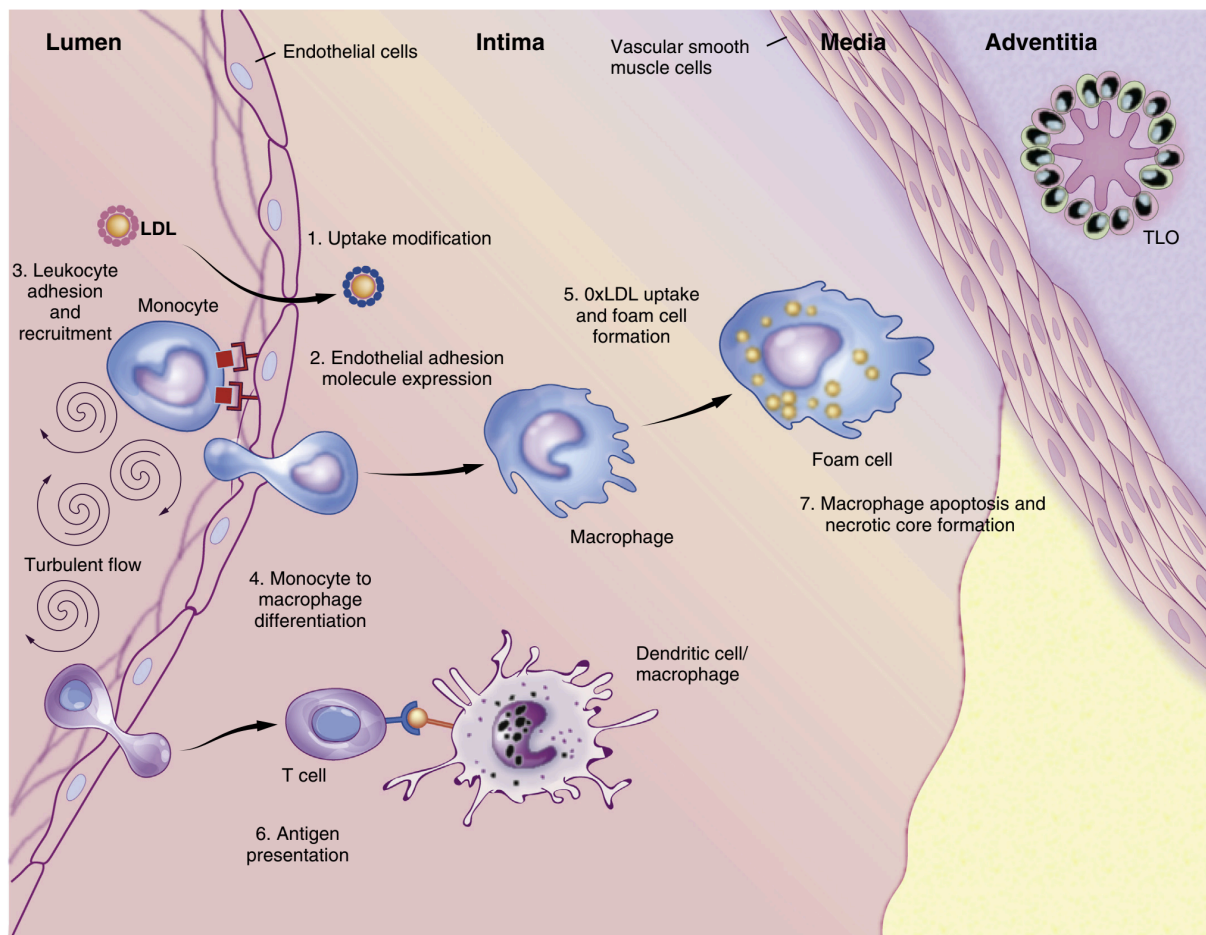
1.2.2 Μοριακό υπόβαθρο δημιουργίας της αθηρωματικής πλάκας

1.2.2.1 Έναρξη της αθηροσκλήρωσης

Η αθηροσκλήρωση ξεκινά με τη διείσδυση της απολιποπρωτεΐνης Β (apoB), η οποία περιέχει LDL, στο τοίχωμα της αρτηρίας. (Εικόνα 3) Οι αθηροσκληρωτικές βλάβες συνήθως εμφανίζονται στις διακλαδώσεις των αρτηριών και στα σημεία που η διάμετρος του αρτηριακού δένδρου αλλάζει. Αυτό οφείλεται στη μετάβαση από την στρωτή κατα μήκος των αγγείων ροή σε στροβιλώδη ροή σε αυτά τα σημεία που θα οδηγήσει σε σημειακή ανακύκλωση του αίματος και συνεπώς αυξημένες συγκεντρώσεις LDL δίπλα στην επιφάνεια του αυλού και ένα μέρος από αυτές θα συκρατηθεί από τις πρωτεογλυκάνες στο τοίχωμα της αρτηρίας. Επίσης, τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι ευαίσθητα στη δύναμη τριβής που δημιουργείται από τη ροή του αίματος και ενώ η φυσιολογική στρωτή ροή κατά μήκος των αγγείων μπορεί να είναι προστατευτική για την αθηροσκλήρωση, μια διαταραγμένη ροή ενεργοποιεί μια προφλεγμονώδη κατάσταση στα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία συμμετέχουν στην έναρξη της φλεγμονώδους αντίδρασης σε σημεία επιρρεπή στην ανάπτυξη αθηροσκληρωτικών βλαβών. Επιπλέον, η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου παρεμποδίζει τη λειτουργία του φραγμού της κυτταρικής στιβάδας, οδηγώντας σε αυξημένη εισροή λιποπρωτεϊνών που περιέχουν χοληστερόλη στον αρτηριακό έσω χιτώνα. Έτσι, η τροποποίηση της συκρατημένης LDL από κάποιο παράγοντα, για παράδειγμα η οξείδωση της, μπορεί να αποτελέσει το αρχικό ερέθισμα για φλεγμονώδη αντίδραση, εφόσον μπορεί να αναγνωριστεί ως επικίνδυνο μοτίβο μορίων (DAMP). Ως απάντηση στην οξειδωμένη LDL θα ενεργοποιηθεί ο υποδοχέας TLR, που θα διεγείρει τα ενδοθηλιακά κύτταρα να εκφράσουν μόρια προσκόλλησης. Τα οξειδωμένα σωματίδια LDL προκαλούν την επιφανειακή έκφραση μορίων προσκόλλησης λευκοκυττάρων όπως E-σελεκτίνη, διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης (ICAM)-1 και αγγειακό κυτταρικό μόριο προσκόλλησης (VCAM)-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία συνδέονται με τους υποδοχείς τους, sialyl-LewisX, ιντεγρίνες CD11/18 και VLA-4, που εκφράζονται στα λευκοκύτταρα. Η συνδυαστική έκφραση μορίων προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα και ιντεγρινών και σελεκτινών στα λευκοκύτταρα παρέχει μια περίπλοκη ρύθμιση της φλεγμονώδους διαδικασίας και καθορίζει τον τύπο και τον τόπο προσέλευσης συγκεκριμένου τύπου μυελοειδών ή λεμφοειδών κυττάρων κατά την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης. (Εικόνα 3), [5,6,7]

1.2.2.2 Φλεγμονή και ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού

Τα λευκοκύτταρα που προσλαμβάνονται στην αναπτυσσόμενη αθηροσκληρωτική βλάβη παράγουν έναν αριθμό φλεγμονωδών μεσολαβητών που θα ενισχύσουν τη φλεγμονώδη αντίδραση μέσω συνεχούς ενεργοποίησης τόσο των λευκοκυττάρων όσο και των ενδοθηλιακών κυττάρων και με την προσέλκυση ανοσοκυττάρων στη σχηματιζόμενη βλάβη. Αυτοί οι μεσολαβητές θα συζητηθούν περαιτέρω. Τα μονοκύτταρα αποτελούν την πλειοψηφία των λευκών αιμοσφαιρίων που προσλαμβάνονται στις αθηροσκληρωτικές πλάκες.



Εικόνα 3: Κυτταρικοί μηχανισμοί αθηροσκλήρωσης. (1) Η λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL) παραμένει στο αγγειακό τοίχωμα, όπου τροποποιείται με οξείδωση. (2) Οξειδωμένη LDL (oxLDL) διεγείρει τα ενδοθηλιακά κύτταρα να εκφράζουν μόρια προσκόλλησης, γεγονός που (3) προκαλεί προσκόλληση και στρατολόγηση λευκοκυττάρων. (4) Τα διηθητικά μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα που (5) απορροφούν oxLDL και γίνονται αφρώδη κύτταρα. (6) Τα δενδριτικά κύτταρα και τα μακροφάγα παρουσιάζουν αντιγόνα στα T κύτταρα. (7) Ο θάνατος των μακροφάγων, για παράδειγμα από απόπτωση, δημιουργεί ένα γεμάτο λιπίδια νεκρωτικό πυρήνα.

Πηγή: Chronic Coronary Artery Disease, Magnus Bäck and Goran K. Hansson, page 46

Μόλις εγκατασταθούν στο τοίχωμα της αρτηρίας, διαφοροποιούνται σε μακροφάγα υπό την επίδραση του μονοκυτταρικού παράγοντα διέγερσης αποικιών (M-CSF) που υπάρχει στις σχηματιζόμενες βλάβες. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα στη αθηροσκληρωτική βλάβη εμπλουτίζουν περαιτέρω το προφλεγμονώδες περιβάλλον, μέσω φλεγμονωδών πρωτεϊνών και λιπιδικών μεσολαβητών, όπως κυτοκίνες και λευκοτριένια. Ο υποτύπος M1 (ή κλάσσιικά ενεργοποιημένος υπότυπος) των μακροφάγων είναι αυτός που συντηρεί τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις και θα οδηγήσει σε βλάβη ιστού. Αντίθετα, οι M2 (ή εναλλακτικά ενεργοποιημένοι) μακροφάγοι εκκρίνουν αντιφλεγμονώδεις μεσολαβητές όπως η λιποξίνη (LX) A4, η ιντερλευκίνη (IL)-10 και ο μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας (TGF)-β και μπορεί να προάγουν την επίλυση της φλεγμονής μέσω της απομάκρυνσης των αποπτωτικών κυττάρων (εφαγοκυττάρωση) και της καταστολής των ανοσολογικών αντιδράσεων, προάγοντας έτσι την επιδιόρθωση και την ίαση του ιστού. Τόσο οι M1 όσο και οι M2 μακροφάγοι είναι παρόντες σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης ανθρώπινης αθηροσκληρώσεως, και από τα δεδομένα προκύπτει ότι τα μακροφάγοι των αθηροσκληρωτικών βλαβών αποτελούν ένα μοναδικό υποσύνολο. [8]

Σε φυσιολογικές καταστάσεις, μέσα στα αγγεία συναντάμε έναν μικρό αριθμό μαστοκυττάρων. Ωστόσο, με τη συσσώρευση λιπιδίων στο αγγειακό τοίχωμα που παρατηρείται στα αρχικά στάδια της αθηροσκληρώσεως, ο αριθμός των μαστοκυττάρων τείνει να αυξάνεται, υποδηλώνοντας ότι οι πρόδρομες μορφές των μαστοκυττάρων προσλαμβάνονται από τον αυλό της αρτηρίας. [9]

Σε αυτό το στάδιο, με την παρουσία της τροποποιημένης και μη τροποποιημένης LDL, μαζί με ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα, η αθηροσκληρωτική βλάβη αρχίζει να εμφανίζεται. Οι οξειδωμένες και οι άλλες τροποποιημένες μορφές σωματιδίων LDL μπορούν να δεσμευτούν σε υποδοχείς, όπως οι SRA-1, CD36 και LOX-1, οι οποίοι εκφράζονται στα εγκατεστημένα μακροφάγα. Η πρόσληψη των λιποπρωτεϊνών θα προκαλέσει τη μετατροπή των μακροφάγων σε αφρώδη κύτταρα, μια παθολογική διαδικασία που οδηγεί στην εμφάνιση μακροφάγων γεμάτων με λιπίδια, χαρακτηριστικό της αθηροσκληρωτικής βλάβης, μια διαδικασία που οδηγεί όχι μόνο στη δημιουργία αφρώδων κυττάρων, αλλά και στην παρουσία αντιγόνων. Με την επεξεργασία των τροποποιημένων λιποπρωτεϊνών και άλλων αντιγόνων και την εμφάνιση στα T κύτταρα, θα ενεργοποιηθεί το προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα μέσα στην αθηροσκληρωτική βλάβη. Αν και η οξείδωση της LDL είχε θεωρηθεί ως η πηγή νεοαντιγόνων, αυτή η υπόθεση φαίνεται να μην ισχύει όπως προκύπτει από αποτελέσματα που δείχνουν ότι τα T κύτταρα σε αθηροσκληρωτικά ποντίκια αναγνωρίζουν πεπτιδικά μοτίβα των φυσικών σωματιδίων LDL και του συστατικού ApoB100 αυτής και μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η κυτταρική ανοσία προς την LDL ως αυτοαντιγόνο μπορεί να προωθή την δημιουργία αθηροσκληρώσεως. [10]

Τα αποτελεσματικά T κύτταρα CD4+ προσλαμβάνονται στην αθηροσκληρωτική βλάβη από μόρια προσκόλλησης λευκοκυττάρων και χημειοτακτικούς παράγοντες που παράγονται λόγω της ενεργοποίησης του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος. Εκτός από τα Th1 κύτταρα, τα

αποτελεσματικά T κύτταρα του υποτύπου Treg υπάρχουν στις αθηροσκληρωτικές βλάβες και λειτουργούν αναστέλλοντας τις ανοσολογικές αντιδράσεις και τη φλεγμονή. Επομένως, θεωρούνται αθηροπροστατευτικά. Τέλος, ο υποτύπος κυττάρων Th17 προάγει την ίνωση μέσω της δράσης της χαρακτηριστικής κυτοκίνης του, της IL-17. Επομένως, η δραστηριότητα του Th17 ενισχύει τον σχηματισμό της ινώδους κάψας της βλάβης και, κατά συνέπεια, πιθανώς τη σταθερότητα της πλάκας. [11,12]

Αρκετοί παράγοντες στις αθηροσκληρωτικές βλάβες προκαλούν απόπτωση των μακροφάγων. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα αποπτωτικά κύτταρα απομακρύνονται από μια ειδική διαδικασία φαγοκυττάρωσης, που ονομάζεται “efferocytosis” και είναι μια ανοσολογική απόκριση απαραίτητη για τη φυσιολογική κατάσταση ενός ιστού και ένα κρίσιμο φαινόμενο στην επίλυση της φλεγμονής. Η ελλιπής απομάκρυνση των αποπτωτικών μακροφάγων γεμάτων με λιπίδια στην αθηροσκληρωτική βλάβη θα δημιουργήσει έναν νεκρωτικό πυρήνα λιπιδίων. (Εικόνα 3) [13,14]

Εκτός από τα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα στο έσω χιτώνα, σύνθετες ανοσολογικές αποκρίσεις συμβαίνουν επίσης στο έξω χιτώνα και στους συνδετικούς ιστούς. Τα αντιγόνα φθάνουν στο έξω χιτώνα μέσω των αγγείων και μέσω της μεταφοράς μακρομορίων από τον αρτηριακό αυλό. Τα φλεγμονώδη κύτταρα που παρατηρούνται στον έξω χιτώνα των αθηροσκληρωτικών βλαβών περιλαμβάνουν δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα, μαστοκύτταρα και λεμφοκύτταρα. Η ενεργοποίηση των T και B κυττάρων είναι παρούσα στον έξω χιτώνα των αθηροσκληρωτικών αγγείων και σε προχωρημένα στάδια αθηροσκλήρωσης, μπορεί να αναπτυχθούν μεγάλες λεμφικές δομές, που αναφέρονται ως τριτογενή λεμφικά όργανα του έξω χιτώνα. (Εικόνα 3) Τα τελευταία περιέχουν αρχέγονα κέντρα με B κύτταρα που διαφοροποιούνται σε κεντροκύτταρα και πλασματοκύτταρα. Γύρω τους, τα δενδριτικά κύτταρα, τα T κύτταρα και τα μακροφάγα σχηματίζουν οργανωμένες δομές και αυτά τα τριτογενή λεμφικά όργανα του έξω χιτώνα είναι σημεία παραγωγής αντισωμάτων, συμπεριλαμβανομένων και των αντισωμάτων των λιποπρωτεΐνης του πλάσματος. Ενδιαφέρον είναι ότι εναποθέσεις οξειδωμένων λιπιδίων που περιέχουν κεροειδή βρίσκονται επίσης εδώ, υποδηλώνοντας ότι μπορεί να χρησιμεύουν ως αντιγονικά ερεθίσματα για την παραγωγή αντισωμάτων. [15,16]

Φλεγμονώδεις και Αντιφλεγμονώδεις Πρωτεΐνες

1. Κυτοκίνες

Τη δεκαετία του 1980, η IL-1 αναγνωρίστηκε ως κυτοκίνη του αγγειακού συστήματος, ρυθμίζοντας τις αιμοστατικές ιδιότητες και την προσκόλληση των λευκοκυττάρων. Η ανακάλυψη ότι τα μακροφάγα ξεκινούν την παραγωγή της IL-1β ως αντίδραση στη συσσώρευση χοληστερόλης μέσω ενός πολυπρωτεϊνικού ολιγομερούς που ονομάζεται φλεγμονόσωμα και η ανάπτυξη αντισωμάτων εξουδετέρωσης της IL-1β για κλινική χρήση

ανανέωσαν το ενδιαφέρον για αυτή την κυτοκίνη στο πλαίσιο της αθηροσκλήρωσης. Άλλες κυτοκίνες που έχουν μελετηθεί για το προ-αθηρογόνο ρόλο τους περιλαμβάνουν τον παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF), την ιντερφερόνη- γ (IFN- γ) και την IL-6 και κάποιες ακόμα. Από ανάλυση αποτελεσμάτων σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα που λαμβάνουν αποκλεισμό του TNF και παρουσιάζουν μειωμένο καρδιαγγειακό κίνδυνο σε σύγκριση με αυτούς που λαμβάνουν εναλλακτική θεραπεία ενισχύεται η άποψη ότι ο TNF είναι ένας σημαντικός προφλεγμονώδης παράγοντας σηματοδότησης στην αθηροσκλήρωση και υποδηλώνει πως ο αποκλεισμός του TNF μπορεί να είναι χρήσιμος για την καρδιαγγειακή πρόληψη. [17,18,19]

Πολλές πειραματικές ενδείξεις εμπλέκουν την IFN- γ , την χαρακτηριστική κυτοκίνη των Th1 κυττάρων, ως ισχυρή προ-αθηροσκληρωτική κυτοκίνη. Η IFN- γ αυξάνει την ανάπτυξη των βλαβών, τροποποιεί τον μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών και αναστέλλει τον σχηματισμό της ινώδους κάψας. Η παρουσία της σε κρίσιμες βλάβες της ανθρώπινης αθηροσκλήρωσης υποστηρίζει την άποψη ότι η δραστηριότητα Th1/IFN- γ μπορεί να είναι επιβλαβής στην αθηροσκλήρωση.

Η IL-6 παράγεται σε μεγάλες ποσότητες από κύτταρα που διεγείρονται από την IL-1, συμπεριλαμβανομένων των αγγειακών και αυτή η κυτοκίνη δρα ως ενισχυτής της αγγειακής φλεγμονής και υπάρχουν αναφορές ότι τα κυκλοφορούντα επίπεδα IL-6 μπορούν να αποτελέσουν ένα προβλεπτικό παράγοντα για τα επερχόμενα κλινικά συμβάντα. Όταν η IL-6 φτάνει στο ήπαρ, προκαλεί μια απόκριση οξείας φάσης που περιλαμβάνει αυξημένη παραγωγή της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης και ινωδογόνου και συνεπώς υψηλότερα κυκλοφορούντα επίπεδα αυτών των αντιδράσεων οξείας φάσης. Επομένως, η μέτρηση της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης αποτελεί έναν τρόπο εκτίμησης της αθηροσκλήρωσης που σχετίζεται με φλεγμονή. Αντίθετα με αυτές τις προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, οι TGF- β και IL-10, που παράγονται από τα μακροφάγα M2 και τα Tregs, ενεργοποιούν κατασταλτικές οδούς και έχουν αντι-αθηροσκληρωτικές επιδράσεις. Τέλος, η IL-17 που παράγεται από τα Th17 κύτταρα μπορεί να αυξήσει τον σχηματισμό αθηροσκλήρωσης και να προάγει τη σύνθεση κολλαγόνου, η οποία σταθεροποιεί την αθηροσκληρωτική βλάβη. [11,20,21]

2. Χημοκίνες

Οι χημοκίνες είναι μια συγκεκριμένη οικογένεια χημειοτακτικών πρωτεϊνών, ταξινομημένες σε υποομάδες με βάση τη θέση των N-τελικών κυστεϊνικών υπολειμμάτων (CC, CXC, CX3C, XC). Πολλές μελέτες έχουν υποστηρίξει τον καθοριστικό ρόλο των χημοκινών στην αθηροσκλήρωση μέσω της μεσολάβησης της πρόσληψης ανοσοκυττάρων και της ρύθμισης της ενεργοποίησης διαφορετικών τύπων και υποομάδων ανοσοκυττάρων. Η CXCL1 που προέρχεται από το ενδοθήλιο και η MCP-1 (γνωστή και ως CCL2) εμπλέκονται στην πρόωμη αθηροσκλήρωση μέσω συγκεκριμένων υποδοχέων χημοκινών. Ο παράγοντας αναστολής

μετανάστευσης (MIF), επίσης συνδέεται με υποδοχείς χημοκινών (CXCR2 και CXCR4) για να μεσολαβήσει στην πρόσληψη μονοκυττάρων και Τ λεμφοκυττάρων στις αθηροσκληρωτικές βλάβες. Η αναστολή της σύνδεσης του MCP-1 με τον CCR2 μειώνει τους φλεγμονώδεις βιοδείκτες σε άτομα με καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου, υποστηρίζοντας τη σημασία της σηματοδότησης των χημοκινών ως ρυθμιστή της φλεγμονής στην αθηροσκλήρωση. [19,22]

Σε αντίθεση με τις προαναφερθείσες προφλεγμονώδεις επιδράσεις που προκαλούνται από τις χημοκίνες, άλλες χημοκίνες, όπως οι CCL19/CCL21, CXCL5 και CXCL12, μεσολαβούν στην υποχώρηση των μακροφάγων από τις αθηροσκληρωτικές βλάβες, εμποδίζουν τον σχηματισμό κυττάρων αφρού, βελτιώνουν την επισκευή του ενδοθηλίου και αυξάνουν τη σταθερότητα της πλάκας υπό ορισμένες συνθήκες, δείχνοντας ότι οι αλλαγές στα προφίλ των χημοκινών μπορεί να καθοδηγήσουν την αθηροσκληρωτική βλάβη είτε προς την πρόοδο είτε προς την υποχώρηση. [8]

Λιπιδικοί Μεσολαβητές της Φλεγμονής και της Επίλυσης

Εκτός από τις πρωτεΐνες που αναφέρθηκαν παραπάνω, τα βιοδραστικά λιπίδια παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την αθηροσκλήρωση. Παράγονται είτε από εξωκυτταρικό μεταβολισμό φωσφολιπιδίων ή από κυκλοφορούντα λιποπρωτεΐνες είτε από ενδοκυτταρικές ενζυματικές οδούς που χρησιμοποιούν φωσφολιπίδια της μεμβράνης ως υπόστρωμα.

- Φωσφολιπάσες

Από την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων σε λιπαρά οξέα από την οικογένεια των ενζύμων φωσφολιπάσης A2 (PLA2) απελευθερώνονται αραχιδονικό οξύ και λυσοφωσφολιπίδια. Η εκκριτική sPLA2 έχει ανιχνευθεί σε ανθρώπινες αθηροσκληρωτικές βλάβες και συμμετέχει στην τροποποίηση της LDL μέσω της υδρόλυσης της φωσφατιδυλοχολίνης, καθιστώντας το μόριο της LDL πιο αθηρογόνο. Μια ακόμα ισοένζυμη PLA2, η LpPLA2, που υδrolύει τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια σε LDL σωματίδια σε προφλεγμονώδη λυσοφωσφατιδυλοχολίνη και οξειδωμένα μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα (oxNEFAs), έχει επίσης ταυτοποιηθεί ως δείκτης κινδύνου για αθηροσκλήρωση. [19,23,24,25]

- Η Οδός της Κυκλοοξυγενάσης

Τα δύο ένζυμα κυκλοοξυγενάσης (COX), COX-1 και COX-2, καταλύουν το σχηματισμό προσταγλανδινών (PGs) και θρομβοξανής (TX). Τα ισοένζυμα COX είναι οι στόχοι για τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAIDs). Η χρήση χαμηλής δόσης ασπιρίνης στη δευτερογενή πρόληψη βασίζεται στην μη αναστρέψιμη αναστολή της COX-1 στα αιμοπετάλια, τα οποία δεν έχουν την ικανότητα να επανασυνθέσουν τα ένζυμα COX, οδηγώντας σε επιλεκτική αναστολή του σχηματισμού της θρομβοξανής A2 (TXA2) που προάγει την συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων. Σε αντίθεση με την COX-1, η έκφραση της

ισομορφής COX-2 επάγεται από προφλεγμονώδη ερεθίσματα στις περιοχές φλεγμονής, όπως στην περίπτωση των αθηροσκληρωτικών βλάβων. Παρά τις πιθανές αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις, το δυσμενές αποτέλεσμα της αναστολής της COX-2 στην αθηροσκλήρωση μπορεί να οφείλεται σε μια διαταραγμένη ισορροπία μεταξύ της TXA2 και της προστακυκλίνης, οι οποίες ασκούν αντίθετες επιδράσεις όσον αφορά την συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων, την προαθηρογόνο και αντιαθηρογόνο σηματοδότηση και τις μεταβολές της αγγειακής αντιδραστικότητας. Ωστόσο, άλλες προσταγλανδίνες επίσης επηρεάζουν αρκετές αποκρίσεις στο αγγειακό τοίχωμα και στα φλεγμονώδη κύτταρα με πιθανή σημασία για την αθηροσκλήρωση και η ισορροπία της οδού COX, τόσο τοπικά στις αθηροσκληρωτικές βλάβες όσο και συστηματικά, μπορεί να είναι πιο περίπλοκη. [26,27]

- Οι Οδοί της Λιποξυγενάσης/Λευκοτριενίων

Το αραχιδονικό οξύ χρησιμεύει επίσης ως υπόστρωμα για το ένζυμο 5-λιποξυγενάση (5-LO) και για τη βιοσύνθεση των λευκοτριενίων (LT). Ο μεταβολισμός του αραχιδονικού οξέος από το ένζυμο 5-LO μαζί με την πρωτεΐνη ενεργοποίησης της 5-LO (FLAP) οδηγεί στον σχηματισμό του ασταθούς LTA4, το οποίο στη συνέχεια είτε υδρολύεται στο διυδροξυ-LTB4 είτε συζευγνύεται με γλουταθειόνη για να αποδώσει τα κυστεϊνυλικά LTs (LTC4, LTD4 και LTE4). Αυτά τα LTs δρουν σε συγκεκριμένους υποδοχείς, τους υποδοχείς BLT και CysLT, αντίστοιχα, για να μεταδώσουν διάφορες προφλεγμονώδεις επιδράσεις με επιπτώσεις για την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης, όπως η πρόσληψη και ενεργοποίηση λευκοκυττάρων, ο πολλαπλασιασμός των λείων μυϊκών κυττάρων (SMC) και η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου. Η τοπική βιοσύνθεση των LT και η έκφραση των ενζύμων που σχηματίζουν τα LT ανιχνεύονται σε ανθρώπινες αθηροσκληρωτικές βλάβες, και οι μελέτες βιοδεικτών έχουν συσχετίσει τα LT με οξεία στεφανιαία σύνδρομα και υποκλινική αθηροσκλήρωση. Ωστόσο, από τη γενετική ή φαρμακολογική στόχευση της 5-LO και της FLAP έχει προκύψει αντιφατικά αποτελέσματα όσον αφορά την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης σε υπερλιπιδαιμικά μοντέλα ποντικών. [28,29,30,31]

- Εξειδικευμένοι Διαλυτές Φλεγμονής

Εκτός από τον σχηματισμό προφλεγμονωδών λευκοτριενίων, οι λιποξυγενάσες συμμετέχουν επίσης στο σχηματισμό αντιφλεγμονωδών λιπιδίων, τα οποία συμμετέχουν στην επίλυση της φλεγμονής. Για παράδειγμα, ο μεταβολισμός του αραχιδονικού οξέος μέσω διπλής λιποξυγόνωσης οδηγεί στον σχηματισμό λιποξίνης A4 (LXA4), ενώ ο μεταβολίτης που προκύπτει από την διαδοχική δράση της LO και της COX-2 ακετυλιωμένης από ασπιρίνη είναι μια αναλογία της LXA4 που ονομάζεται λιποξίνη προκαλούμενη από ασπιρίνη (ATL). Αυτές οι λιποξίνες παράγονται τοπικά σε στεφανιαίες αθηροσκληρωτικές βλάβες, και τα επίπεδά τους αυξάνονται μετά από θεραπεία με ασπιρίνη. [14,32]

Εκτός από το αραχιδονικό οξύ, τα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα μπορούν να χρησιμεύσουν ως υπόστρωμα για τον μεταβολισμό της λιποξυγενάσης, αποδίδοντας μια σειρά από βιοδραστικά λιπίδια, όπως οι ρεζολβίνες, οι μαρεσίνες και οι προτεκτίνες, οι οποίες επίσης προάγουν την επίλυση της φλεγμονής. Η συμπλήρωση με ιχθυέλαιο σε ποντικούς ApoE^{-/-} οδηγεί σε αυξημένη ενσωμάτωση των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων δοκοσαεξανοϊκού οξέος (DHA) και εικοσαπεντανοϊκού οξέος (EPA) στις κυτταρικές μεμβράνες διαφόρων οργάνων, αλλά οι επιδράσεις στην αθηροσκλήρωση παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις μεταξύ διαφορετικών μελετών, χρονικών σημείων και μοντέλων.[14,33,34]

Οι λιποξίνες και οι ρεζολβίνες διεγείρουν την φαγοκύτωση, η οποία είναι ένας σημαντικός μηχανισμός της επίλυσης της φλεγμονής και μπορεί να χρησιμεύσει στη μείωση του σχηματισμού νεκρωτικού πυρήνα στην αθηροσκλήρωση. (Εικόνα 3) Η LXA₄, η ATL και η RvD1 ασκούν τις διαλυτικές τους δράσεις μέσω του υποδοχέα FPR2/ALX (υποδοχέας πεπτιδίου φορμυλίου 2 και υποδοχέας λιποξίνης τύπου A), ο οποίος ενεργοποιείται επίσης από έναν αριθμό προφλεγμονωδών αγωνιστών στην αθηροσκληρωτική βλάβη. Μελέτες σε ανθρώπινες αθηροσκληρωτικές πλάκες καρωτίδας και ζωικά μοντέλα έχουν εμπλέξει αυτόν τον υποδοχέα στην πρόοδο της αθηροσκλήρωσης και στη σταθερότητα της πλάκας. Εκτός από τους μακροφάγους, ο υποδοχέας FPR2/ALX εκφράζεται επίσης σε αγγειακά SMCs, και η ATL αναστέλλει τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των αγγειακών SMCs, προτείνοντας πρόσθετα οφέλη της ασπιρίνης στη θεραπεία της στεφανιαίας αθηροσκλήρωσης. [14,35,36,37,38,39]

Η σύνδεση μεταξύ των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων και της μειωμένης καρδιαγγειακής φλεγμονής παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στους Ινουίτες της Γροιλανδίας. Τα υψηλότερα επίπεδα DHA και EPA στο πλάσμα και τα αιμοπετάλια των Ινουιτών σε σύγκριση με άλλους Σκανδιναβούς συσχετίστηκαν αντίστροφα με τα ποσοστά εμφράγματος του μυοκαρδίου σε πληθυσμιακό επίπεδο. Στη συνέχεια συγκεντρώθηκαν επιδημιολογικά και κλινικά δεδομένα τα οποία υποστηρίζουν τις αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων. Ωστόσο, οι επιδράσεις των ωμέγα-3 στη δευτερογενή πρόληψη της στεφανιαίας νόσου δεν έχουν αναπαραχθεί με συνέπεια, και περαιτέρω μελέτες βρίσκονται σε εξέλιξη. [14,34,40]

Ενδοκυτταρικές Οδοί Σηματοδότησης Φλεγμονής

- p38 Πρωτεϊνική Κινάση Ενεργοποιούμενη από Μιτογόνα
Μεταξύ των ενδοκυτταρικών οδών που μεταφέρουν τις κυτταρικές αποκρίσεις στα εξωκυττάρια προφλεγμονώδη ερεθίσματα, οι φωσφορυλιώσεις διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής δραστηριότητας. Η κινάση σερίνης p38 είναι μία από τις οδούς πρωτεϊνικής κινάσης που ενεργοποιείται από μιτογόνα (MAPK) που μεταδίδει και ενισχύει τις ενδοκυτταρικές φλεγμονώδεις αντιδράσεις, όπως η παραγωγή κυτοκινών (IL-1β,

TNF και IL-6) και η δραστηριότητα ενζύμων (σχηματισμός PGE2 από την COX-2). Επιπλέον, η φωσφορυλίωση της p38 μπορεί να ανασταλεί από εξειδικευμένους διαλυτές φλεγμονής στο πλαίσιο του ρόλου τους στην επίλυση της φλεγμονής. Πρόσφατες κλινικές αξιολογήσεις έχουν προτείνει μια πιθανή αντιφλεγμονώδη και συνεπώς ευεργετική επίδραση των αναστολέων της p38 στη θεραπεία της αθηροσκλήρωσης. [19]

- Φλεγμονόσωμα

Στη κλασική φλεγμονή που προκαλείται από κρυστάλλους, κρύσταλλοι ουρικού μονονατρίου και αφυδατωμένου πυροφωσφορικού ασβεστίου που λαμβάνονται από μακροφάγα ενεργοποιούν το φλεγμονόσωμα NALP3 που ενεργοποιεί την κασπάση-1, με αποτέλεσμα την αποκοπή της προ-IL-1β και την έκκριση της ενεργής IL-1β. Στην αθηροσκλήρωση, η κρυστάλλωση της χοληστερόλης στα μακροφάγα μπορεί να προκαλέσει ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3 και να διεγείρει την παραγωγή IL-1β ως άμεση φλεγμονώδη αντίδραση στη συσσώρευση χοληστερόλης.

Μια πιθανή στρατηγική για την αναστολή της ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος που προκαλείται από κρυστάλλους και της έκκρισης IL-1β προσφέρεται από τον αναστολέα μικροσωληνίσκων κολχικίνη, που μειώνει την αθηροσκλήρωση σε υπερχοληστερολαιμικούς ποντικούς και συνδέεται με μειωμένο καρδιαγγειακό κίνδυνο σε μελέτες παρατήρησης και σε τυχαιοποιημένες δοκιμές. Ωστόσο, οι προοπτικές αναστολής της ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος στη δευτερογενή πρόληψη μέσω της κολχικίνης μπορεί να περιορίζονται λόγω των παρενεργειών της. [17,19,41,42]

- Πυρηνικός Παράγοντας-Κάππα B (NF-κB)

Ο πυρηνικός παράγοντας-κάππα B (NF-κB) είναι ένας ευαίσθητος στις οξειδώσεις μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιείται στις ανθρώπινες αθηροσκληρωτικές πλάκες, μετά από τον υποδοχέα της IL-1β. Επιπλέον, η μεταβίβαση σήματος του TLR συνδέεται με την οδό NF-κB μέσω μιας αλυσίδας πρωτεϊνών μεταβίβασης, συμπεριλαμβανομένων των MyD88 και IRAK. Ο παράγοντας που σχετίζεται με τον υποδοχέα του TNF (TRAF) μεταδίδει στη συνέχεια το σήμα είτε στην οδό MAP κινάσης/AP-1 είτε στην ενεργοποίηση της Ικ-κινάσης, οδηγώντας σε μετατόπιση του NF-κB στον πυρήνα για τη ρύθμιση ενός μεγάλου αριθμού φλεγμονωδών γονιδίων. Ακόμα ένας ενεργοποιητής του NF-κB, είναι ο υποδοχέας ενεργοποιητής του NF-κB (RANK), ο οποίος είναι μέλος της οικογένειας των υποδοχέων του TNF και συζητείται παρακάτω. Μετά την ενεργοποίησή του από τον λιγανδίνη του RANK (RANKL), ο κυτταροπλασματικός τομέας του RANK σηματοδοτεί μέσω των TRAFs για την ενεργοποίηση του NF-κB. [5]

- Η Οδός Jak/STAT

Η οικογένεια των κινασών Janus (Jak) ενεργοποιείται από αρκετούς υποδοχείς που δεσμεύουν κυτοκίνες, συμπεριλαμβανομένων των IFN-γ και IL-6. Οι υποδοχείς Jak

σηματοδοτούν μέσω της οικογένειας πρωτεϊνών μεταφοράς σήματος και ενεργοποίησης της μεταγραφής (STAT). Η στόχευση της οδού Jak/STAT κάτω από τους υποδοχείς IFN έχει βαθιές επιδράσεις στη φλεγμονή, τον σχηματισμό αφρώδη κυττάρων και την αθηροσκλήρωση. [5]

- NADPH Οξειδάση

Η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) μπορεί να αποτελεί βασικό παράγοντα αθηροσκλήρωσης. Αυξημένα επίπεδα ROS προκαλούν δυσρύθμιση του μονοξειδίου του αζώτου (NO), οδηγώντας σε δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και προκαλώντας μιτογόνες επιδράσεις των λείων μυϊκών κυττάρων (SMCs) στην ανάπτυξη της υπερπλασίας του εσωτερικού τοιχώματος. Επιπλέον, η παραγωγή ROS μπορεί να εμπλέκεται άμεσα στη ρύθμιση των φλεγμονωδών κυκλωμάτων μέσα στο αγγειακό τοίχωμα. Σε αυτό το πλαίσιο, η οικογένεια ενζύμων NADPH οξειδάσης καταλύει τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου στο οξυγόνο για τη δημιουργία υπεροξειδίου ή υπεροξειδίου του υδρογόνου. [5]

- Φωσφοδιεστεράσες

Τα κυκλικά νουκλεοτίδια είναι σημαντικοί αγγελιοφόροι με επιπτώσεις στη φλεγμονή. Τα ένζυμα αδενολική κυκλάση και γουανυλική κυκλάση καταλύουν τον σχηματισμό της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) και της κυκλικής μονοφωσφορικής γουανίνης (cGMP) αντίστοιχα. Αρκετοί ενδογενείς αντιφλεγμονώδεις μεσολαβητές, όπως η προστακυκλίνη, μπορούν να έχουν αρνητική επίδραση στα φλεγμονώδη κύτταρα μέσω αυξημένων ενδοκυτταρικών επιπέδων cAMP ως δεύτερος αγγελιοφόρος. Επιπλέον, το cGMP διεγείρεται συνήθως από το NO μέσω της ενεργοποίησης της διαλυτής γουανυλικής κυκλάσης. Η ενδοκυτταρική αύξηση των κυκλικών νουκλεοτιδίων είναι παροδική, καθώς τα cAMP και cGMP διασπώνται από τις φωσφοδιεστεράσες (PDEs), μια ομάδα ενζύμων που αποτελείται από πολλαπλές ισομορφές με συγκεκριμένη ιστική έκφραση και συγγένεια με το υπόστρωμα. Η αναστολή της υδρόλυσης του cAMP και του cGMP μέσω των αναστολέων PDE μπορεί επομένως να ενισχύσει τις επιδράσεις των ενδογενών αντιφλεγμονωδών μεσολαβητών και των εξειδικευμένων διαλυτών φλεγμονής. [5]

1.2.2.3 Ασβεστοποίηση

Εκτός από τη συσσώρευση λιπιδίων και τη φλεγμονή, η αγγειακή ασβεστοποίηση παίζει σημαντικό ρόλο στην αθηροσκλήρωση. Ο προσδιορισμός της ποσότητας ασβεστίου στις στεφανιαίες αρτηρίες μέσω αξονικής τομογραφίας παρέχει μια μη επεμβατική εκτίμηση του συνολικού φορτίου της αθηροσκλήρωσης. Αυξημένη ασβεστοποίηση των στεφανιαίων αρτηριών (CAC) έχει συνδεθεί με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο και παρέχει περαιτέρω προγνωστικές πληροφορίες πέρα από τους παραδοσιακούς καρδιαγγειακούς παράγοντες

κινδύνου. Η ασβεστοποίηση των αρτηριών αυξάνει τη σκληρότητα του αγγειακού τοιχώματος και ένα μοτίβο διάσπικτης αγγειακής ασβεστοποίησης περιγράφεται στις αθηροσκληρωτικές αλλοιώσεις. Αυτές οι μικροασβεστοποιήσεις έχουν ιδιαίτερη σημασία, καθώς μπορεί να είναι σημείο αστάθειας της πλάκας και να προκαλέσουν τη ρήξη της. Αντίστοιχα, οι στεφανιαίες αθηροσκληρωτικές αλλοιώσεις που προέρχονται από άτομα με οξεία στεφανιαία σύνδρομα παρουσιάζουν πολλαπλές μικρές αποθέσεις ασβεστίου, ενώ εκείνες που προέρχονται από άτομα με σταθερή στεφανιαία νόσο έχουν λίγες και μεγαλύτερες αποθέσεις ασβεστίου. Επομένως, είτε ως μέρος μιας γενικής αρτηριοσκληρώσεως είτε τοπικά σε αθηροσκληρωτικές αλλοιώσεις, η αγγειακή ασβεστοποίηση έχει σημαντική επίδραση στη βιομηχανική των αγγείων. Η αθηροσκληρωτική ασβεστοποίηση είναι μια ενεργή διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει αποθέσεις ασβεστίου, προασβεστοποιητικά σωματίδια και μια φαινοτυπική διάκριση των αγγειακών SMCs προς ένα οστεοβλαστικό φαινότυπο, ενώ συνδέεται επίσης με τη φλεγμονή. [6,43,44,45,46]

Ενδοκυτταρικές Οδοί Αγγειακής Ασβεστοποίησης

- Σηματοδότηση Wnt

Οι αγωνιστές της κανονικής οδού wingless (Wnt), που αναφέρεται επίσης ως η οδός Wnt/β-κατενίνης, δεσμεύουν τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον υποδοχέα LDL (LRP) 5 και 6 με τις πρωτεΐνες Frizzled ως συνεκδοχείς. Αυτό θα οδηγήσει στη συσσώρευση β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα και στη συνέχεια στη μετατόπισή της στον πυρήνα και στην επαγωγή γονιδιακής έκφρασης (Εικόνα 4.5), όπως, για παράδειγμα, την πρωτεΐνη μορφογένεσης των οστών (BMP)-2. [47]

- Σηματοδότηση SMAD

Οι BMPs είναι μέλη της υπερικογένειας των λιγανδών TGF-β, που ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και την ασβεστοποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων (SMCs). Η κανονική οδός σηματοδότησης BMP συνδέεται με τη φωσφορυλίωση των SMAD-1/5/8. Οι οδοί TGF-β και BMP συγκλίνουν όταν οι αντίστοιχοι φωσφορυλιωμένοι SMADs δεσμεύονται στον συνεταίρο SMAD-4 και μετατοπίζονται στον πυρήνα για την επαγωγή γονιδιακής έκφρασης. Αντίθετα, ο SMAD-6 λειτουργεί ως αναστολέας της σηματοδότησης BMP αποτρέποντας το σχηματισμό του συμπλόκου SMAD-1-SMAD-4. [48]

- Σηματοδότηση Notch1

Μια σημαντική οδός στην αρτηριακή ασβεστοποίηση είναι η διαμεμβρανική πρωτεΐνη Notch1, η οποία, όταν δεσμεύεται στους γειτονικούς κυτταρικούς υποδοχείς τύπου delta-like ή jagged, διασπάται και το ελεύθερο ενδοκυτταρικό τμήμα μετατοπίζεται στον πυρήνα για να ρυθμίσει τη γονιδιακή έκφραση (βλ. Εικόνα 4.5)

Εξωκυτταρικές Οδοί Αγγειακής Ασβεστοποίησης [5]

Εξωκυτταρικά μονοπάτια των αγγείων Ασβεστοποίηση

- Matrix Gla Protein

Η χρήση ανταγωνιστών της βιταμίνης K, όπως η βαρφαρίνη, ως αντιπηκτική θεραπεία έχει συνδεθεί με αυξημένη αγγειακή ασβεστοποίηση. Ο μηχανισμός περιλαμβάνει την αναστολή της εξωηπατικής βιταμίνης K-εξαρτώμενης καρβοξυλίωσης των υπολειμμάτων γλουταμινικού οξέος στην πρωτεΐνη Matrix Gla (MGP), που είναι ένας αναστολέας της ασβεστοποίησης. Η γ-καρβοξυλιωμένη μορφή της MGP δεσμεύει την BMP-2 για να προστατεύσει τους μη οστικούς ιστούς από την ασβεστοποίηση. Ως εκ τούτου, τα ποντίκια που στερούνται την MGP παρουσιάζουν εκτεταμένες καρδιαγγειακές ασβεστοποιήσεις. Ομοίως, η συγχορήγηση βαρφαρίνης και βιταμίνης K (για την ειδική αναστολή της εξωηπατικής καρβοξυλίωσης) σε τρωκτικά προκαλεί μεσαία αρτηριακή ασβεστοποίηση και αυξάνει τη σκληρότητα των αγγείων. Όταν χορηγείται σε ποντίκια ApoE^{-/-}, η βαρφαρίνη επίσης αυξάνει τις μικροασβεστοποιήσεις των αθηροσκληρωτικών πλακών. [46,49,50]

- Οδός OPG/RANKL/RANK

Η ενεργοποίηση του RANK, που εκφράζεται στην επιφάνεια των οστεοκλαστών από τον RANKL, είναι κρίσιμη για τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών. Αντίθετα, η οστεοπροτεγερίνη (OPG), ένας διαλυτός υποδοχέας που είναι μέρος της υπερικογένειας των υποδοχέων TNF, δεσμεύει τον RANKL και έτσι εμποδίζει την αλληλεπίδρασή του με τον RANK, προλαμβάνοντας την καταστροφή των οστών. Τα συστηματικά επίπεδα OPG και η γονιδιακή έκφραση των OPG, RANKL, και RANK στα λευκοκύτταρα έχουν ανιχνευθεί σε άτομα με στεφανιαία νόσο. Μία μελέτη εντόπισε αυξημένη έκφραση του RANKL σε T-λεμφοκύτταρα που προέρχονταν από ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο σε σύγκριση με αυτά που προέρχονταν από ασθενείς με σταθερή στεφανιαία νόσο, δείχνοντας έτσι τη σύνδεση μεταξύ της οδού OPG/RANKL/RANK και της φλεγμονής στην αθηροσκλήρωση. Σε ποντίκια ApoE^{-/-}, οι OPG, RANK, και RANKL εκφράζονται τόσο στα ανοσοκύτταρα όσο και στα αγγειακά SMCs, και η θεραπεία με OPG προάγει τον σχηματισμό της ινώδους κάψας. Επιπλέον, τα μεγαλύτερα ποντίκια που στερούνται τόσο το ApoE όσο και το OPG παρουσιάζουν αυξημένη ασβεστοποίηση των αθηροσκληρωτικών βλαβών της ανώδυνης αρτηρίας και αυξημένη δραστηριότητα των MMP σε μακροφάγα και SMCs. Σε αντίθεση με τις επιδράσεις του στον οστικό ιστό, ο RANKL προκαλεί ασβεστοποίηση των αγγειακών SMCs μέσω της ενεργοποίησης της οδού RANK και NF-κB. Επιπλέον, η OPG μειώνει την in vitro ασβεστοποίηση των αγγειακών SMCs, τόσο με την αναστολή των επιδράσεων που προκαλούνται από τον RANKL όσο και με άμεσες επιδράσεις στη σηματοδότηση Notch1. [51,52,53,54,55]

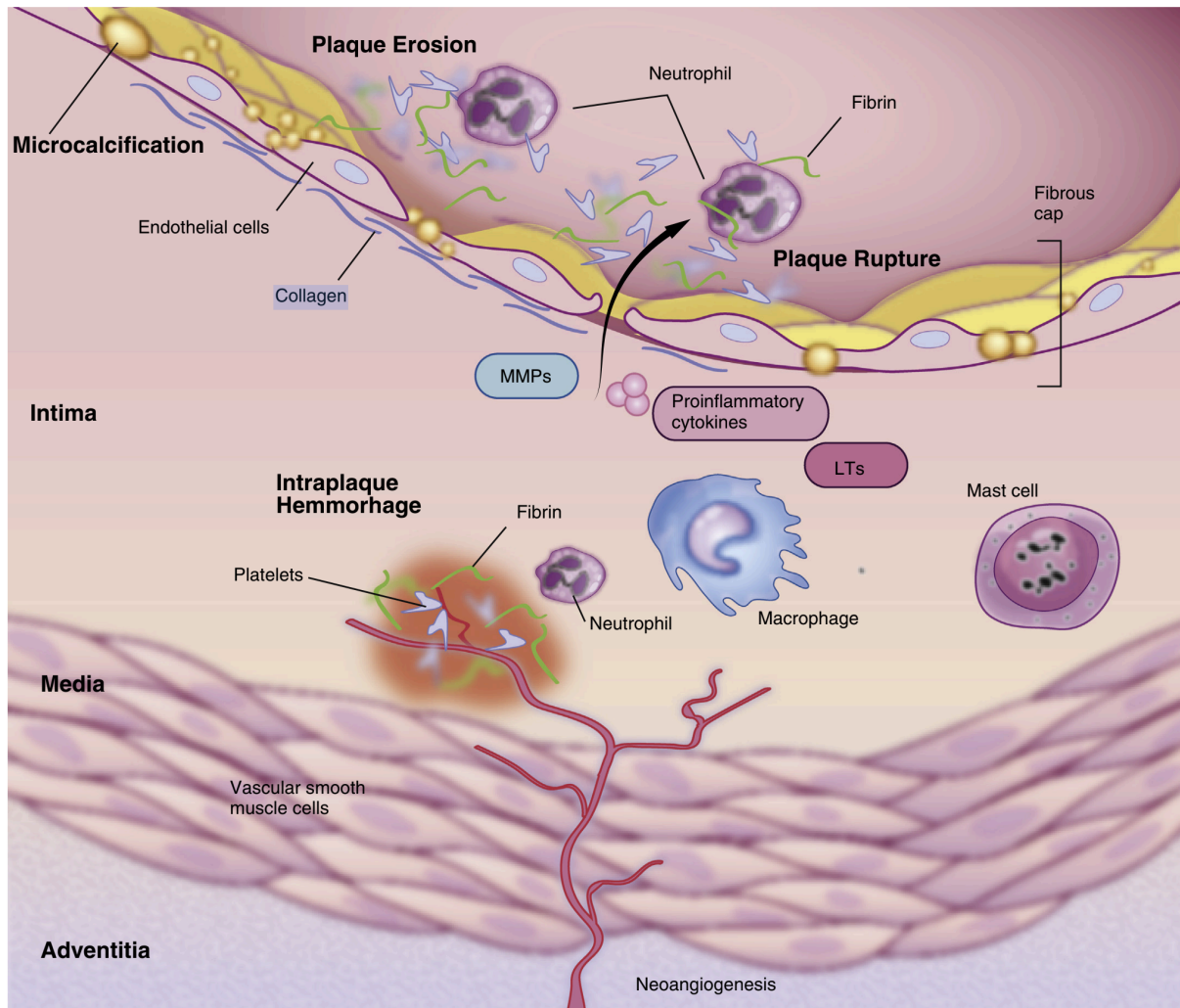
1.2.2.4 Η Ευάλωτη Πλάκα

1. Ρήξη της Πλάκας

Καθώς αναπτύσσεται η αθηροσκληρωτική πλάκα, τα SMCs και το κολλαγόνο σχηματίζουν μια κάψα για να προστατεύσουν τα λιπίδια και το φλεγμονώδες περιεχόμενο από την επαφή με το αίμα. Η αποδόμηση αυτής της ινώδους κάψας που περιβάλλει τον πυρήνα μιας στεφανιαίας αθηροσκληρωτικής βλάβης προκαλεί ρήξη της πλάκας και προάγει οξεία θρόμβωση. (Εικόνα 4) Εάν συμβεί πλήρης απόφραξη της στεφανιαίας αρτηρίας, το μυοκάρδιο θα γίνει ισχαιμικό και ο ασθενής θα αναπτύξει έμφραγμα του μυοκαρδίου. Η ρήξη της αθηροσκληρωτικής πλάκας οφείλεται σε απώλεια της μηχανικής σταθερότητας της ινώδους κάψας που περιβάλλει την πλάκα. Επομένως, ο έλεγχος του σχηματισμού και της ανανέωσης της κάψας είναι κρίσιμος για τη σταθερότητα της πλάκας.

Οι κυτταροκίνες που διεγείρουν τη διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων και την παραγωγή κολλαγόνου τείνουν να σταθεροποιούν τις πλάκες, ενώ οι κυτταροκίνες που αναστέλλουν αυτές τις διαδικασίες τις αποσταθεροποιούν. Η TGF- β και η IL-17A είναι ισχυρές ινωγόνες κυτταροκίνες και επομένως προάγουν τη σταθερότητα της πλάκας. Η τελευταία εκκρίνεται από τα κύτταρα Th17, ενώ η TGF- β παράγεται από διάφορους τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των Treg, ορισμένων μακροφάγων, SMCs, και αιμοπεταλίων. Αντισταθμίζοντας αυτές τις κυτταροκίνες, η προφλεγμονώδης κυτταροκίνη Th1, IFN- γ , αναστέλλει ισχυρά τη διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων και την παραγωγή κολλαγόνου. Ως εκ τούτου, έχει ενοχοποιηθεί ως μια κυτταροκίνη που αποσταθεροποιεί την πλάκα.

Η αποσταθεροποίηση της πλάκας μπορεί να προκληθεί από έναν αριθμό πρωτεϊνών που απελευθερώνονται, για παράδειγμα, από μακροφάγα, μαστοκύτταρα, λεμφοκύτταρα και ουδετερόφιλα κοκκιοκύτταρα. Παραδείγματα τέτοιων πρωτεϊνών είναι οι οικογένειες των μεταλλοπρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας (MMP) ή των καθεψινών. Οι MMP είναι ενδοπεπτιδάσες που περιέχουν ψευδάργυρο και εμπλέκονται στον μεταβολισμό της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, καθώς και στην διάσπαση άλλων πρωτεϊνών. Αρκετές από τις MMP εκφράζονται τοπικά εντός των ανθρώπινων αθηροσκληρωτικών βλαβών, και βιοδείκτες, γενετικές και πειραματικές μελέτες έχουν υποστηρίξει τη συμμετοχή τους στη ρήξη της πλάκας και τον αυξημένο κίνδυνο για οξεία στεφανιαία επεισόδια. Οι μικροαβεστώσεις στην ινώδη κάψα μπορεί επίσης να αποτελούν μέρος της αποσταθεροποίησης της πλάκας και να οδηγούν στη ρήξη της πλάκας (Εικόνα 4) [56,57,58]



Εικόνα 4: Η ΕΥΑΛΩΤΗ ΠΛΑΚΑ. Το ενδοθήλιο, που περιέχει κυρίως λεία μυϊκά κύτταρα και κολλαγόνο, προστατεύει το λιπιδικό και φλεγμονώδες περιεχόμενο της αθηροσκληρωτικής βλάβης από την επαφή με το αίμα. Κατά τη διάβρωση της πλάκας, τα ενδοθηλιακά κύτταρα αποκολλώνται και η έκθεση της υποενδοθηλιακής μήτρας θα οδηγήσει σε ενεργοποίηση ουδετερόφιλων και σχηματισμό θρόμβου. Η υποβάθμιση αυτού του ενδοθηλιακού καλύμματος που περιβάλλει τον πυρήνα μιας στεφανιαίας αθηροσκληρωτικής βλάβης προκαλεί ρήξη πλάκας, προκαλώντας οξεία θρόμβωση και απόφραξη αγγείων. Υποξία και αυξητικοί παράγοντες συμβάλλουν στη νεοαγγειογένεση εντός των αθηροσκληρωτικών βλαβών, η οποία είναι η πηγή της αιμορραγίας μέσα στην πλάκα, ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό των ευάλωτων πλακών.

Πηγή: Chronic Coronary Artery Disease, Magnus Bäck and Goran K. Hansson, page 53

2. Διάβρωση της Πλάκας

Οι αθηροσκληρωτικές βλάβες γενικά παραμένουν καλυμμένες από ένα ακέραιο ενδοθήλιο μέχρι τα τελικά στάδια της νόσου. Ωστόσο, στην ευάλωτη πλάκα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορεί να αποκολληθούν και, ως αποτέλεσμα, η έκθεση της υποενδοθηλιακής θεμέλιας ουσίας θα οδηγήσει σε ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων και σχηματισμό θρόμβου. Αυτή η

διαδικασία, που απεικονίζεται στο, αναφέρεται ως διάβρωση της πλάκας. Παθολογικές μελέτες προτείνουν ότι η αναλογία των εμφραγμάτων του μυοκαρδίου που προκαλούνται από ρήξη πλάκας σε σύγκριση με διάβρωση αλλάζει, με περισσότερες περιπτώσεις να οφείλονται στη διάβρωση της πλάκας και λιγότερες στη ρήξη της πλάκας. [56,59]

3. Αιμορραγία Εντός της Πλάκας

Η υποξία και οι αυξητικοί παράγοντες συμβάλλουν στη νεοαγγειογένεση εντός των αθηροσκληρωτικών βλαβών. Αυτή η νεοαγγείωση, ωστόσο, θεωρείται ανώριμη και εξαιρετικά ευάλωτη σε διαρροή. Η προκύπτουσα αιμορραγία εντός της πλάκας είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των ευάλωτων πλακών και ένας πιθανός προγνωστικός παράγοντας ρήξης της πλάκας. Η μαγνητική τομογραφία (MRI) επιτρέπει την ανίχνευση εναπόθεσης σιδήρου στις αθηροσκληρωτικές πλάκες και έτσι μπορεί να ανιχνεύσει αιμορραγίες εντός της πλάκας. Αν και τέτοιες απεικονίσεις με MRI έχουν αναφερθεί ότι διακρίνουν συμπτωματικές από ασυμπτωματικές αθηροσκληρωτικές βλάβες της καρωτίδας, οι δυνατότητες απεικόνισης αιμορραγίας εντός της πλάκας στην στεφανιαία αθηροσκλήρωση είναι σήμερα περιορισμένες. [57,60]

1.2.3 Σχηματισμός και εξέλιξη των αθηρωματικών βλαβών

Η αθηροσκλήρωση είναι αποτέλεσμα της υπερλιπιδαιμίας και της οξειδωσης των λιπιδίων και αποτελούσε ανέκαθεν κύρια αιτία θνησιμότητας στις αναπτυγμένες χώρες. Είναι μια νόσος που παρατηρείται στον έσω χιτώνα των αρτηριών και μπορεί να εμφανιστεί σε οποιοδήποτε τμήμα του αγγειακού συστήματος, από την αορτή έως τις στεφανιαίες αρτηρίες, με το σχηματισμό των χαρακτηριστικών πλακών στον έσω χιτώνα.[61,62]Ο όρος αθηροσκλήρωση είναι ελληνικής προέλευσης, και αποτελείται από δύο μέρη, από την λέξη αθηρίωση (συσσώρευση λίπους που συνοδεύεται από πολλά μακροφάγα) και τη λέξη σκλήρυνση (στιβάδα ίνωσης που περιλαμβάνει λεία μυϊκά κύτταρα [SMC], λευκοκύτταρα, και συνδετικό ιστό).[63,64]

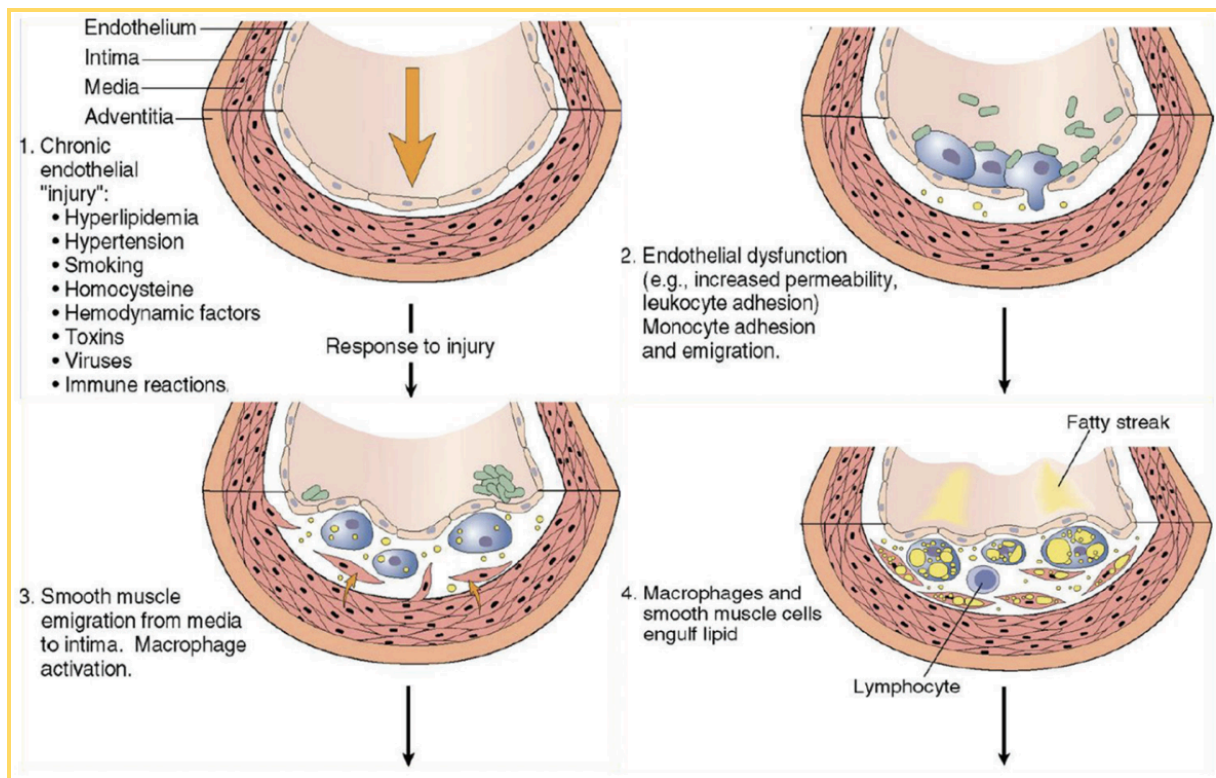
Ο σχηματισμός των αθηρωματικών πλακών στα εσωτερικά τοιχώματα των αρτηριών γίνεται σταδιακά. Αρχικά μικροί κρύσταλλοι χοληστερόλης εναποτίθενται στον έσω χιτώνα και στα λεία μυϊκά κύτταρα. Στη συνέχεια πολλαπλασιάζεται ο ινώδης ιστός αλλά και ο λείος μυϊκός ιστός που τον περιβάλλει με συνέπεια την ανάπτυξη των αθηρωματικών πλακών, οι οποίες προκαλούν διόγκωση στο εσωτερικό των αρτηριών και έτσι εμποδίζεται η ελεύθερη ροή του αίματος. Η σύνθεση συνδετικού ιστού από τους ινοβλάστες και η εναπόθεση ασβεστίου στο σημείο της βλάβης προκαλούν σκλήρυνση των αρτηριών ώπου τελικά η ανώμαλη επιφάνεια των αρτηριών να καταλήξει σε σχηματισμό θρόμβων. Η θρόμβωση αυτή θα οδηγήσει στην ξαφνική απόφραξη της αρτηρίας και την διακοπή της ροής του αίματος. [65]

Η διαδικασία της αθηροσκλήρωσης ξεκινά με τον **σχηματισμό των λιπωδών ραβδώσεων**, ακολουθεί η **δημιουργία του αθηρώματος**, το οποίο τελικά εξελίσσεται σε **αθηρωματική πλάκα**.

1.2.3.1 Σχηματισμός λιπωδών ραβδώσεων

Οι λιπώδεις ραβδώσεις είναι το πρώτο σημάδι της αθηροσκλήρωσης και οι αρχικές βλάβες προκαλούνται συνήθως από την σημειακή αύξηση των λιποπρωτεϊνών στην εσωτερική στιβάδα των αρτηριών.[65] Τα σωματίδια λιποπρωτεΐνης αποτελούνται από πρωτεΐνες, φωσφολιπίδια, και λιπίδια όπως η χοληστερόλη και τριγλυκερίδια. Από τις λιποπρωτεΐνες, πιο αθηρογόνες είναι οι λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL). Οι λιποπρωτεΐνες αυτές είναι πλούσιες σε χοληστερόλη και λόγω της ικανότητάς τους να διεισδύσει στο ενδοθήλιο μπορούν να συσσωρευτεί στον έσω χιτώνα των αγγείων. Στις θέσεις που παρατηρούνται βλάβες, η ισορροπία μεταξύ των διαφόρων συστατικών μπορεί να διαταραχθεί (π.χ. οι πρωτεογλυκάνες) και αυτό να έχει σαν αποτέλεσμα την προσκόλληση των λιποπρωτεϊνών και η επιβράδυνση της διαδικασίας εξόδου τους από τον έσω χιτώνα θα οδηγήσει εν τέλει στην επιταχυνόμενη συσσώρευση τους.[66] Τα αγγεία στα οποία εντοπίζεται αθηροσκλήρωση οξειδωμένα λιπίδια, όπως την οξειδωμένη LDL (Ox-LDL) και με αυτό τον τρόπο να σχηματίζονται αφρώδη κυτταρά.[68] Η Ox-LDL παίζει ρόλο στην ενεργοποίηση των T κυττάρων και λειτουργεί ως αντιγόνο για τα T κύτταρα, οπότε προκαλεί την έκκριση των κυτοκινών για την ενεργοποίηση των μακροφάγων και την τροποποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και των SMC.[67] Στα πρώτα στάδια της αθηρωματικής νόσου, μονοπύρρηνα λευκοκύτταρα, μονοκύτταρα και T κύτταρα διαπερνούν τα τοιχώματα των αγγείων και εισέρχονται στο άθικτο ενδοθήλιο. Για να λάβει χώρα η διαδικασία αυτή χρειάζεται την έκφραση των λευκοκυττάρων και μόρια χημειοκίνης στα οποία η μεταγραφή πραγματοποιείται από τον παράγοντα NF- α B. Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα εφόσον εισέλθουν στον έσω χιτώνα. Τα φαγοκύτταρα συμμετέχουν στην πρόληψη της αθηροσκλήρωσης με τη διαδικασία της φαγοκυττάρωση λιπιδίων από τον εξωκυτταρικό χώρο. Κάποια από τα λιπίδια των μακροφάγων μπορεί να εγκαταλείψουν το αρτηριακό τοίχωμα και εξέλθουν από την αρτηρία. Αν το λιπίδιο που εισέρχεται στο τοίχωμα της αρτηρίας (με φαγοκύτταρα ή άλλους τρόπους) είναι περισσότερα από εκείνα που εξέρχονται, αυτό θα οδηγήσει σε συσσώρευση λιπιδίων και κατά συνέπεια η πιθανότητα σχηματισμού αθηρώματος είναι αυξημένη. Η πρόσληψη και συσσώρευση της Ox-LDL από τα μακροφάγα θα οδηγήσει στο σχηματισμό αφρώδων κυττάρων[69] τα οποία, μετά από μια σειρά διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα θα οδηγήσουν στο σχηματισμό κίτρινων λιπαρών ραβδώσεων στα κυτταρικά τοιχώματα.[70] Η απόπτωση των αφρώδων κυττάρων που συτρίβουν να αυξάνουν σε διάμετρο και όσο η αθηρωματική

πλάκα εξελίσσεται το εσωτερικό του αγγείου στενεύει και η ροή του αίματος παρεμποδίζεται.



Εικόνα 5: 1.Χρόνιος τραυματισμός του ενδοθηλίου, 2. Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και η μετανάστευση των μονοκυττάρων 3.Μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων από το μέσω στον έσω χιτώνα και ενεργοποίηση των μακροφάγων. 4.Απορρόφηση λιπιδίων από τα λεία μυϊκά κύτταρα και τα μακροφάγα.

Πηγή: International Journal of Preventive Medicine, Vol 5, No 8, August, 2014, page 929

Η αθηροσκλήρωση είναι αποτέλεσμα βλάβης του εσωτερικού χιτώνα η οποία πυροδοτεί μια κυτταρική απόκριση στην οποία φαίνεται να συμμετέχουν μονοκύτταρα, SMC και λεμφοκύτταρα. Η αρχική μαλακή βλάβη αποτελείται κυρίως από αφρώδη κύτταρα και εναποθέσεις εξωκυτταρικού λίπους και ένα μικρό αριθμό αιμοπεταλίων. Κατά την εξέλιξη της διαδικασίας τα SMC πολλαπλασιάζονται και στα τελικά στάδια, προκαλούν την αιμορραγία μέσα στην αθηρωματική πλάκα[65,71-75] (Εικόνα 5).

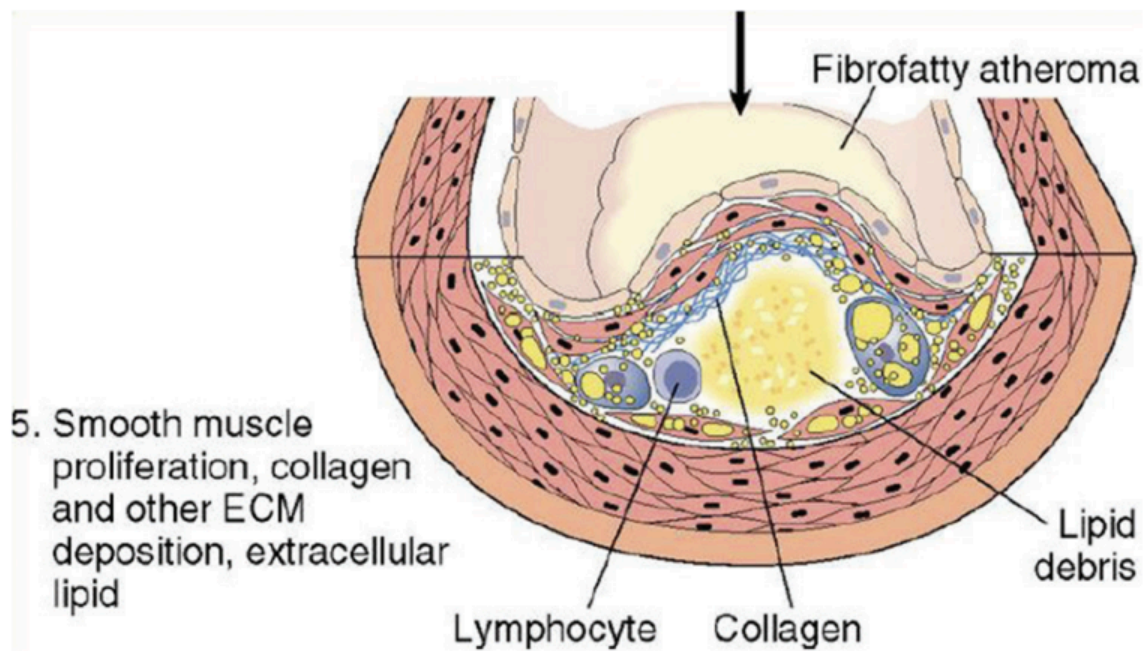
Το πρώτο βήμα στην αθηρογένεση είναι η παγίδευση του λιποπρωτεΐνη στο σημείο της βλάβης. Παρά το ότι η LDL-C δεν μπορεί να περάσει μέσα από τις σταθερές δομές του

ενδοθηλίου, μπορεί όμως να εισέλθει στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω ενδοκυττάρωση. Σε κανονικές συνθήκες, υπάρχει ισορροπία μεταξύ της LDL πλάσματος και της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης της LDL που βρίσκεται στα αρτηριακά τοιχώματα. Όταν η αύξηση των λιπιδίων του πλάσματος είναι μεγάλη, τότε εξαιτίας των αυξημένων εξωκυτταρικών πρωτεογλυκανών (οι οποίες έχουν α υψηλή συγγένεια LDL), τότε πολλά από αυτά τα σωματίδια παγιδεύονται στον εσωτερικό χιτώνα.[65] Λόγω της άμεσης συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης της LDL στον ορό και της ποσότητας της παγίδευσης λιποπρωτεϊνών στη βλάβη, το επίπεδο στο αίμα της μπορεί να θεωρηθεί ως δείκτης αθηρογένεσης. Η παγίδευση λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη συγκέντρωση της LDL στον έσω χιτώνα καθώς και αυξημένη διάρκεια παραμονής τους στη βλάβη. Και οι δύο αυτοί παράγοντες οδηγούν σε αυθόρμητη οξείδωση και κυτταρική οξείδωση των παγιδευμένων σωματιδίων.[65]

Οι κυτοκίνες και τα οξειδωμένα λιπίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και σε αυτό το πρώιμο στάδιο της αθηροσκλήρωσης, τα μονοκύτταρα και τα Τ λεμφοκύτταρα διεισδύουν στον εσωτερικό χιτώνα των αγγείων.[67] Η προσκόλληση και απορρόφηση των μορίων αυτών είναι μεγάλης σημασίας κατά την οξείδωση της LDL.[76] Η διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα τους δίνει την ιδιότητα να εγκλωβίζουν στο σημείο της βλάβης του έσω χιτώνα θα δημιουργεί στο κέντρο της περισσότερο ανεπτυγμένης αθηρωματικής πλάκας έναν πλούσιο σε λιπίδια νεκρωτικό πυρήνα. Τα μονοκύτταρα, εκτός από την παραγωγή αφρωδών κυττάρων, μπορεί να παράξουν και κάποιες κυτταροτοξικές ουσίες, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκου (TNF), αυξητικός παράγοντας, προπηκτικές ουσίες και ελεύθερες ρίζες, η οποίες θα προκαλούν μεγαλύτερη βλάβη στο ενδοθήλιο καθώς και μεγαλύτερη οξείδωση της LDL, που οδηγεί σε περισσότερες μεταβολικές αλλαγές.[70]

1.2.3.2 Σχηματισμός αθηρώματος

Σοβαρή βλάβη στον αγγειακό ιστό μπορεί να συμβεί όταν από γειτονικά SMC και ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνονται μικρά πεπτίδια (όπως κυτοκίνες) και αυξητικοί παράγοντες (όπως ως ιντερλευκίνη 1 (IL-1) και TNF). Αυτοί οι παράγοντες αναγκάζουν τα SMC να μεταναστεύσουν στον αυλό του αγγείου. Η μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων και συντιθέμενη εξωκυτταρική ουσία σχηματίζουν ένα ινώδες κάλυμμα, αποτελούμενο από ιστούς πλούσιους σε κολλαγόνο, SMC, μακροφάγα και Τ λεμφοκύτταρα.



Εικόνα 6: Ο σχηματισμός του αθηρώματος

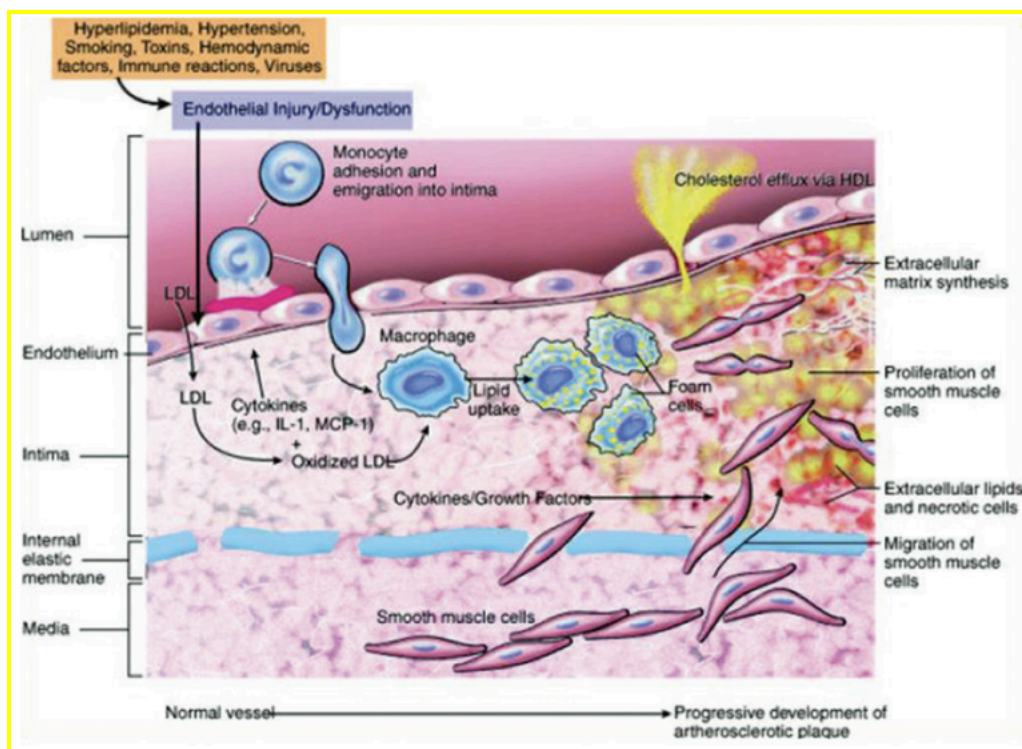
Πηγή: International Journal of Preventive Medicine, Vol 5, No 8, August, 2014, page 930

Το σύνολο αυτών σχηματίζει την ώριμη αθηρωματική πλάκα και προκαλεί διόγκωση στον αυλό των αγγείων με συνέπεια να παρεμποδίζεται η κυκλοφορία του αίματος μέσα σε αυτά.[69] Στα περιθώρια της ανεπτυγμένης πλάκας υπάρχουν μακροφάγα και T λεμφοκύτταρα. Η μετα-πρωτεΐνωση, που εκκρίνεται από τα μακροφάγα συμβάλλει στη λύση της εξωκυτταρικής ουσίας και η TNF-α που εκκρίνεται από τα T λεμφοκύτταρα εμποδίζει τη σύνθεση κολλαγόνου στα SMC και με τον τρόπο αυτό η σχηματισμένη πλάκα αποδυναμώνεται και εν τέλει διαρρηγνύεται, το κολλαγόνο και τα λιπίδια εισέρχονται στη ροή του αίματος και σε απάντηση αυτού συσσωρεύονται και προσκολλώνται αιμοπεταλία τα οποία τελικά θα σχηματίσουν θρομβους που δύναται να μπλοκάρουν ξαφνικά την κυκλοφορία του αίματος[69,70,77,78] (Εικόνα 6).

1.2.3.3 Σχηματισμός αθηρωματικής πλάκας

Τα συστατικά από τα οποία αποτελείται η αθηρωματική πλάκα είναι το αγγειακό επιθήλιο, ο αρτηριακός λείος μυς και λεμφοκύτταρα.

- **Αγγειακό επιθήλιο:** Το αγγειακό επιθήλιο αντιδρά με μακρομόρια και συστατικά του αίματος να αυξήσει τη μεταφορά πρωτεϊνών στο πλάσμα
- **Αρτηριακός λείος μυς:** Η διατήρηση της αγγειακής αποκατάστασης και του μεταβολισμού του αίματος προϊόντα συμπεριλαμβανομένων των λιπιδίων και την έκκριση των διάφορες κυτοκίνες, είναι απαραίτητη για τον έλεγχο της τόνος αγγειακού τοιχώματος
- **Λεμφοκύτταρα:** Μπορεί να συμμετέχουν στην ανοσοποιητικές αντιδράσεις. Ο πυρήνας της πλάκας είναι που αποτελείται από κυτταρικές βλάβες, αφρώδη κύτταρα, ασβέστιο, εστέρες χοληστερόλης και μια μάζα λιπαρών ουσιών. Ο λιπιδικός πυρήνας είναι μια ωχροκίτρινη μάζα, η οποία Το χρώμα του προκαλείται από καροτενοειδή χρωστικές[62] (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Ο σχηματισμός της αθηρωματικής πλάκας

Πηγή: International Journal of Preventive Medicine, Vol 5, No 8, August, 2014, page 930

1.3 Κλινικά συμπτώματα και κλασικοί βιοδείκτες διάγνωσης και παρακολούθησης των καρδιαγγειακών νοσημάτων

Μιλώντας για καρδιαγγειακά νοσήματα, αναφερόμαστε ως επί το πλείστον στην αθηρωματική νόσο, η οποία ακολουθεί μια προοδευτική πορεία σε σχέση με την ηλικία. Οι αρχικές εναποθέσεις των λιπιδίων μπορούν να ξεκινήσουν ακόμα και από τη βρεφική ηλικία και η ασθένεια εξελίσσεται διαφορετικά σε κάθε άτομο. Η εξέλιξη της στην πορεία της ζωής είναι αποτέλεσμα δράσης πολλών παραγόντων (ήδη αναφερθηκαν κάποιοι στην ενότητα 1.2.1.) και δεν μπορεί να προβλεφθεί. Χαρακτηριστικά συμπτώματα εκδηλώνεται μόνο σε προχωρημένα στάδια της νόσου και οι βλάβες είναι μη αναστρέψιμες. Στο τελικό στάδιο, η νόσος εκδηλώνεται με ισχαιμικά καρδιακά και εγκεφαλικά επεισόδια και με βλάβες στο κυκλοφορικό σύστημα, και οι αυτές οι νόσοι είναι η κύρια αιτία θανάτων στις ανεπτυγμένες χώρες [2]. Η πρόγνωση της, βασίζεται στην συνεκτίμηση προδιαθεσικών παραγόντων και η παρακολούθηση τους με διάφορες μετρήσεις σε όσους από αυτούς είναι εφικτό. Συνήθως με ανάλυση δείγματος αίματος εξετάζεται αν υπάρχει υπερλιπιδαιμία (κυρίως LDL χοληστερόλη μεγαλύτερη από 130 mg/dl, τριγλυκερίδια πάνω από 150 mg/dl) και η HDL χοληστερόλη (τιμή αναφοράς τα 35 mg/dl) και ο σακχαρώδης διαβήτης. Μετράται επίσης η αρτηριακή πίεση και το σωματικό βάρος και σε συνδυασμό με άλλους προδιαθεσικούς παράγοντες (π.χ. καπνισμα, το επίπεδο άσκησης, η κληρονομικότητα, ο τρόπος ζωής κ.α.) διεξάγονται τα συμπεράσματα αν ένα άτομο πιθανολογείται να κινδυνεύει να νοσήσει. Το τεστ κοπώσεως σε συνεκτίμηση με ένα γενικό απεικονιστικό και βιοχημικό έλεγχο μπορούν να δίνουν πολύτιμες πληροφορίες για την όσο το δυνατόν πιο έγκαιρη διάγνωση βλάβης. [2]

Στην περίπτωση του εμφράγματος του μυοκαρδίου τα συμπτώματα ξεκινούν ξαφνικά και ο ασθενής βιώνει οξύ πόνο στο στήθος με παρατεταμένη διάρκεια (περισσότερο από 30 λεπτά) ο οποίος μπορεί να συνοδεύεται και από εμετό, εφίδρωση και μια γενικότερη αίσθηση κόπωσης και εξάντλησης. Ο πόνος εντοπίζεται επίσης συχνά πίσω από το στήθος, στο στομάχι και μπορεί να επεκτείνεται στους ώμους και στην εσωτερική πλευρά του αριστερού χεριού. Αίσθηση σφιξίματος στο στήθος και πόνου στο σημείο του λαιμού, και μουνδιάσματα στο σαγόνι είναι επίσης κάποια πιθανά συμπτώματα. Από τη στιγμή που θα εκδηλωθούν τα συμπτώματα υπάρχει ένα χρονικό διάστημα μέσα στο οποίο αυξάνονται οι ποσότητες των βιοδεικτών και περνούν από το μυοκάρδιο στο αίμα. Ο κάθε ένας από τους βιοδείκτες ακολουθεί διαφορετικό χρονικό μοτίβο, σε γενικό κανόνα όμως είναι περίπου 4-6 ώρες μετά την εκδήλωση του πόνου στο στήθος.

Για να θεωρηθεί ένας βιοδείκτης ιδανικός για το έμφραγμα του μυοκαρδίου θα πρέπει να πληρεί μια σειρά από προϋποθέσεις. Έτσι, ως ιδανικός βιοδείκτης θεωρείται αυτός που βρίσκεται σε αφθονία στα μυοκύτταρα. Οι βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται για την περίπτωση του εμφράγματος του μυοκαρδίου είναι η κρεατινική κινάση (ισοενζύμα και ισομορφές), οι καρδιακές τροπονίνες, η μυοσφαιρίνη, η γαλακτική αφυδρογονάση

(ισοένζυμα), η ασπαρτική αμινοτρανσφεράση (AST/GOT), το νατριουρητικό πεπτίδιο του εγκεφάλου (BNP/NPPB), η c-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) και η λιποπρωτεΐνη α. Για να προκύψει μια κλινική ερμηνεία από τα αποτελέσματα των παραπάνω βιοδεικτών, είναι απαραίτητο η δειγματοληψία και η ανάλυση των δειγμάτων να πραγματοποιηθούν σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές προκειμένου να γίνει μια σωστή εκτίμηση των βιοχημικών μεταβολών και τελικά να προκύψει η διάγνωση του εμφράγματος του μυοκαρδίου. αρκετές μελέτες προτείνουν τη λήψη δειγμάτων διαδοχικά, στις 2-4 ώρες, στις 6-8 ώρες και στις 12-18 ώρες όταν υπάρχει υποψία ότι έχει προηγηθεί ένα έμφραγμα του μυοκαρδίου. [2]

Κεφάλαιο 2: Στόχος της ΜΔΕ

Οι καρδιαγγειακές παθήσεις (CVD) είναι παγκοσμίως η κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας. Επιδημιολογικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η νοσηρότητα και θνησιμότητα εξαιτίας της αθηρωματικής νόσου αυξάνεται με ανησυχητικούς ρυθμούς και αναμένεται να φτάσει τους 23.6 εκατομμύρια θανάτους το 2030 [79]. Η πρωτογενής και η δευτερογενής πρόληψη της καρδιαγγειακής νόσου αποτελούν προτεραιότητες της δημόσιας υγείας [80]. Η καρδιαγγειακή νόσος είναι μια νόσος της ζωής που ξεκινά με την εξέλιξη των παραγόντων κινδύνου που με τη σειρά τους συμβάλλουν στην ανάπτυξη υποκλινικής αθηροσκλήρωσης [81]. Αν μείνει χωρίς θεραπεία, η υποκλινική νόσος κορυφώνεται σε εμφανή καρδιαγγειακή νόσο [82]. Η ίδια η εμφάνιση της καρδιαγγειακής νόσου προμηνύει δυσμενή πρόγνωση με μεγαλύτερο κίνδυνο επαναλαμβανόμενων συμβάντων, νοσηρότητας και θνησιμότητας [83]. Είναι επίσης όλο και πιο εμφανές ότι αν και η κλινική αξιολόγηση είναι ο θεμέλιος λίθος της διαχείρισης των ασθενών, αυτή η αξιολόγηση έχει τους περιορισμούς της. Οι κλινικοί γιατροί έχουν χρησιμοποιήσει πρόσθετα εργαλεία για να βοηθήσουν την κλινική αξιολόγηση και να ενισχύσουν την ικανότητά τους να εντοπίζουν τον «ευάλωτο» ασθενή σε κίνδυνο για καρδιαγγειακή νόσο. Οι βιοδείκτες είναι ένα τέτοιο εργαλείο για τον καλύτερο εντοπισμό ατόμων υψηλού κινδύνου, για τη διάγνωση παθήσεων έγκαιρα και με ακρίβεια και για την αποτελεσματική πρόγνωση και θεραπεία ασθενών με νόσο [84]. Χωρίς να αμφισβητείται η χρησιμότητα και η αξία των κλασικών βιοχημικών βιοδεικτών που χρησιμοποιούνται με επιτυχία για πάνω από 60 χρόνια στην κλινική πράξη για την έγκαιρη διάγνωση της αθηρωματικής νόσου, η αναγκαιότητα εύρεσης νέων, πρωτότυπων βιοδεικτών για την πρόγνωση της νόσου και παρακολούθηση της θεραπείας των ασθενών εξακολουθεί να υπάρχει στα πλαίσια της ανάγκης για όσο το δυνατόν πιο έγκυρη, έγκαιρη και ακριβή διάγνωση και αποτελεσματική θεραπεία. Τα lncRNA, από την αρχή της ανακάλυψής τους έχουν ενοχοποιηθεί για ένα τέτοιο ρόλο. Τα lncRNA μπορούν να συνδεθούν με πρωτεΐνες, DNA και RNA που ρυθμίζουν 1) την έναρξη της νόσου και την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας καθώς και 2) τη σταθερότητα της αθηρωματικής πλάκας σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα (ECs), τα κύτταρα λείων μυών των αγγείων (VSMCs) και τα μακροφάγα. Ένας αριθμός lncRNAs έχει εμπλακεί στην ομοίωση της χοληστερόλης και στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων όπως το LASER, το LeXis και το CHROME. Μεταξύ άλλων, το MANTIS, το lncRNA-CCL2 και το MALAT1 αποδείχθηκε ότι εμπλέκονται στην αγγειακή φλεγμονή. Είναι ενδιαφέρον ότι ορισμένα lncRNAs συσχετίζονται στενά με την απόκριση στη θεραπεία με στατίνες, όπως το NEXN-AS1 ή το LASER. Στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της σύγχρονης βιβλιογραφίας και η αξιολόγηση της χρήσης των lncRNA ως βιοδείκτες της αθηρωματικής νόσου. Με την αυξανόμενη γνώση των πολύπλοκων και ποικίλων ρυθμίσεων

των lncRNAs στο ετερογενές περιβάλλον των αθηρωματικών πλακών, θεωρείται ότι τα lncRNA αποτελούν πολλά υποσχόμενα μόρια προς αυτή την κατεύθυνση.

Κεφάλαιο 3: Βιοδείκτες

3.1 Ορισμοί

Ο όρος «βιοδείκτης» φαίνεται να χρησιμοποιείται για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1970, όπως προκύπτει από τον τίτλο ενός άρθρου το 1973 και η πρώτη κλινική χρήση χρονολογείται το 1977, σε μια δημοσίευση με τίτλο «Tumor biomarkers of value in the management of gynecologic malignancy will also be correlated with clinical course». Αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχουν και ακόμα παλαιότερες αναφορές με τους όρους «βιοχημικοί δείκτες» το 1949 (Mundkur) και στους «βιολογικοί δείκτες» το 1957 (Porter). Αν και χρησιμοποιούνται εδώ και δεκαετίες, στην πραγματικότητα, ο όρος «βιοδείκτης» και τα συνώνυμά του χρησιμοποιούνται ευρύτατα στις μέρες μας. [85]

Η χρήση του όρου «βιοδείκτης» αφορά μια ευρεία υποκατηγορία ιατρικών σημείων, αναφέρεται δηλαδή σε αντικειμενικές ενδείξεις μιας ιατρικής κατάστασης που παρατηρούνται έξω από τον ασθενή και που μπορούν να μετρηθούν με ακρίβεια και αναπαραγωγιμότητα. Τα ιατρικά σημάδια έρχονται σε αντίθεση με τα ιατρικά συμπτώματα, τα οποία περιορίζονται σε εκείνες τις ενδείξεις υγείας ή ασθένειας που αντιλαμβάνονται οι ίδιοι οι ασθενείς. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετοί πιο ακριβείς ορισμοί των βιοδεικτών που επικαλύπτονται σημαντικά. Στην έκθεσή του για την εγκυρότητα των βιοδεικτών στην εκτίμηση περιβαλλοντικού κινδύνου, ο ΠΟΥ έχει δηλώσει ότι ο αληθινός ορισμός των βιοδεικτών περιλαμβάνει «σχεδόν κάθε μέτρηση που αντικατοπτρίζει μια αλληλεπίδραση μεταξύ ενός βιολογικού συστήματος και ενός πιθανού κινδύνου, ο οποίος μπορεί να είναι χημικός, φυσικός ή βιολογικός. Η μετρούμενη απόκριση μπορεί να είναι λειτουργική και φυσιολογική, βιοχημική σε κυτταρικό επίπεδο ή μοριακή αλληλεπίδραση». Παραδείγματα βιοδεικτών περιλαμβάνουν τα πάντα, από παλμό και αρτηριακή πίεση μέχρι πιο σύνθετες εργαστηριακές εξετάσεις αίματος και άλλων ιστών.

Τα ιατρικά σημεία έχουν μακρά ιστορία χρήσης στην κλινική πράξη και είναι τόσο παλιά όσο και η ίδια η ιατρική πρακτική και οι βιοδείκτες είναι απλώς τα πιο αντικειμενικά, μετρήσιμα ιατρικά σημεία που η σύγχρονη εργαστηριακή επιστήμη μας επιτρέπει να μετράμε με δυνατότητα αναπαραγωγής. Η χρήση βιοδεικτών, και ειδικότερα βιοδεικτών που μετρώνται εργαστηριακά, στην κλινική έρευνα είναι κάπως νεότερη και οι καλύτερες προσεγγίσεις σε αυτήν την πρακτική εξακολουθούν να αναπτύσσονται και να βελτιώνονται. Το βασικό ζήτημα που εξετάζεται είναι ο προσδιορισμός της σχέσης μεταξύ οποιουδήποτε μετρήσιμου βιοδείκτη και των σχετικών κλινικών καταληκτικών σημείων. [86] Για το λόγο αυτό είναι χρήσιμο να δοθούν οι ορισμοί των εννοιών «**τελικό κλινικό σημείο**» και «**υποκατάστατο τελικού κλινικού σημείου**».

Τελικό κλινικό σημείο (clinical endpoint): μια κλινικά σημαντική μέτρηση που μας δείχνει πώς αισθάνεται, λειτουργεί ή επιβιώνει ένας ασθενής. [87]

Υποκατάστατο τελικού κλινικού σημείου (surrogate clinical endpoint): είναι ένας βιοδείκτης που προορίζεται να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο για ένα κλινικό τελικό σημείο και αναμένεται να προβλέψει το αποτέλεσμα μιας θεραπευτικής παρέμβασης. [87]

Οι βιοδείκτες είναι εξ ορισμού αντικειμενικά, μετρήσιμα χαρακτηριστικά βιολογικών διεργασιών. Μπορεί να συσχετίζονται με την αίσθηση ευεξίας του ασθενούς χωρίς όμως αυτό να είναι απαραίτητο, και είναι εύκολο να φανταστούμε μετρήσιμα βιολογικά χαρακτηριστικά που δεν αντιστοιχούν στην κλινική κατάσταση των ασθενών. Είναι επίσης ακόμη πιο εύκολο να φανταστούμε μετρήσιμα βιολογικά χαρακτηριστικά των οποίων η διακύμανση μεταξύ των πληθυσμών είναι τόσο μεγάλη που τα καθιστά άχρηστα ως αξιόπιστους προγνωστικούς παράγοντες της ασθένειας ή της απουσίας της. Αντίθετα, τα κλινικά τελικά σημεία είναι μεταβλητές που αντικατοπτρίζουν ή χαρακτηρίζουν τον τρόπο με τον οποίο ένα υποκείμενο σε μια μελέτη ή κλινική δοκιμή «αισθάνεται, λειτουργεί ή επιβιώνει». Είναι, με άλλα λόγια, μεταβλητές που αντιπροσωπεύουν την υγεία και την ευημερία ενός υποκειμένου της μελέτης από τη σκοπιά του υποκειμένου. Όταν χρησιμοποιούνται ως αποτελέσματα σε κλινικές δοκιμές, οι βιοδείκτες θεωρούνται ως υποκατάστατα τελικά σημεία, δηλαδή ενεργούν ως υποκατάστατα ή υποκατάστατα κλινικά σημαντικών καταληκτικών σημείων. Όμως, δεν είναι όλοι οι βιοδείκτες υποκατάστατα τελικά σημεία, ούτε προορίζονται όλοι να είναι. Τα υποκατάστατα τελικά σημεία είναι ένα μικρό υποσύνολο καλά χαρακτηρισμένων βιοδεικτών με καλά αξιολογημένη κλινική συνάφεια. Για να θεωρηθεί ως υποκατάστατο τελικό σημείο, πρέπει να υπάρχουν επιστημονικά στοιχεία (π.χ. επιδημιολογικά, θεραπευτικά ή/και παθοφυσιολογικά) ότι ένας βιοδείκτης προβλέπει με συνέπεια και ακρίβεια ένα κλινικό αποτέλεσμα.

Ακόμη και οι βιοδείκτες που είναι στατιστικά επικυρωμένοι ως υποκατάστατοι για ένα δεδομένο κλινικό τελικό σημείο μπορεί στην πραγματικότητα να μην αποτελούν μέρος της παθοφυσιολογικής οδού που οδηγεί σε αυτό το τελικό σημείο. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να υπάρχουν ενδείξεις ότι οι βιοδείκτες μετρούν μια διαδικασία ή ένα προϊόν ενός σταδίου βασικής οδού, αλλά αν υποθέσουμε ότι αυτή η σχέση σε όλες τις περιπτώσεις κινδυνεύει να μπερδευτεί η συσχέτιση ως προς την αιτιότητα. Υπάρχουν πολλές πιθανές εξηγήσεις για βιοδείκτες που συσχετίζονται με κλινικά τελικά σημεία υπό περιορισμένες μόνο περιπτώσεις. Για παράδειγμα, μπορεί να εμπλέκονται πολλαπλά αλληλένδετα μονοπάτια ασθένειας ή οι βιοδείκτες μπορεί να είναι έμμεσα σημάδια μιας οδού που δεν είναι θεμελιώδεις για τις βασικές διαδικασίες της νόσου[86]

3.2 Κατηγορίες βιοδεικτών

Σύμφωνα με το γλωσσάριο Biomarkers, EndpointS, and other Tools (BEST) που εκδόθηκε από τον Αμερικάνικο Οργανισμό Φαρμάκων και το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας των ΗΠΑ, οι βιοδείκτες ανάλογα με το στάδιο της εφαρμογής τους και το αποτέλεσμα που μας δίνουν μπορούν να διαχωριστούν στις παρακάτω κατηγορίες [88]:

1. Βιοδείκτες ευαισθησίας/κινδύνου

Είναι βιοδείκτες που υποδεικνύουν τη δυνατότητα ανάπτυξης ασθένειας ή ιατρικού περιστατικού σε ένα άτομο που δεν έχει επί του παρόντος εμφανίσει κλινικά την ασθένεια ή είναι ιατρικό περιστατικό. Ένας βιοδείκτης ευαισθησίας/κινδύνου σχετίζεται με αυξημένη, ή σε ορισμένες περιπτώσεις, μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης μιας ασθένειας σε ένα άτομο που, από κλινική άποψη, δεν έχει ακόμη εκδηλώσει αυτήν την ασθένεια. Οι βιοδείκτες ευαισθησίας/κινδύνου μπορεί να ανιχνευθούν πολλά χρόνια, σε ορισμένες περιπτώσεις ακόμα και δεκαετίες πριν από την εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων και δεν περιγράφουν τη σχέση με κάποια συγκεκριμένη θεραπεία. [89]

2. Διαγνωστικοί βιοδείκτες

Είναι βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση ή την επιβεβαίωση της παρουσίας μιας ασθένειας ή ιατρικού περιστατικού ή για την διάκριση ενός υπότυπου της νόσου. Στην ιατρική πράξη η διάγνωση των ασθενειών πρέπει να χαρακτηρίζεται από μεγάλη ακρίβεια και οι διαγνωστικοί βιοδείκτες παίζουν καθοριστικό ρόλο σε αυτό. Με τη χρήση τους διεξάγονται συμπεράσματα αν ο ασθενής πάσχει από κάποια νόσο η οποία απαιτείται θεραπεία ή αν χρήζει ιατρικής παρακολούθησης για κάποια νόσο. [89]

3. Βιοδείκτες παρακολούθησης ασθενούς

Είναι βιοδείκτες που μετρώνται επανειλημμένα προκειμένου να αξιολογηθεί η κατάσταση μιας ασθένειας και η πορεία της νόσου αλλά και για αξιολογηθεί ή επίδραση κάποιας φαρμακευτικής αγωγής. Έτσι, γίνονται επανειλημμένες μετρήσεις που σκοπό έχουν να διεξαχθούν συμπεράσματα για την πρόοδο της νόσου, την διαπίστωση τυχόν νέων επιπτώσεων ή επιδείνωσης της προηγούμενης κατάστασης και την απόκριση σε μια φαρμακευτική αγωγή. [89]

4. Προγνωστικοί βιοδείκτες

Είναι βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται για να προσδιοριστεί η πιθανότητα ενός κλινικού συμβάντος, υποτροπής ή εξέλιξης της νόσου σε ασθενείς που έχουν την ασθένεια ή την ιατρική πάθηση που τους ενδιαφέρει. Ένας προγνωστικός βιοδείκτης είναι αυτός που υποδεικνύει την εκβαση και την εξέλιξη της νόσου μελλοντικά και η συσχέτιση του προγνωστικού βιοδείκτη με το αποτέλεσμα δεν σχετίζεται με τυχόν διαφορετικές παρεμβάσεις. Ωστόσο, η ισχύς μιας προγνωστικής συσχέτισης μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με το συγκεκριμένο κλινικό πλαίσιο (π.χ. θεραπεία που έλαβε ο ασθενής, στάδιο της νόσου) και το συγκεκριμένο τελικό σημείο ενδιαφέροντος, επομένως είναι σημαντικό οι προγνωστικοί βιοδείκτες να περιγράφονται στο κατάλληλο πλαίσιο. [89]

5. Προβλεπτικοί βιοδείκτες

Είναι βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό των ατόμων που παρουσιάζουν αυξημένες πιθανότητες να εμφανίσουν ευνοϊκή ή δυσμενή απόκριση από την έκθεση σε κάποιο ιατρικό προϊόν ή περιβαλλοντικό παράγοντα σε σχέση με τα άτομα που δεν εκτέθηκαν στο προϊόν ή τον παράγοντα αυτό. Η ανταπόκριση μπορεί να είναι ωφέλιμη για το άτομο ή βελτιωμένη επιβίωση ή ακόμα και κάποια ανεπιθύμητη ενέργεια. Αυτού του είδους οι βιοδείκτες μπορούν να φανούν ιδιαίτερος χρήσιμοι στην λήψη αποφάσεων σε σχέση με την περίθαλψη των ασθενών, όπως για ποιόν ασθενή θα μπορούσε να είναι ωφέλιμη κάποια συγκεκριμένη θεραπεία ή στην σωστότερη επιλογή μεταξύ των διαφόρων ειδών παρεμβάσεων. Στην τελευταία περίπτωση, η απόδειξη ότι ένας βιοδείκτης προβλέπει τη συγκριτική αποτελεσματικότητα μιας παρέμβασης θα πρέπει να συνοδεύεται από εξειδίκευση των εναλλακτικών παρεμβάσεων που εμπλέκονται στη σύγκριση.[89]

6. Φαρμακοδυναμικοί βιοδείκτες/ιοδείκτες απόκρισης

Είναι βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται για να δείξουν ότι μια βιολογική απόκριση η οποία μπορεί να είναι είτε ωφέλιμη ή επιβλαβής, έχει συμβεί σε ένα άτομο εφόσον έχει εκτεθεί σε ένα ιατρικό προϊόν ή έναν περιβαλλοντικό παράγοντα. Αυτή η κατηγορία βιοδεικτών περιλαμβάνει τους φαρμακοδυναμικούς βιοδείκτες και τους βιοδείκτες υποκατάστατου τελικού σημείου.

Οι φαρμακοδυναμικοί βιοδείκτες είναι εκείνοι οι βιοδείκτες απόκρισης που υποδεικνύουν τη βιολογική δραστηριότητα ενός ιατρικού προϊόντος ή ενός περιβαλλοντικού παράγοντα χωρίς απαραίτητα να συνάγει συμπεράσματα σχετικά με την αποτελεσματικότητα ή την έκβαση της νόσου ή να συνδέει κατ' ανάγκη αυτή τη δραστηριότητα με έναν καθιερωμένο μηχανισμό δράσης. Στην πράξη χρησιμοποιούνται για να αποδείξουν ότι μια ιδέα είναι ορθή, καθώς επίσης στην επιλογή της δόσης μιας φαρμακευτικής αγωγής αλλά και για να μετρηθεί η απόκριση σε ιατρικά προϊόντα και η επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των ανεπιθύμητων ενεργειών που μπορεί να έχει η έκθεση στα παραπάνω.

Οι βιοδείκτες υποκατάστατου τελικού σημείου ονομάζονται οι βιοδείκτες απόκρισης οι οποίοι είναι ένα τελικό σημείο και χρησιμοποιείται σε κλινικές δοκιμές ως υποκατάστατο για μια άμεση μέτρηση του πώς αισθάνεται, λειτουργεί ή επιβιώνει ένας ασθενής. Ένα υποκατάστατο τελικό σημείο δεν μετρά το κλινικό όφελος του πρωταρχικού ενδιαφέροντος από μόνο του, αλλά μάλλον αναμένεται να προβλέψει αυτό το κλινικό όφελος ή βλάβη με βάση επιδημιολογικά, θεραπευτικά, παθοφυσιολογικά ή άλλα επιστημονικά στοιχεία. [89]

7. Βιοδείκτες ασφάλειας

Είναι βιοδείκτες των οποίων η μέτρηση γίνεται πριν ή μετά από την έκθεση σε κάποιο ιατρικό προϊόν ή περιβαλλοντικό παράγοντα και δείχνει την πιθανότητα, την παρουσία ή την έκταση της τοξικότητας ως ανεπιθύμητης επίδρασης. Οι ιατρικές παρεμβάσεις και η έκθεση σε κάποιους περιβαλλοντικούς παράγοντες ενδέχεται να έχουν ανεπιθύμητες, δυνητικά επιβλαβείς ή και εμφανώς τοξικές επιδράσεις. Χρησιμοποιώντας τους βιοδείκτες ασφάλειας επιτυγχάνεται η ανίχνευση ή η πρόβλεψη αυτών των ανεπιθύμητων ενεργειών φαρμάκου ή έκθεσης. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η τοξικότητα σηματοδοτείται από την ανίχνευση ή την αλλαγή ενός βιοδείκτη, επιτρέποντας τροποποίηση της δόσης ή διακοπή της θεραπείας πριν η τοξικότητα γίνει σοβαρή, ενώ σε άλλες περιπτώσεις, ο βιοδείκτης ασφάλειας μπορεί να υποδεικνύει την απαραίτητη θεραπεία.

Επιπλέον, οι βιοδείκτες ασφάλειας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εντοπισμό ασθενών για τους οποίους δεν θα πρέπει να ξεκινήσουν συγκεκριμένες θεραπείες λόγω σημαντικών κινδύνων για την ασφάλεια της υγείας τους. Σε επίπεδο πληθυσμού, οι μετρήσεις βιοδεικτών μπορούν να εντοπίσουν άτομα που επηρεάζονται από την έκθεση σε ορισμένους περιβαλλοντικούς παράγοντες, προτρέποντας πολιτικές ή παρεμβάσεις δημόσιας υγείας για τον έλεγχο ή τη μείωση του κινδύνου. [89]

3.3 Σημαντικότητα βιοδεικτών

Οι βιοδείκτες μπορούν να εξυπηρετήσουν πολλούς μοναδικούς σκοπούς, όπως την επιβεβαίωση των διαγνώσεων, την παρακολούθηση των αποτελεσμάτων που έχει μια θεραπεία για τον ασθενή και κατ' επέκταση την δυνατότητα για εξατομίκευση του θεραπευτικού σχήματος κατά περίπτωση, την διεξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την εξέλιξη της νόσου αλλά και την πρόβλεψη κλινικών αποτελεσμάτων. Ταυτόχρονα, έχουν το πλεονέκτημα ότι οι μετρήσεις γίνονται με απλούστερο τρόπο και δεν είναι ιδιαίτερα κοστοβόρες, ειδικά σε σχέση με τα τελικά κλινικά τελικά σημεία, και επίσης είναι εφικτή η επαναληψη των αναλύσεων και γενικότερα οι διαδικασίες δεν είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα καθώς και η λήψη των αποτελεσμάτων είναι ταχύτερη. Επίσης, κατά τη μελέτη μιας νόσου, η χρήση βιοδεικτών μειώνει τον αριθμό των ατόμων στα οποία θα χρειαστεί να γίνουν οι κλινικές δοκιμές προκειμένου να διεξαχθούν τα σχετικά συμπεράσματα, και συντομεύουν διαδικασίες που, υπο άλλες συνθήκες, θα μπορούσαν να κρατήσουν για χρόνια και φυσικά με τη χρήση τους αποφεύγονται και πολλά ηθικά προβλήματα που σχετίζονται με την εξασφάλιση των κλινικών τελικών σημείων. Επίσης, αποτελούν ένα πολύτιμο εργαλείο για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων αλλά και για την βελτίωση των υφιστάμενων.[84], [86].

3.4 Ποιοτικά χαρακτηριστικά Βιοδεικτών

Προκειμένου ένας βιοδείκτης να χαρακτηριστεί ως κατάλληλος, αξιολογείται με ιδιαίτερα αυστηρά κριτήρια, τα οποία μπορούν να προσαρμοστούν ανάλογα με τη χρήση που προορίζεται να έχει ο κάθε βιοδείκτης. Υπάρχουν βέβαια τα ιδανικά χαρακτηριστικά τα οποία πρέπει να έχει ένας βιοδείκτης και στην ιδανική περίπτωση είναι τα παρακάτω:

1. Κλινική συνάφεια

Είναι η ιδιότητα του βιοδείκτη να εκφράζει οποιαδήποτε φυσιολογική ή παθολογική μεταβολή μέσα από τις μετρήσεις του και αυτό μα μπορεί να συμβεί μέσα σε ένα σύντομο χρονικό διάστημα.

2. Ευαισθησία

Είναι η ικανότητα του βιοδείκτη να ανιχνεύει μια ασθένεια σε άτομα που πάσχουν πραγματικά (δηλαδή είναι αληθινά θετικοί)

3. Ειδικότητα

Είναι η ικανότητα του βιοδείκτη να μπορεί να αποκλείσει τη νόσο σε ασθενείς στους οποίους η νόσος πραγματικά απουσιάζει (δηλαδή είναι αληθινά αρνητικοί)

4. Αξιοπιστία

Για να χαρακτηριστεί ένας βιοδείκτης ως αξιόπιστος θα πρέπει στα αποτελέσματα να υπάρχει ακρίβεια και αναπαραγωγιμότητα. Επίσης θα πρέπει να χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία στις μετρήσεις που δίνει.

5. Πρακτικότητα

Προκειμένου να είναι πρακτικός ένας βιοδείκτης θα πρέπει να μη χρειάζονται πολλές επεμβάσεις, έως και καθόλου αν είναι δυνατόν, για να αποφεύγεται η ταλαιπωρία των ατόμων που υποβάλλονται στην εξέταση.

6. Απλότητα

Για να πούμε ότι ένας βιοδείκτης χαρακτηρίζεται από την ιδιότητα της απλότητας δεν θα πρέπει να απαιτείται η χρήση εξειδικευμένου εξοπλισμού ή χειριστή, η διαδικασία να μην είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα και το κόστος μέτρησης να μην είναι υψηλό. [87, 90]

3.5 Κλινική επικύρωση των βιοδεικτών

Η κλινική χρήση των βιοδεικτών στη βιοϊατρική έρευνα και τεχνολογία αναπτύσσεται ολοένα και περισσότερο και έχει μεγάλη αξία στη διάγνωση ατόμων με συμπτώματα μιας ασθένειας αλλά και ατόμων που δεν εμφανίζουν συμπτώματα, την παρακολούθηση της κλινικής κατάστασης των ασθενών, την πρόγνωση μιας νόσου αλλά και την αξιολόγηση κινδύνου ανάπτυξης μιας νόσου σε άτομα και πληθυσμούς και στην ανάπτυξη των φαρμάκων. Έτσι, καθώς οι βιοδείκτες αυξάνουν την παρουσία τους στην κλινική έρευνα και πράξη, η ανάγκη για την αξιολόγηση τους γίνεται ολοένα και πιο σημαντική.

Το ακριβές κριτήριο για την αξιολόγηση της απόδοσης ενός βιοδείκτη ποικίλλει ανάλογα με την προβλεπόμενη χρήση του κάθε βιοδείκτη. Αρκετά αξιόπιστες μελέτες θεωρούνται εκείνες που κάνουν μια ανεξάρτητη συγκαλυμμένη σύγκριση της απόδοσης ενός βιοδείκτη με ένα πρότυπο αναφοράς σε ένα κατάλληλο δείγμα ασθενών που αντιπροσωπεύει ένα επαρκές φάσμα της νόσου. Η απόδοση των βιοδεικτών σπανίως είναι το ίδιο καλή και σε ένα

δεύτερο δείγμα όπως στο αρχικό δείγμα. Συνεπώς, είναι επιθυμητό οι βιοδείκτες να αξιολογούνται αρχικά σε ένα σύνολο προέλευσης ή εκπαίδευσης και στη συνέχεια να διερευνώνται σε ένα σύνολο επικύρωσης ή δοκιμής. Έχουν προταθεί πρότυπα για το σχεδιασμό και την αναφορά των αποτελεσμάτων μελετών που αξιολογούν την απόδοση των βιοδεικτών για διάγνωση και για πρόγνωση. [91, 92, 93, 94]

Η ακρίβεια μιας δοκιμής βιοδεικτών αξιολογείται ως προς την ευαισθησία της (ανίχνευση ασθένειας όταν υπάρχει πραγματικά ασθένεια, π.χ. εντοπισμός αληθινών θετικών) και την ειδικότητά της (αναγνώριση απουσίας ασθένειας όταν η ασθένεια είναι πραγματικά απύσχα, π.χ. αρνητικά) σε επιλεγμένα δείγματα. Αρκετοί βιοδείκτες των καρδιαγγειακών νοσημάτων είναι ποσοτικά μεταβλητοί, αν και υπάρχουν ορισμένες εξαιρέσεις (για παράδειγμα, το φύλο, η φυλή, ο διαβήτης, η υπέρταση, οι γονότυποι). Είναι επομένως κρίσιμο να αξιολογηθεί το περιεχόμενο πληροφοριών ενός βιοδείκτη σε ένα εύρος τιμών, συχνά με τη χρήση καμπυλών ROC. Οι καμπύλες ROC απεικονίζουν την σχέση μεταξύ ευαισθησίας και ειδικότητας όταν τα επίπεδα βιοδεικτών χρησιμοποιούνται για να διαγνωστεί η νόσος στην κλινική πράξη. Κάθε σημείο της καμπύλης ROC υποδεικνύει την υπό όρους πιθανότητα θετικού αποτελέσματος από ένα τυχαίο άρρωστο άτομο που υπερβαίνει αυτή από ένα τυχαίο μη άρρωστο άτομο. Οι λόγοι πιθανότητας (LR) υπολογίζονται με τη χρήση δεδομένων ευαισθησίας και ειδικότητας και είναι πιο χρήσιμοι στους κλινικούς ιατρούς διότι δίνει την πληροφορία πόσο πιθανό είναι να λάβουμε ένα θετικό αποτέλεσμα δοκιμής σε κάποιον με ασθένεια σε σύγκριση με κάποιον χωρίς ασθένεια (LR+) και πόσο πιθανό είναι να λάβουμε αρνητικό αποτέλεσμα σε κάποιον με ασθένεια σε σύγκριση με κάποιον χωρίς ασθένεια (LR-). [95-100]

Αν για παράδειγμα ένας βιοδείκτης πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση μιας ασυνήθιστης πάθησης σε ασυμπτωματικά άτομα, θα πρέπει να έχει υψηλή εξειδίκευση επειδή η επιβεβαίωση της διάγνωσης είναι πιο σημαντική σε αυτή την περίπτωση. Εκφρασμένο σε όρους LR, απαιτείται μια δοκιμή με μεγαλύτερο LR+ (συνήθως >10). Αυτό συμβαίνει επειδή το κόστος της λανθασμένης επισήμανσης ενός υγιούς ατόμου (πρόβλεψη ασθένειας όταν είναι πιθανή η υγεία) μπορεί να υπερβαίνει το κόστος της έλλειψης μιας σπάνιας πάθησης. Μερικές φορές, όταν μελετώνται πολλαπλές εξετάσεις για προσυμπτωματικό έλεγχο, λαμβάνονται σε σειρά. Όταν λαμβάνονται πολλαπλές δοκιμές σε σειρά και η ασθένεια θεωρείται θετική όταν όλες οι δοκιμές είναι θετικές, η ειδικότητα ενισχύεται αλλά η ευαισθησία μειώνεται. Όταν λαμβάνονται παράλληλα πολλαπλές δοκιμές και θεωρείται ότι υπάρχει ασθένεια όταν κάποια από τις δοκιμές είναι θετική, η ευαισθησία αυξάνεται σε βάρος της εξειδίκευσης. Για να γίνει αποδεκτός ένας βιοδείκτης και να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί σε ελέγχους ρουτίνας είναι σημαντικό να αποδειχθεί ότι μια στρατηγική

μέτρησης του βιοδείκτη βελτιώνει τα αποτελέσματα των ασθενών σε σχέση με μια συμβατική στρατηγική που δεν περιλαμβάνει τη μέτρηση του βιοδείκτη, συνήθως στο πλαίσιο μιας τυχαιοποιημένης ελεγχόμενης κλινικής δοκιμής. Τέτοιες κλινικές δοκιμές αποδεικνύουν την αποτελεσματικότητα του προσυμπτωματικού ελέγχου και παρέχουν επίσης πολύτιμα δεδομένα για αναλύσεις κόστους - αποτελεσματικότητας. [101-104]

Εάν ένας βιοδείκτης χρησιμοποιείται για τη διάγνωση μιας δυνητικά απειλητικής κατάστασης σε έναν συμπτωματικό ασθενή (π.χ. οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου σε ασθενή με πόνο στο στήθος), θα πρέπει να έχει υψηλή ευαισθησία, επειδή η στρατηγική «αποκλεισμού» (αποκλεισμός της νόσου) είναι κρίσιμη σε αυτή την κατάσταση (ονομάζεται επίσης κανόνας SnOUT27). Εκφρασμένο σε όρους LR, απαιτείται μια δοκιμή με χαμηλότερο LR- (συνήθως $<0,10$). Αυτό συμβαίνει επειδή το κόστος της μή διάγνωσης ασθένειας (προβολή της υγείας όταν είναι πιθανή η ασθένεια) υπερβαίνει το κόστος οποιασδήποτε πρόσθετης εξέτασης ή ψευδούς διάγνωσης.

Η κατάλληλη χρήση των αποτελεσμάτων βιοδεικτών απαιτεί τη χρήση μιας Μπεϋζιανής προσέγγισης, δηλαδή, ενσωμάτωση πιθανοτήτων προ της δοκιμής με αποτελέσματα δοκιμών βιοδεικτών (που εκφράζονται ως ευαισθησία/ειδικότητα ή ως LR) για την εκτίμηση της πιθανότητας ασθένειας μετά τη δοκιμή. Οι προγνωστικές τιμές χρησιμοποιούν αυτήν την έννοια για να διευκολύνουν την ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δοκιμών, λαμβάνοντας υπόψη τον επιπολασμό της νόσου. Ακόμη και για ένα τεστ με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, τα ψευδώς θετικά τεστ θα ξεπερνούν αριθμητικά τα αληθώς θετικά τεστ όταν ο επιπολασμός της νόσου είναι πολύ χαμηλός και τα ψευδώς αρνητικά τεστ θα υπερτερούν των αληθώς αρνητικών τεστ όταν ο επιπολασμός της νόσου είναι πολύ υψηλός. Οι πιθανότητες προ-δοκιμών για την εκτίμηση των προγνωστικών τιμών μπορούν να δημιουργηθούν με βάση τη δημοσιευμένη βιβλιογραφία σε συνδυασμό με την κλινική εμπειρία. [105-107]

Οι βιοδείκτες αξιολογούνται επίσης ως προς τη διακριτική τους ικανότητα και τη δυνατότητα βαθμονόμησης. Η διακριτική ικανότητα αναφέρεται στην ικανότητα του βιοδείκτη (μόνου του ή ως μέρος μιας συνολικής βαθμολογίας) να διακρίνει το «περιστατικό» από το «μη περιστατικό» ή να διαφοροποιεί «αυτούς που θα αναπτύξουν ασθένεια» από «αυτούς που δεν θα αναπτύξουν». Συνήθως, ο στατιστικός δείκτης c χρησιμοποιείται ως η μέτρηση της διακριτικής ικανότητας του μοντέλου και είναι ισοδύναμη με την περιοχή κάτω από την καμπύλη ROC. Το στατιστικό c είναι η πιθανότητα ότι σε 2 τυχαία επιλεγμένα άτομα (ένα με και ένα χωρίς ασθένεια), ένα δεδομένο τεστ μπορεί να προσδιορίσει σωστά το άτομο με την ασθένεια. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ο στατιστικός δείκτης c εκφράζει τη συνολική απόδοση.

Η βαθμονόμηση μας παρέχει πληροφορίες σχετικά με την ικανότητα ενός βιοδείκτη (ή ενός μοντέλου που ενσωματώνει τον βιοδείκτη) να προβλέπει τον κίνδυνο σε σχέση με τον πραγματικό κίνδυνο σε υποομάδες του πληθυσμού. Η στατιστική καλής προσαρμογής Hosmer-Lemeshow χρησιμοποιείται συχνά ως δείκτης βαθμονόμησης του μοντέλου. Η βαθμονόμηση είναι ιδιαίτερα σημαντική όταν το ερώτημα που ενδιαφέρει είναι η αριθμητική πιθανότητα ασθένειας σε έναν δεδομένο ασθενή. Έτσι, έχουν αναπτυχθεί αλγόριθμοι πρόβλεψης κινδύνου που ενσωματώνουν επιλεγμένα βιοδείκτες και επιτρέπουν στους κλινικούς ιατρούς να προβλέπουν τα απόλυτα ποσοστά εξέλιξης της νόσου. Παραδείγματα περιλαμβάνουν την εκτίμηση του κινδύνου στεφανιαίας νόσου (CHD) με δεδομένες τιμές παραγόντων αγγειακού κινδύνου, την εκτίμηση του κινδύνου θανάτου ή εγκεφαλικού σε ασθενείς με κολπική μαρμαρυγή, και την εκτίμηση του κινδύνου θανάτου σε ασθενείς με εγκατεστημένη καρδιακή ανεπάρκεια. Τα μοντέλα μπορούν να επαναβαθμονομηθούν εάν υποτιμούν ή υπερεκτιμούν τον κίνδυνο. [108-115]

Κεφάλαιο 4: Τα long non coding RNAs

4.1 Βιογένεση των lncRNAs"

4.1.1 Βιολογικά χαρακτηριστικά των lncRNAs

Με την ταχεία ανάπτυξη της αλληλούχισης του RNA και της βιοπληροφορικής, έγινε εφικτό να εντοπιστεί ένας μεγάλος αριθμός lncRNA. Αυτά τα lncRNA παρουσιάζουν κοινά βιολογικά χαρακτηριστικά, όπως:

- (1) Έχει βρεθεί ότι τα lncRNAs παρουσιάζουν υψηλό βαθμό έκφρασης σε όλους τους οργανισμούς, από τους προκαρυωτικούς έως τα θηλαστικά. [116, 117]
- (2) Τα lncRNAs εκφράζονται ευρέως σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα και έχουν μεγάλη ποικιλομορφία, και πηγές αναφέρουν ότι υπάρχουν από 5.400 έως και περισσότερα των 10.000 lncRNA μετάγραφα σε ανθρώπους. Μερικές κατηγορίες από αυτά δημιουργούνται από διακριτά στοιχεία DNA στο γονιδιώματα, συμπεριλαμβανομένων των προαγωγέων, των ενισχυτών, των διαγονιδιακών περιοχών και τις αντίθετες αλυσίδες κωδικοποίησης πρωτεϊνών στα γονίδια, ενώ άλλα παράγονται από μακριές πρωτογενείς μεταγραφές με μη κανονικά μονοπάτια έκφρασης του RNA . [116,118,119]
- (3) Στην έκφραση των lncRNAs εμπλέκονται ισχυρότερο κυτταρικοί τύποι και με πολλή μεγάλη εξειδίκευση στο χώρο και στο χρόνο σε σύγκριση με γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. [120,121]
- (4) Στους ανθρώπους τα lncRNA έχουν χαμηλότερη συχνότητα έκφρασης από ότι γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. [116]
- (5) Τα περισσότερα γονίδια lncRNA έχουν διατηρηθεί κατά τη διαδικασία της εξέλιξης, και αναπτύσσονται ταχύτερα σε σχέση με τα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες . Επίσης, το lncRNA φαίνεται να είναι λιγότερο διατηρημένα στις πρωταρχικές αλληλουχίες και οι ομοιότητες στις αλληλουχίες διατηρούνται κυρίως σε δευτερεύουσες δομές. [116]

4.1.2 Βιογένεση των lncRNAs

Τα lncRNA είναι τυπικά RNA μόρια που μεταγράφονται από RNA πολυμεράση II (Pol II) και φέρουν ένα καλυμμα 5' μεθυλ-κυτοσίνης και μια 3' πολυ(A) ουρά. Σύμφωνα με τα διαφορετικά χαρακτηριστικά τους, τα lncRNAs μπορούν να ταξινομηθούν σε διάφορους τύπους. Για παράδειγμα, τα lncRNAs μπορούν να χωριστούν σε πέντε κατηγορίες με βάση τη διακριτή γονιδιωματική τους προέλευση, συμπεριλαμβανομένης της sense, antisense, bidirectional, intronic, and intergenic. Σύμφωνα με τη λειτουργία τους, τα lncRNA μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις τύπους, τα rRNA, tRNA και cRNA. Επιπλέον, σύμφωνα ανάλογα με τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους, τα lncRNA μπορούν επίσης να χωριστούν σε πυρηνικά lncRNA, σε κυτταροπλασματικά lncRNA και σε μιτοχονδριακά lncRNA. Η βιογένεση των lncRNAs είναι παρόμοια με αυτή του mRNA με κάποιες διαφορές στους μηχανισμούς. Τα περισσότερα lncRNA εμφανίζονται καλυμμένα, πολυαδενυλιωμένα και ματισμένα. [122-124] Μπορούν επίσης να ακολουθούν μη κανονικούς μηχανισμούς, όπως αυτόν της διάσπασης από τη ριβονουκλεάση P (RNase P) για παραγωγή 3' άκρων, με καλυμένα ακρά από σύμπλοκα snoRNA-πρωτεΐνης (snoRNP) και τη δημιουργία κυκλικών δομών. Για παράδειγμα, ορισμένα lncRNA (π.χ. MALAT1 και Menb) υποβάλλονται σε επεξεργασία στα 3' άκρο μέσω της αναγνώρισης και της διάσπασης δομών που μοιάζουν με tRNA από την RNase P, οδηγώντας στο σχηματισμό των ώριμων 3'- άκρων τους. [119, 125] Το snoRNA είναι ένα από τα μέλη της οικογένειας διατηρημένων πυρηνικών RNA, που παίζει κρίσιμους ρόλους κατά την ωρίμανση της υπομονάδας του ριβοσώματος σαν RNA-οδηγός. Έχει αναφερθεί ότι τα snoRNA μπορούν να φέρουν καλύματα snoRNP και στα δύο άκρα, και με την δομή αυτή να ενισχύουν τη σταθερότητά τους. Επιπλέον στα “επενδυμένα” lncRNA, δύο τύποι circRNA φαίνεται να υποβάλλονται σε επεξεργασία από πρόδρομα RNA που έχουν μεταγραφεί από την Pol II με ορισμένους ειδικούς μηχανισμούς. Οι μη πολυαδενυλιωμένες κυκλικές δομές τα προστατεύουν από την υποβάθμιση.

Η βιογένεση των lncRNAs ρυθμίζεται από διάφορες επιγενετικές τροποποιήσεις και από διάφορα είδη ρυθμιστών. Για παράδειγμα, η μεταγραφή του αντιπληροφοριακού lncRNA προωθείται με ακετυλίωση H3K56 και τον αναδιαμορφωτή χρωματίνης SWI/SNF, ενώ, αυτή η διαδικασία καταστέλλεται από σύμπλοκο παράγοντα συναρμολόγησης χρωματίνης CAF-1. Η μεθυλίωση του πατρικού αλληλόμορφου αναστέλλει σημαντικά τη μεταγραφή του lncRNA εντός του αποτυπωμένου γονιδιακού συμπλέγματος, ενεργοποιώντας έτσι την έκφραση των παράπλευρων γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των Igf2r, Slc22a2 και Slc22a3. Επιπλέον, η αποδόμηση του lncRNA μεσολαβείται από εξωσωμάτια με Nrd1-Nab3-Sen1 και TRAMP σύμπλοκα στον πυρήνα ή με Xrn1 στο κυτταρόπλασμα. Αυτή η διαδικασία καταστέλλεται από την nonsense-mediated decay πρωτεΐνη UPF1. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι οι επιγενετικές τροποποιήσεις παίζουν

κρίσιμους ρόλους στη ρύθμιση της βιογένεσης των lncRNA. Ωστόσο, οι λεπτομερείς μηχανισμοί εξακολουθούν να μην είναι πλήρως κατανοητοί. Απαιτείται πιο εις βάθος έρευνα για να διαλευκάνει τους ακριβείς μηχανισμούς της επιγενετικής τροποποίησης στη ρύθμιση της βιογένεσης lncRNA σε μελλοντικές μελέτες. [126-129]

4.2 Μηχανισμοί λειτουργίας των lncRNAs

Τα lncRNA παίζουν κρίσιμους ρόλους σε μια σειρά παθολογικών και φυσιολογικών διεργασιών μέσω της ρύθμισης του χρόνου και του βαθμού του γονιδίου έκφρασης των γονιδίων. Αυτό πραγματοποιείται με διαφορετικούς μοριακούς μηχανισμούς, συνοπτικά τους διακρίνουμε στους εξείς πέντε: σήμα, δόλωμα, ικρίωμα, οδηγός, και SINEUPs (Εικόνα 2). Όλοι αυτοί οι μηχανισμοί βασίζονται στις αλληλεπιδράσεις των lncRNAs με το DNA, το RNA και τις πρωτεΐνες.

Τα σήματα των lncRNA αναγνωρίζονται ως σηματοδοτικά μόρια τα οποία σχετίζονται με συγκεκριμένα μονοπάτια και η έκφρασή τους λειτουργεί ως έναυσμα για σηματοδότηση, ανεξάρτητα από τις λειτουργίες τους στη διαδικασία σηματοδότησης. Για παράδειγμα, η υψηλή έκφραση του lncRNA Xist φαίνεται ότι είναι ένα σήμα αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X στις γυναίκες. Μηχανικά, η επέκταση του Xist στο χρωμόσωμα X επάγει την μεθυλίωση του DNA και τροποποίηση ιστόνης, που οδηγεί στην αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X. Τα lncRNAs-δολωματα δρουν ως σφουγγάρι ή μοριακός νεροχύτης για microRNA, παράγοντες μεταγραφής (TFs) ή πρωτεΐνες δέσμησης RNA για να προωθήσουν την ενεργοποίηση ή τη σίγαση των γονιδίων-στόχων τους. Αυτά τα lncRNA ονομάζονται επίσης ανταγωνιστικά ενδογενή RNA (ceRNA). Το NKX2-1-AS1 είναι ένα τυπικό lncRNA δόλωμα. Οι Teng et al. έδειξαν ότι το NKX2-1-AS1 ρυθμίζει προς τα πάνω την έκφραση του μέλους 1 της οικογένειας σερπινών E (SERPINE1) αποσιωπώντας το miR-145-5p, ενεργοποιώντας έτσι τη σηματοδότηση του μονοπατιού VEGFR-2 για τη διευκόλυνση της αγγειογένεσης και της εξέλιξης του γαστρικού καρκίνου. [130-132]

Ένα αρχέτυπο lncRNA μπορεί να χρησιμεύσει ως καλούπι για τη συναρμολόγηση συμπλόκων με TF ή μόρια-ενεργοποιητές για ρύθμιση της χρωμοσωμική αναδιάταξης, τη δραστηριότητα της RNA Pol II ή τροποποίηση των ιστονών. Αυτά τα lncRNAs συχνά δρουν ως ρυθμιστές και εμπλέκονται στον επιγενετικό και μεταγραφικό έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης. Για παράδειγμα, Sun et al. διαπίστωσε ότι το lncRNA HOXA11-AS ρυθμίζει προς τα κάτω την έκφραση των PRSS8 και KLF2 ενισχύοντας τους παράγοντες τροποποίησης της χρωματίνης πολυκομβικό κατασταλτικό σύμπλεγμα 2, ειδική για λυσίνη απομεθυλάση 1 και

DNA μεθυλτρανσφεράση-1, που οδηγούν που οδηγεί στην προώθηση του πολλαπλασιασμού και της εισβολής των GC κυττάρων. Τα καθοδηγητικά lncRNA μπορούν να συνδεθούν με τις πρωτεΐνες στόχους για να σχηματίσουν ένα σύμπλεγμα ριβονουκλεοπρωτεϊνών και στη συνέχεια να οδηγήσουν το νεοσχηματισμένο σύμπλεγμα σε έναν συγκεκριμένο προαγωγέα γονιδίου στόχου ή σε γονιδιωματικούς τόπους, ρυθμίζοντας κατά συνέπεια τη γονιδιακή έκφραση σε μεταγραφικό επίπεδο. [116]

Το HOTTIP είναι ένα κλασικό παράδειγμα οδηγού lncRNA που μεταγράφηκε από το 5' άκρο του HOXA. Οι Wang et al. έδειξε ότι το HOTTIP αλληλεπιδρά άμεσα με την πρωτεΐνη προσαρμογής WDR5 και καθοδηγεί το WDR5/MLL να δημιουργήσει σύμπλεγμα στο 5' HOXA άκρο, οδηγώντας στην τριμεθυλίωση της ιστόνης H3 λυσίνη 4 και στη επιτύχη τη μεταγραφή του γονιδίου. [116]

Το SINEUPs είναι μια νέα λειτουργική κατηγορία φυσικών και συνθετικών antisense lncRNAs, τα οποία μπορούν να διευκολύνουν τη μετάφραση των mRNA-στόχων χωρίς επιδράσεις στα επίπεδα mRNA. Αυτός ο τύπος lncRNA περιέχει ένα ενσωματωμένο ανεστραμμένο στοιχείο SINE (δραστικό παράγοντα) που προσδίδει βιολογική δραστηριότητα και μια περιοχή σύνδεσης που προσδίδει εξειδίκευση στόχου. Η AS-Uchl1 είναι το αντιπροσωπευτικό μέλος των φυσικών SINEUP. Οι Carrieriet al. διαπίστωσαν ότι το AS-Uchl1 ήταν σε θέση να προωθήσει τη μετάφραση του Uchl1 mRNA σε ντοπαμινεργικά νευρωνικά κύτταρα ποντικού ενισχύοντας τη σύνδεση Uchl1 mRNA με βαριά πολυσώματα. Αυτό η διαδικασία εξαρτάται από το ανεστραμμένο στοιχείο SINEB2 του AS-Uchl1, το οποίο δεν έχει καμία επίδραση στο Uchl1 mRNA. Η άλλη μελέτη τους αποκάλυψε ότι η PTBP1 και η HNRNPK έδρασαν ως πρωτεΐνες δέσμευσης RNA για να αλληλεπιδράσουν με το SINEUP, συμβάλλοντας έτσι στην υποκυτταρική κατανομή του RNA SINEUP και στη συγκρότηση των συμπλόκων έναρξης της μετάφρασης. Τα συνθετικά SINEUPs έχει αποδειχθεί ότι είναι το πρώτο υποστηρικτικό εργαλείο για την αύξηση της παραγωγής πρωτεϊνών ενός γονιδίου στόχου. Για παράδειγμα, το in-vitro μεταγραφόμενο SINEUP-cox7B είναι ένα συνθετικό SINEUP σχεδιασμένο κατά του ενδογενούς mRNA cox7B, το οποίο μπορεί να αυξήσει αποτελεσματικά και ειδικά τη σύνθεση της πρωτεΐνης COX7B, διασώζοντας έτσι το μέγεθος των ματιών και του εγκεφάλου σε cox7B morphants. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι SINEUPs διαθέτει μεγάλο θεραπευτικό δυναμικό για να εφαρμοστεί σε διάφορες διαταραχές που προκαλούνται από ανεπαρκή παραγωγή πρωτεϊνών. [133-137]

4.3 Κυτταρικοί μηχανισμοί που στοχεύονται από lncRNAs

1. Τα lncRNA αλληλεπιδρούν με σύμπλοκα ή ένζυμα τροποποιημένα με ιστόνη για τη ρύθμιση της μεθυλίωσης ιστόνης

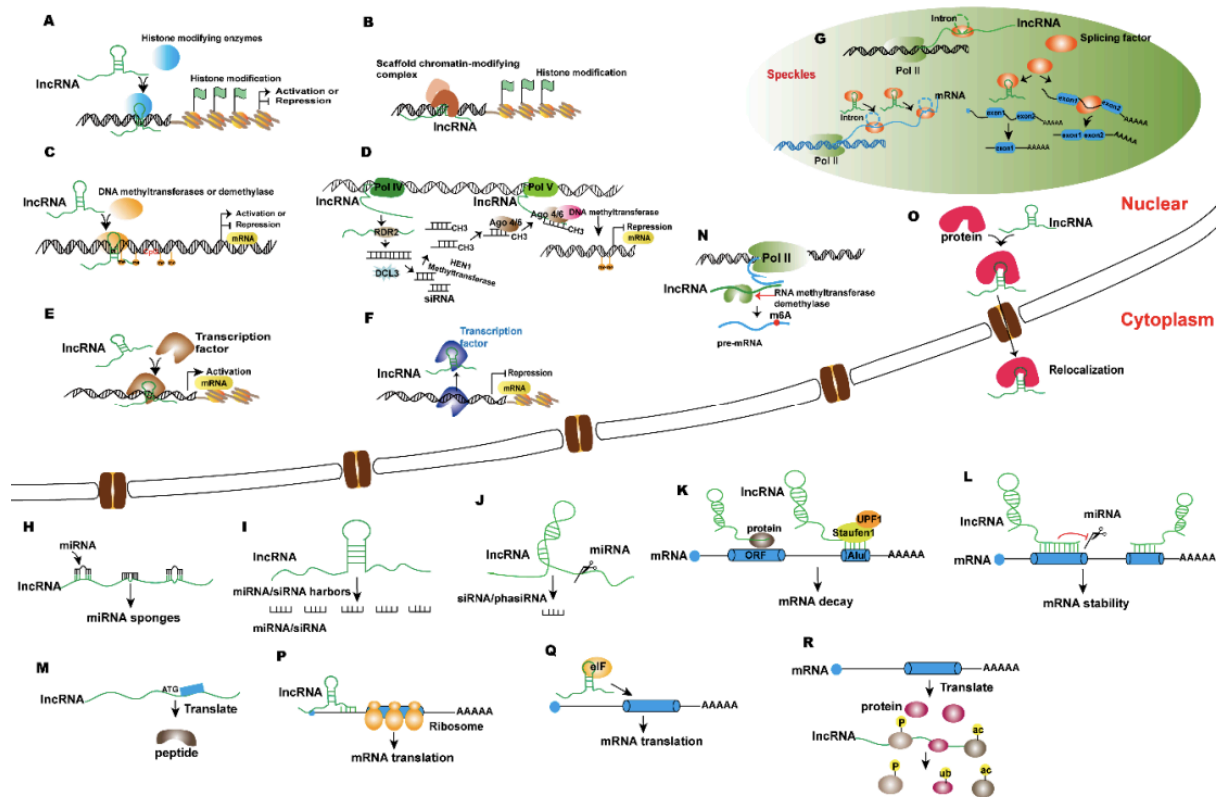
Τα lncRNAs ρυθμίζουν την επιγενετική τροποποίηση κυρίως στον πυρήνα, ρυθμίζοντας τη γονιδιακή μεταγραφή σε μεταγραφικό επίπεδο, διαμορφώνοντας την τροποποίηση των ιστονών ή του DNA, κυρίως τη μεθυλίωση και την ακετυλίωση. Τα lncRNAs μπορούν να ρυθμίσουν τη μεθυλίωση ή την ακετυλίωση των ιστονών από μόνα τους, ή μπορούν να δρουν υποστηρικτικά αλληλεπιδρώντας με ένζυμα ή σύμπλοκα μεθυλίωσης και ακετυλίωσης, ρυθμίζοντας έτσι τη μεθυλίωση και την ακετυλίωση των ιστονών ταυτόχρονα. Τα lncRNAs ρυθμίζουν τη μεθυλίωση των ιστονών προσλαμβάνοντας σύμπλοκα που έχουν τροποποιηθεί με ιστόνη ή με απευθείας αλληλεπίδραση με τις μεθυλοτρανσφεράσες ή την απομεθυλάση της ιστόνης για να ρυθμίσουν τη γονιδιακή μεταγραφή. [138-140]

2. Τα lncRNA αλληλεπιδρούν με σύμπλοκα ή ένζυμα τροποποιημένα με ιστόνη για τη ρύθμιση της ακετυλίωσης της ιστόνης

Το lncPRESS1 δεσμεύει το SIRT6, μια αποακετυλάση των ιστονών H3K56ac/K9ac. Η εξάλειψη της δράσης του του lncPRESS1 ενισχύει τη διαμεσολαβούμενη από τη SIRT6 αποακετυλίωση της H3K56/K9ac στα πολυδύναμα γονίδια. Η lncPRESS1 μεσολαβεί στη δραστηριότητα της SIRT6 και αναστέλλει την αποακετυλίωση της SIRT6 στα πολυδύναμα γονίδια με τη δέσμευση του SIRT6, διατηρώντας έτσι την επίδραση της hESC.[138]

3. Τα lncRNA δρουν ως ικρίωματα που ρυθμίζουν τη μεθυλίωση και την ακετυλίωση ιστόνης

Εκτός από τη ρύθμιση της μεθυλίωσης ή ακετυλίωσης ιστόνης μεμονομένα, τα lncRNA δρουν ως μοριακά ικρίωματα που δεσμεύουν δύο ή περισσότερα μόρια πρωτεΐνης που στη συνέχεια εκτελούν συγκεκριμένες βιολογικές λειτουργίες [138]

**Εικόνα 8:**

Ρυθμιστικοί μηχανισμοί των lncRNAs σε επίπεδο γονιδιώματος.

(A) Τα lncRNA αλληλεπιδρούν με την ιστίνη τροποποιώντας ένζυμα για την ενεργοποίηση ή την καταστολή της μεταγραφής γονιδίων.

(B) Τα lncRNA προσλαμβάνονται τροποποιημένα με ιστίνη σύμπλοκα ή λειτουργούν ως ικρίσματα για πολλαπλούς τροποποιητές ιστίνης για τη ρύθμιση της τροποποίησης ιστίνης των γονιδίων και έτσι ρυθμίζουν τη γονιδιακή μεταγραφή.

(G) Τα lncRNA στρατολογούν μεθυλοτρανσφεράσες DNA ή απομεθυλάσες για τη ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου στόχου.

(D) Εμπλέκονται lncRNA που έχουν μεταγραφεί από Pol IV/V σε μεθυλίωση DNA που εξαρτάται από το RNA, ενεργοποιώντας ή καταστέλλοντας έτσι τη γονιδιακή μεταγραφή.

(E,F) lncRNAs αλληλεπιδρούν με μεταγραφικούς παράγοντες για να ενεργοποιήσουν ή να καταστείλουν τη γονιδιακή έκφραση.

(Z) Τα lncRNA αλληλεπιδρούν με παράγοντες μίσματος ή πρωτεΐνες για τη ρύθμιση του εναλλακτικού μίσματος mRNA. παράγοντες συναρμογής άμεσα ρυθμίζουν το εναλλακτικό μίσμα του lncRNA στα στίγματα.

(H) Τα lncRNAs δρουν ως σφουγγάρι miRNA που ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου στόχου.

(I) Τα lncRNA δρουν ως miRNA ή μικρά παρεμβαλλόμενα RNA (siRNA) πρόδρομες ουσίες.

(J) τα miRNA στοχεύουν τα lncRNA για να παράγουν siRNA ή RNA σταδιακά μικρές παρεμβολής (phasiRNAs).

(K) Τα lncRNA εμπλέκονται στη διάσπαση του mRNA που προκαλείται από Staufen1 και τα lncRNA συνδέονται στις πρωτεΐνες και μεσολαβούν στη διάσπαση του mRNA.

(L) Τα lncRNA συνδέονται απευθείας με το mRNA και ρυθμίζουν το mRNA σταθερότητα ή ανταγωνιστική σύνδεση με mRNA για βελτίωση της σταθερότητας του mRNA.

(M) Τα lncRNA μπορούν να μεταφραστούν στα πεπτίδια.

(N) Τα lncRNA αλληλεπιδρούν με RNA μεθυλοτρανσφεράσες ή απομεθυλάσες και έτσι ρυθμίζουν έκφραση mRNA.

(O) Τα lncRNA συνδυάζονται με πρωτεΐνες για να ρυθμίσουν τον εντοπισμό της πρωτεΐνης.

(P) lncRNAs αλληλεπιδρούν με τα mRNA και επηρεάζουν τη μετάφραση του mRNA.

(Q) Τα lncRNA δεσμεύουν την έναρξη μετάφρασης σύμπλοκο eIF (ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης) για τη ρύθμιση της μετάφρασης του mRNA.

(R) Τα lncRNA αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες και ελέγχου της πρωτεϊνικής φωσφορύλισης, ακετυλίωσης και ουβικουτίνης μετά τη μετάφραση επίπεδο.

Πηγή: Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 5573; doi:10.3390/ijms20225573, page 2

4. Τα lncRNA εμπλέκονται στη ρύθμιση της μεθυλίωσης του DNA σε επίπεδο DNA

Η μεθυλίωση του DNA είναι μια σημαντική επιγενετική τροποποίηση που διατηρεί τη γονιδιωματική ακεραιότητα και ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων. Όταν το DNA υποστεί

μεθυλίωση, δεν αλλάζει την αλληλουχία και τη σύνθεση των νουκλεοτιδίων του, αλλά επηρεάζεται η γονιδιακή έκφραση. Οι τροποποιήσεις μεθυλίωσης καταλύονται από διαφορετικές DNA μεθυλασες, αλλά οι περισσότερες εμφανίζονται σε νησίδες CpG (διεστέρας φωσφορικής κυτοσίνης-γουανίνης) περιοχή προαγωγέα του γονιδίου και η μεθυλίωση της περιοχής προαγωγέα γονιδίου μπορεί να οδηγήσει σε μεταγραφική σίγαση που καταστέλλει την έκφραση των γονιδίων. Ο μηχανισμός της μεθυλίωσης του DNA στα φυτά είναι πιο περίπλοκος από ότι στα θηλαστικά. Η μεθυλίωση του DNA στα φυτά επιτυγχάνεται κυρίως με την αποσιώπηση του γονιδίου μεταγραφής που προκαλείται από παρεμβολή RNA. Οι ειδικές για τα φυτά RNA πολυμεράσες IV και V μεταγράφουν lncRNAs και συμμετέχουν στη μεθυλίωση DNA που εξαρτάται από το RNA (RdDM). Στα θηλαστικά, lncRNAs στρατολογούν τις μεθυλοτρανσφεράσες του DNA στους προαγωγείς των γονιδίων-στόχων, με αποτέλεσμα τη μεθυλίωση του αντίστοιχου γονιδίου στόχου των lncRNAs. [138]

5. Τα lncRNA ρυθμίζουν τη μεθυλίωση του DNA αλληλεπιδρώντας με τη μεθυλτρανσφεράση του DNA

Τα lncRNAs έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν ανώμαλη μεθυλίωση των γονιδίων-στόχων μέσω δέσμευσης DNMT1 μεθυλοτρανσφεράσης. Το μακρύ μη κωδικοποιητικό RNA που ενεργοποιείται από τον TGF- β (lncRNA ATB) παρουσιάζει εξαιρετικά υψηλά επίπεδα έκφρασης στο καρκίνωμα νεφρικών κυττάρων, διευκολύνει τις πολλαπλασιαστικές και μεταναστευτικές ικανότητες και αναστέλλει απόπτωση κυττάρων νεφρικού καρκινώματος. Το lncRNA ATB αναστέλλει την έκφραση του p53, ενός πολύ γνωστού ογκοκατασταλτικού γονιδίου. Το DNMT1 ρυθμίζει θετικά το επίπεδο μεθυλίωσης της p53 και συμμετέχει στην εμφάνιση διαφόρων όγκων. Οι αναλύσεις RIP και ChIP έδειξαν ότι το lncRNA ATB δεσμεύει το DNMT1 και το DNMT1 δεσμεύει τον υποκινητή p53. Έτσι, το lncRNA ATB στρατολογεί το DNMT1 στον υποκινητή p53 και με αποτέλεσμα την διευκόλυνση της μεθυλίωσης της p53, αναστέλλοντας έτσι την έκφραση της p53 (Εικόνα 3B).

Επιπλέον, οι ερευνητές ανακάλυψαν ότι μια κατηγορία lncRNA στρατολογεί πολλαπλά DNMT (DNMT1, DNMT3a και DNMT3b) σε γονίδια-στόχους, οδηγώντας έτσι σε μεθυλίωση των γονιδίων-στόχων και ρυθμίζοντας την έκφρασή τους. Το LINC00313 εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στον καρκίνο του θυρεοειδούς και ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση της aristaless-like homeobox 4 (ALX4). Οι αναλύσεις γονιδίου αναφοράς με διπλή λουσιφεράση έχουν δείξει ότι το LINC00313 δεσμεύει τον υποκινητή ALX4, ο οποίος έχει πολλές νησίδες CpG και μεθυλιώνεται εύκολα. RIP και ChIP δοκιμασίες αποκάλυψαν ότι το LINC00313 δεσμεύει τα DNMT1 και DNMT3B, τα οποία με τη σειρά τους δεσμεύουν τον υποκινητή ALX4. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το LINC00313 προσλαμβάνει DNMT1 και DNMT3b και κατά συνέπεια διευκολύνουν τη μεθυλίωση του προαγωγέα ALX4

και αναστέλλουν την έκφραση ALX4, ρυθμίζοντας έτσι τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την διήθηση στον καρκίνο του θυρεοειδούς (Εικόνα 8C) [141-142].

6. Λειτουργία lncRNA στην ενεργοποίηση μεταγραφής

Τα lncRNAs μπορούν να δράσουν ως συμπαράγοντες που ρυθμίζουν τη δραστηριότητα του μεταγραφικού παράγοντα (Εικ. 8E)

7. Λειτουργία lncRNA στις μεταγραφικές παρεμβάσεις

Τα lncRNA έχουν επίσης και ανασταλτική επίδραση στη μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων και μπορούν να συνεργαστούν με μεταγραφικούς παράγοντες και σύμπλοκα για την καταστολή της γονιδιακής μεταγραφής και για τη ρύθμιση της δραστηριότητας του RNAP II μέσω άλλων μηχανισμών (Εικόνα 8ΣΤ). Για παράδειγμα, το lncRNA LINC01355 έχει μεταγραφεί από την τοποθεσία 1p36 στους ανθρώπους και είναι ένας ογκοκαταστολέας στον καρκίνο του μαστού — το LINC01355 αναστέλλει την έκφραση της D1 κυκλίνης (CCND1). [138]

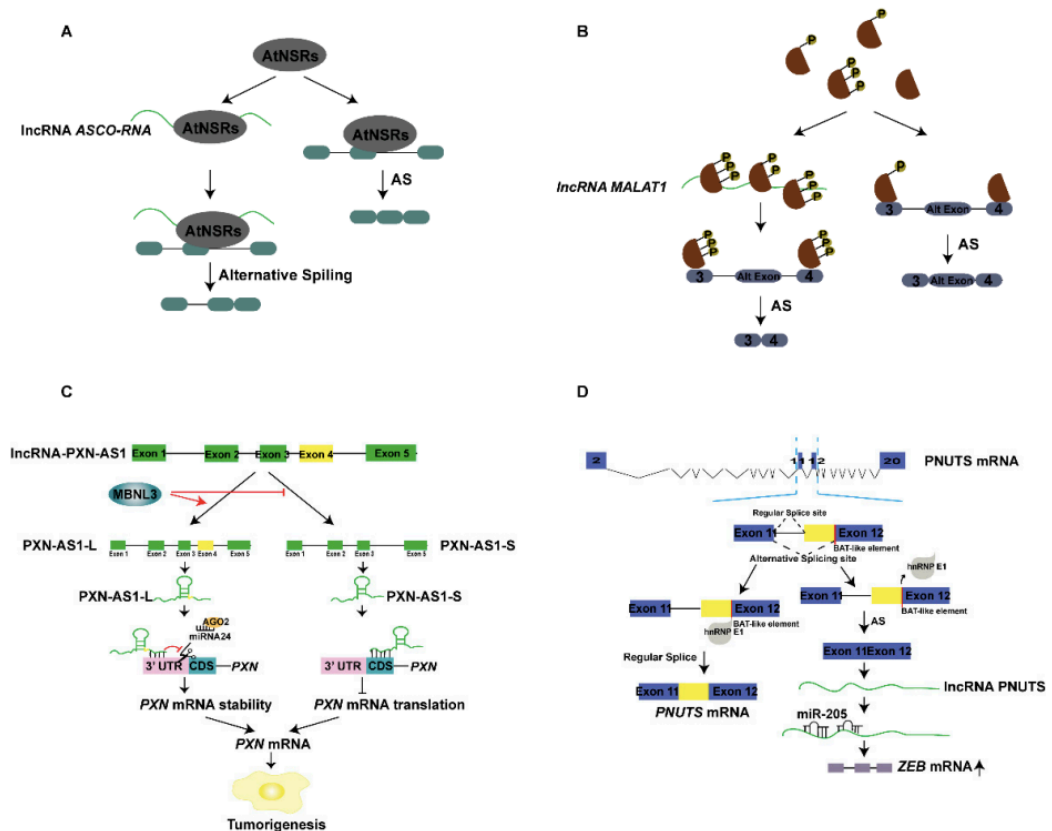
Τα lncRNA εμπλέκονται στην μετα-μεταγραφική ρύθμιση

Εκτός από τους δύο προαναφερθέντες μηχανισμούς, τα lncRNA συμμετέχουν επίσης άμεσα στο μετα-μεταγραφική ρύθμιση των mRNAs, κυρίως στην επεξεργασία των mRNAs, συμπεριλαμβανομένων της εναλλακτικής συρραφής, της επεξεργασία RNA, της μετάφραση πρωτεϊνών και στην μεταφορά, τα οποία είναι σημαντικά για τη λειτουργική διαφοροποίηση των γονιδίων. Τα lncRNA μπορούν επίσης να αλληλεπιδράσουν με τα miRNA για να ρυθμίσουν στη συνέχεια την έκφραση γονιδίου στόχου σε πολλαπλές βιολογικές διεργασίες (Εικόνα 8G–O). Εδώ, συνοψίζουμε ορισμένα lncRNA που εμπλέκονται σε μεταμεταγραφική ρύθμιση. [138]

8. lncRNAs και εναλλακτική συρραφή

Τα lncRNA ρυθμίζουν την εναλλακτική συρραφή του mRNA και την εναλλακτική συρραφή των lncRNA ως εξής:

- Ο lncRNA RNA (ASCO-RNA) δεσμεύεται ανταγωνιστικά στο Arabidopsis AtNSRs με mRNA και ρυθμίζει την εναλλακτική συρραφή (AS) στη σηματοδότηση αυξίνης. (Εικόνα 9.A)
- lncRNA MALAT1 επιδρά στον εντοπισμό και την κατανομή των πρωτεϊνών πλούσιων σε σερίνη/αργινίνη (SR) στα πυρηνικά σωματίδια και τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών SR και στρατολογεί πρωτεΐνες SR σε προ-mRNA, ρυθμίζοντας έτσι την AS. (Εικόνα 9.B)



Εικόνα 9: Τα lncRNA ρυθμίζουν την εναλλακτική συναρμολόγηση του mRNA και των lncRNA.

Πηγή: Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 5573; doi:10.3390/ijms20225573

- Ο παράγοντας συρραφής MBNL3 διευκολύνει την έκφραση μεταγραφής του lncRNA PXN-AS1-L (που περιέχει εξόνιο 4) και αναστέλλει το PXN-AS1-S (διαγραφή του εξονίου 4). Το PXN-AS1-L προάγει τη σταθερότητα

του PXN mRNA ανταγωνιζόμενο το σύμπλεγμα miRNA-24-AGO2 για δέσμευση στην περιοχή 3'-UTR του PXN mRNA. Το PXN-AS1-S καταστέλλει τη μετάφραση του mRNA του PXN μέσω απευθείας σύνδεσης με την CDS περιοχή του mRNA PXN. Το MBNL3 ρυθμίζει το lncRNA PXN-AS1 AS, επηρεάζοντας έτσι την έκφραση του mRNA του PXN στην ογκογένεση του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HCC). (Εικόνα 9C)

- Το mRNA του PNUTS έχει μια AS θέση και ένα BAT-like στοιχείο στο εξόνιο 12. Η ετερογενής πυρηνική ριβονουκλεοπρωτεΐνη (hnRNP) E1 δεσμεύει το στοιχείο BAT και προάγει τη συρραφή PNUTS pre-RNA, και έτσι παράγεται PNUTS mRNA. Η μετακίνηση του HnRNP E1 από τις BAT εναλλακτικές θέσεις συρραφής επιτρέπουν στο PNUTS pre-RNA AS να παράγει lncRNA-PNUTS. Το lncRNA PNUTS δρα ως σφουγγάρι miR-205 που προάγει την έκφραση του γονιδίου στόχου ZEB. (Εικόνα 9.D) [138]

9. Τα lncRNAs δρουν σαν τα miRNA Sponges

Τα lncRNAs μπορούν να λειτουργήσουν ως eTMs, τα οποία ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων ανταγωνιζόμενα τα miRNAs (Εικόνα 8H). Αυτός ο τρόπος δράσης ονομάζεται "miRNA sponging" και τα lncRNA με αυτή τη λειτουργία ονομάζονται ανταγωνιστικά ενδογενή RNA (ceRNAs)]. Η λειτουργική μελέτη των lncRNAs ως ενδογενών ανταγωνιστικών μιμικών στόχων των miRNAs είναι ευρέως γνωστή και αυτός είναι ένας σχετικά απλός ρυθμιστικός μηχανισμός μεταξύ των lncRNAs. Υπάρχουν αρκετές ειδικές βάσεις δεδομένων (όπως starBase v2.0, miR sponge και PeTmBase) που σχετίζονται με αυτό το μηχανισμό [143-146], ο οποίος επιτρέπει στους ερευνητές να επιλέξουν τα lncRNA και miRNA που τους ενδιαφέρουν σύμφωνα με τα δεδομένα και να μελετήσουν το μηχανισμό της αλληλεπίδρασης ceRNA. Αν και η μελέτη του μηχανισμού ceRNA είναι μια σημαντική κατεύθυνση την οι περισσότεροι ερευνητές συνεχίζουν να μελετούν τον μηχανισμό lncRNA, εξακολουθούν να υπάρχουν ερευνητές που πιστεύουν ότι ο μηχανισμός δράσης του ceRNA είναι αμφιλεγόμενος. Οι Denzler et al. ανακάλυψαν ότι οι αλλαγές στο ceRNA είναι απίθανο να επηρεάσουν χαμηλότερους στόχους των miRNA που εκφράζονται σε χαμηλότερα επίπεδα, τα επίπεδα των miRNA έχουν σημασία μόνο στο βαθμό που τα miRNA πρέπει να φτάσουν σε επίπεδα επαρκή για την αναστολή του mRNA στόχου. Υπό κανονι ομοιοστατικές συνθήκες, είναι απίθανο να συμβεί ρύθμιση γονιδίου με τη μεσολάβηση ceRNA [147-148].

10. Τα lncRNA δρουν ως πρόδρομα των miRNAs και των siRNAs

Ορισμένα lncRNA μπορούν να σχηματίσουν πρόδρομες ενώσεις miRNA μέσω ενδοκυτταρικής διάτμησης και RNA μπορούν να υποβληθούν σε επεξεργασία για την παραγωγή συγκεκριμένων miRNA που ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων-στόχων (Εικόνα 8I). Οι Cai and Cullen et al. ανακάλυψαν για πρώτη φορά το 2007 ότι το μη κωδικοποιητικό RNA H19 παράγει ένα miRNA 23 nt πρόδρομο του miRNA675 που καταστέλλει τη μετάφραση του υποδοχέα αυξητικού παράγοντα ινσουλίνης (Igf1r), επομένως αναστέλλοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ως απόκριση σε κυτταρικό στρες ή ογκογόνα σήματα [149-150].

11. Τα miRNAs στοχεύουν τα lncRNA για την παραγωγή μικρών RNA

Εκτός από τα lncRNA που λειτουργούν ως μιμητικοί στόχοι των miRNA, τα miRNA μπορούν επίσης άμεσα ή έμμεσα να ρυθμίζουν τα lncRNA. Τα lncRNAs μπορούν να δράσουν άμεσα ως στόχοι των miRNAs και μπορεί να είναι αρνητικά ρυθμίζονται από miRNAs. Τα miRNA που στοχεύουν τα lncRNA μπορούν να παράγουν siRNA ή σταδιακά μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs (phasiRNAs), ρυθμίζοντας έτσι την έκφραση γονιδίων (Εικόνα 8J). Τα phasiRNA είναι μια ειδική κατηγορία μικρών RNA που παράγονται σε διαστήματα 21 ή 24 nt από μεταγραφές προδρόμου RNA και προέρχονται από μη κωδικοποιητικές μεταγραφές και λειτουργούν σε trans στη στόχευση γονιδίων κατάντη [151].

12. Τα lncRNA μεσολαβούν στη διάσπαση του RNA

Η αφθονία του mRNA επηρεάζει άμεσα την παραγωγή πρωτεΐνης. Στα κύτταρα, η αφθονία των του mRNA συνήθως υποδεικνύεται από τα εξείς δύο: την ποσότητα της μεταγραφής και τον ρυθμό αποσύνθεσης. Το lncRNAs μπορεί να μεσολαβήσει στη διάσπαση του mRNA (Εικόνα 8K). Μπορεί να σχηματιστεί μια θέση δέσμησης Staufen 1 (STAU1) (SBS) από ατελές ζευγάρωμα βάσεων μεταξύ του στοιχείου Alu στο 3'-UTR ενός Staufen 1 (STAU1)-μεσολαβούμενου με διάσπαση mRNA (SMD) και το στοιχείο Alu σε ένα άλλο μη κωδικοποιητικό RNA πολυαδενυλίωσης στο κυτόπλασμα. Αυτά τα lncRNA ονομάζονται RNA θέσεων δέσμησης μισού Staufen 1 (STAU1) (1/2-sbsRNAs).

Το lncRNA 1/2-sbsRNA δεσμεύει το στοιχείο Alu της περιοχής 3'-UTR στο γονίδιο στόχο στο Staufen 1 (STAU1)-μεσολαβούμενη οδός διάσπασης mRNA (SMD), σχηματίζοντας έτσι ένα λειτουργικό SBS. Αυτή η τοποθεσία SBS μετενεργοποιεί το STAU1 και μεσολαβεί στη δέσμηση του STAU1 στο mRNA, προάγει τη σύνδεση της UPF1 πρωτεΐνης στο STAU1, και

οδηγεί στην αποικοδόμηση του mRNA. Αυτή είναι μια νέος μηχανισμός αποικοδόμησης mRNA που επάγει τη δέσμευση πρωτεΐνης στο mRNA και ρυθμίζει την αποικοδόμηση του mRNA [138].

13. Τα lncRNA ρυθμίζουν τη σταθερότητα του RNA

Η σταθερότητα του mRNA είναι μια ισορροπία μεταξύ της σύνθεσης και της αποικοδόμησης του απαιτούμενου RNA μέσω των διαδικασιών της γονιδιακής μεταγραφής και μετάφρασης. Η ρύθμιση της σταθερότητας του mRNA συμβαίνει κυρίως μέσω της αποικοδόμησης διαφόρων πρωτεϊνών αναγνώρισης και νουκλεασών. In vivo, η σταθερότητα του mRNA σχετίζεται με την ύπαρξη ειδικών πρωτεϊνών σύνδεσης. Πρόσφατες μελέτες έχουν αναφέρει ότι τα lncRNAs μπορεί επίσης να συμμετέχουν στη ρύθμιση της σταθερότητας του mRNA μετα-μεταγραφικά (Εικόνα 8L).

14. Τα lncRNA κωδικοποιούν πεπτίδια

Τα lncRNA στο παρελθόν ορίζονταν ως RNA που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες, αλλά καθώς προχωρούσε η έρευνα, ορισμένα lncRNA βρέθηκαν όχι μόνο να μεταφράζουν μικροπεπτίδια (Εικόνα 8M), αλλά και να χρησιμοποιούν αυτά τα κωδικοποιημένα μικροπεπτίδια για την εκτέλεση βιολογικών λειτουργιών. Ένα lncRNA που σχετίζεται με τους σκελετικούς μυς (LINC00948 στους ανθρώπους και το AK009351 σε ποντίκια) περιέχει ένα βραχύ ORF 138 νουκλεοτιδίων και έχει τη δυνατότητα να κωδικοποιούν 46 καλά διατηρημένα αμινοξέα. Το μικροπεπτίδιο που κωδικοποιείται από το lncRNA διατηρείται στο σπονδυλωτά και ονομάζεται μυορεγκουλίνη (MLN). Το MLN εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους σκελετικούς μύες και κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική άλφα έλικα. Το MLN παρουσιάζει ισχυρή δομική ομοιότητα με τη φωσφοπρωτεΐνη και σαρκολιπίνη, και οι διαμεμβρανικές τους περιοχές περιέχουν πολλά από τα ίδια διατηρημένα υπολείμματα. Η λειτουργία του MLN είναι παρόμοια με αυτή της φωσφοπρωτεΐνης και της σαρκολιπίνης, καθώς δρα απευθείας στο σαρκοπλασματικό δίκτυο Ca^{2+} -ATPase και εμποδίζει το Ca^{2+} να εισέλθει στο σαρκοπλασματικό δίκτυο. (Εικόνα 8E). Η διαγραφή του γονιδίου MLN του ποντικού ενισχύει την αποτελεσματικότητα της παροχής των σκελετικών μυών σε Ca^{2+} και βελτιώνει την ικανότητα άσκησης [138].

15. Τα lncRNA εμπλέκονται στην επανατοποθέτηση πρωτεϊνών

Τα lncRNA ρυθμίζουν τις πρωτεΐνες με διάφορους τρόπους, ένας από τους οποίους είναι η ρύθμιση του εντοπισμού της πρωτεΐνης (Εικόνα 8O).

16. Τα lncRNA ρυθμίζουν το RNA μεθυλίωση του mRNA

Η N6-μεθυλαδενοσίνη (m6A) είναι μια τροποποίηση μεθυλίωσης RNA στο έκτο άτομο αζώτου της αδενίνης σε μόρια RNA. Η μεθυλίωση του DNA και της ιστόνης παίζει πρωτίστως ρόλους σε μεταγραφικό επίπεδο, ενώ η αναστρέψιμη μεθυλίωση RNA ρυθμίζει πρωτίστως την έκφραση γονιδίων στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Το m6A είναι μία από τις πιο κοινές μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις του ευκαρυωτικού RNA και παίζει σημαντικό ρόλο στην επιτάχυνση του μεταβολισμού και της μετάφρασης του RNA, καθώς και στη διαφοροποίηση των κυττάρων, την εμβρυϊκή ανάπτυξη και τις αντιδράσεις στο στρες. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι το m6A βρίσκεται σε πολλά είδη, αντιπροσωπεύοντας το 80% της μεθυλίωσης των RNA τροποποιήσεων. Η N6 μεθυλαδενοσίνη κατανέμεται όχι μόνο στο mRNA αλλά και σε πολλά μη κωδικοποιητικά RNA, συμπεριλαμβανομένων των circRNA και lncRNA [138].

17. Τα lncRNA εμπλέκονται στην μεταφραστική ρύθμιση

Η γενετική πληροφορία μεταδίδεται από το DNA στο RNA και στη συνέχεια από το RNA στην πρωτεΐνη μέσω των διαδικασιών της μεταγραφής και της μετάφρασης των γενετικών πληροφοριών. Τα γονιδιακά mRNA εκτελούν βιολογικές λειτουργίες σε διάφορες δραστηριότητες της ζωής μέσω της μετάφρασης σε πρωτεΐνες. Τα lncRNA δεν συμμετέχουν μόνο σε ρύθμιση DNA και RNA σε μεταγραφικό και μεταμεταγραφικό επίπεδο, αλλά αναστέλλουν ή προάγουν την έκφραση γονιδίου σε μεταφραστικό επίπεδο (Εικόνα 8Q-P).

Τα lncRNA GAS5 αλληλεπιδρούν με τον μηχανισμό έναρξης μετάφρασης και ρυθμίζουν την μετάφραση του mRNA. Το GAS5 περιέχει δύο νέα μοτίβα δέσμευσης RNA που δεσμεύουν το σύμπλεγμα έναρξης μετάφρασης eIF4E (ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης) κατά την έναρξη της μετάφρασης και παίζει ρόλο στη ρύθμιση της μετάφρασης. Η υπερέκφραση του *in vitro* μεταγραμμένου GAS5 καταστέλλει την πρωτεΐνη c-Myc χωρίς να επηρεάζει το c-Myc mRNA, ενώ το GAS5 siRNA ενισχύει το επίπεδο της πρωτεΐνης c-Myc, αποδεικνύοντας έτσι ότι το GAS5 ρυθμίζει ειδικά το επίπεδο έκφρασης της πρωτεΐνης c-Myc.

18. Τα lncRNA εμπλέκονται στη μετα-μεταφραστική τροποποίηση

Η μετα-μεταφορική τροποποίηση των πρωτεϊνών είναι ένα σημαντικό μέρος της πρωτεομικής και αλλάζει τη χωροταξική τους διαμόρφωση, τη δραστηριότητα, τη

σταθερότητα και την αλληλεπίδρασή τους με άλλα μόρια, και κατά συνέπεια συμμετέχει στη ρύθμιση ποικίλων ζωτικών δραστηριοτήτων στο σώμα.

Η μετα-μεταφραστική τροποποίηση των πρωτεϊνών είναι μια πολύπλοκη διαδικασία. Έως σήμερα, περισσότεροι από 20 τύποι τροποποίησης είναι γνωστοί στους ευκαρυώτες, συμπεριλαμβανομένης της φωσφορυλίωσης, της ακετυλίωσης, της ουβικουΐτινης, της γλυκοζυλίωσης, και SUMOylation. Τα lncRNA εμπλέκονται σε διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών, κυρίως φωσφορυλίωση πρωτεϊνών, ουβικουΐτινοποίηση και ακετυλίωση, ρυθμίζοντας έτσι την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών ή σχηματισμό τους, και επηρεάζοντας τα επίπεδα έκφρασης πρωτεΐνης (Εικόνα 8R). Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα lncRNA ρυθμίζουν τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών, την ουβικουΐτινίωση και την ακετυλίωση είναι οι:

- Εμπλοκή των lncRNA στη ρύθμιση της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών
- Εμπλοκή των lncRNA στη ρύθμιση της ουβικιτίνης πρωτεϊνών
- Εμπλοκή των lncRNA στη ρύθμιση της ακετυλίωσης της πρωτεΐνης [138]

Κεφάλαιο 5: Μέθοδοι εντοπισμού των lncRNAs και μέθοδοι χρήσης τους στη διάγνωση

Η πρόοδος στις τεχνολογίες της αλληλουχίας επόμενης γενιάς (NGS) και η ευρεία ανάλυση γονιδιώματος της γονιδιακής έκφρασης έχουν αποκαλύψει ότι τουλάχιστον το 80% του ανθρώπινου γονιδιώματος είναι ενεργό. Ωστόσο, μόνο έως και το 1,5% του γονιδιώματος μεταφράζεται σε πρωτεΐνη που συνεπάγεται ότι τα RNA έχουν πιο διαφορετικούς ρόλους από ένα ενδιάμεσο συστατικό ως πρότυπα στη γενετική ροή πληροφοριών από γονίδιο σε πρωτεΐνη.

5.1 Μέθοδοι εντοπισμού των lncRNAs

Το RNA-seq είναι η πιο διαδεδομένη τεχνική που χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό νέων lncRNAs, συμπεριλαμβανομένων και των ισομορφών τους. Το RNA-seq προσφέρει ένα ευρύ φάσμα αναγνώρισης μεταγραφών με ανίχνευση νέων μεταγραφών και de novo παραγωγή τους καθώς δεν απαιτούνται ανιχνευτές για τον υβριδισμό και τη σύλληψη μεταγραφών από δείγματα ή να γνωρίζουμε την αλληλουχία-στόχο. Οι τροποποιήσεις στον αγωγό του RNA-seq διευκολύνουν την ταυτοποίηση συγκεκριμένου τύπου lncRNAs, για παράδειγμα τον ειδικό κλώνο RNA-seq επιτρέπει την επισήμανση της προέλευσης των πληροφοριών κλώνου στα μεταγραφήματα που επιτρέπει τον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση του sense/antisense lncRNA. [152]

Η χρήση των NGS τεχνολογιών ξεκίνησαν να χρησιμοποιούνται από το 2005 και βασικό τους πλεονέκτημα είναι η ταχύτητα και η ακρίβεια. οι μέθοδος που ακολουθείται στις NGS, δεν μοιάζει με εκείνες που χρησιμοποιούνταν στις μέχρι τότε τεχνολογίες αλληλούχισης (π.χ. Sanger). Αυτό που συμβαίνει στις NGS είναι θράση του δίκλωνου DNA, είτε ενζυμικά είτε με τη χρήση υπερήχων, σε τυχαία σημεία της αλυσίδας, έτσι ώστε να παραχθούν εκατομμύρια θραύσματα, διαφόρων μεγεθών. Σε επόμενο στάδιο, το ένζυμο λιγάση θα δράσει και έτσι ολιγονουκλεοτιδικά τμήματα καθορισμένης αλληλουχίας (adapters) να προσδεθούν στα με τα θραύσματα DNA που δημιουργήθηκαν. Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την επιλογή και απομόνωση των θραυσμάτων με το κατάλληλο μέγεθος, και όσα από αυτά φέρουν αντάπτορα στα άκρα τους, θα δημιουργήσουν τη βιβλιοθήκη προς αλληλούχιση. Για να υπολογιστεί η συγκέντρωσή τους, θα πρέπει να ποσοτικοποιηθούν οι βιβλιοθήκες αυτές και με τη χρήση μιας πλατφόρμας αλληλούχισης νέας γενιάς, επιτυγχάνουμε την αλληλούχιση τους. Για καλύτερα αποτελέσματα, μετά την απομόνωση των θραυσμάτων, θα ακολουθήσει η δέσμευσή τους σε ειδικά σφαιρίδια, στην επιφάνεια των οποίων θα λάβουν χώρα κάποιες αντιδράσεις για την ενίσχυσή τους και θα ακολουθήσει η ταυτόχρονη αλληλούχιση όλων των θραυσμάτων που έχουν προσδεθεί στα σφαιρίδια

(massively parallel sequencing). Από κάθε πείραμα NGS προκύπτουν τεράστιοι αριθμοί reads (πειραματικές αλληλουχίες). Ένα από τα πλεονεκτήματα της NGS είναι ότι μια μόνο αντίδραση δίνει τη δυνατότητα για μελέτη πολυάριθμων θέσεων πάνω το γονιδίωμα, για εύρεση μεταλλάξεων και διαφοροποιήσεων, σε σύγκριση με τις παλαιότερες μεθόδους, στις οποίες θα απαιτούνταν ένας πάρα πολύ μεγάλος αριθμός αντιδράσεων. Έτσι, ένας από την κάθε αντίδραση προκύπτει ένας τεράστιος αριθμός δεδομένων.

Στην αγορά κυκλοφορούν αρκετές πλατφόρμες NGS και η κάθε μία από αυτές συνοδεύεται από το δικό της πρωτόκολλο, το οποίο καθορίζει το είδος της πληροφορίας που παρέχει η κάθε πλατφόρμα. Στα μειονεκτήματά τους είναι ότι οι αλληλουχίες που διαβάζονται είναι σχετικά μικρές, είναι ακριβές στην αγορά τους και ότι παρατηρούνται αρκετά συχνά λάθη. Η κύρια διαφορά τους είναι στην χημεία της αλληλούχισης, αλλά όλες βασίζονται στην ίδια φιλοσοφία σε σχέση με την πειραματική διαδικασία, η οποία ακολουθεί πάντα τα εξείς στάδια: 1) προετοιμασία εκμαγείου, 2) αλληλούχιση, 3) ανάλυση δεδομένων. Υπάρχουν αρκετές πλατφόρμες και συνεχώς δημιουργούνται νέες. Αξίζει να αναφερθούν οι πλατφόρμες Ion Torrent και Illumina/Solexa.



Εικόνα 9: RNA-Seq Workflow

Πηγή: <https://www.cd-genomics.com/rna-seq-transcriptome.html>

Πειραματική πορεία NGS

Η πειραματική πορεία της NGS μπορεί να διαχωριστεί σε τρία μέρη, την δημιουργία βιβλιοθήκης προς αλληλούχιση, την προετοιμασία του εκμαγείου και την αντίδραση της αλληλούχισης. Προκειμένου να κατασκευαστεί η βιβλιοθήκη, δεν ακολουθείται πάντα η ίδια μέθοδος, αλλά επιλέγεται εκείνη που ταιριάζει περισσότερο στην κάθε περίπτωση και λαμβάνονται υπόψη παράγοντες όπως αν το αρχικό υλικό είναι DNA ή RNA αλλά και ο υποπληθισμός των μορίων που μελετώνται. παρά το γεγονός ότι υπάρχουν οι διαφοροποιήσεις αυτές, υπάρχουν παράλληλα και κάποιες γενικές αρχές, οι οποίες είναι οι εξείς;

- Σε περίπτωση που το μέγεθος των των μορίων προς αλληλούχιση ξεπερνά τις λίγες εκατοντάδες βάσεις, τότε αυτά θα πρέπει να κοπούν σε μικρότερα τμήματα, ώστε να είναι εφικτή η πλήρης αλληλούχιση τους και μας το καθορίζει η χημεία της αλληλούχισης της πλατφόρμας που θα χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με το

πρωτόκολλο της για τη θραύση του γενετικού υλικού θα χρησιμοποιηθούν ειδικές DNAασες ή RNAασες.

- Εφόσον τα μόρια που θέλουμε να γίνει η αλληλούχιση είναι υποσύνολο κάποιου πληθυσμού, τότε θα πρέπει να έχει προηγηθεί η επιλογή ή ο αποκλεισμός τους έτσι ώστε να προκύψει ένα δείγμα στο οποίο θα περιλαμβάνεται ο υποπληθισμός που επιθυμούμε να γίνει η αλληλούχιση.
- Σε περιπτώσεις όπου το αρχικό υλικό είναι RNA, είναι απαραίτητη η αντίστροφη μεταγραφή και η RT-PCR.
- Σε περιπτώσεις που το αρχικό υλικό είναι γενωμικό DNA, η ενίσχυση του δεν είναι απαραίτητη, αλλά έχει να κάνει με την διαθέσιμη ποσότητα του DNA.
- Σε όλες τις περιπτώσεις, η βιβλιοθήκη η οποία θα προκύψει περιλαμβάνει αποκλειστικά δικλωνα μόρια DNA.

Προκειμένου να δημιουργηθεί μια βιβλιοθήκη, θα πρέπει οι αντάπτορες να προσδεθούν στο DNA. Η βιβλιοθήκη θα προκύψει από τα τμήματα εκείνα που έχουν κατάλληλο μέγεθος και φέρουν στα άκρα τους αντάπτορες και κατόπιν ακολουθεί ποσοτικοποίηση της βιβλιοθήκης. Στο επόμενο βήμα θα ακολουθήσει η προετοιμασία του εκμαγείου, το οποίο επιλέγεται με βάση την πλατφόρμα που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για την προετοιμασία του εκμαγείου είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε γαλάκτωμα (emulsion PCR) και σε δεύτερη φάση ακολουθεί εμπλουτισμός εκμαγείου (template enrichment) και η ενίσχυση σε στερεά επιφάνεια (κελί ροής) όπου με τη, μεθοδο της “ενίσχυσης γέφυρας” επιτυγχάνεται η ενίσχυση των τμημάτων DNA.

Emulsion PCR: η μέθοδος αυτή έχει ως στόχο να δημιουργήσει ένα μεγάλο αριθμό μικροαντιδραστήρων. Καθένας από αυτούς θα γίνει η βάση όπου θα πολλαπλασιαστεί ένας μόνο κλώνος από την βιβλιοθήκη και θα προκύψουν εκατομμύρια αντίγραφα του. σε αυτή την τεχνική χρησιμοποιούνται δύο υγρά, αδιάλυτα μεταξύ τους, από τα οποία προκύπτει ένα γαλάκτωμα. Τα μικκύλια του γαλακτώματος λειτουργούν σαν ένας καλά προστατευμένος θάλαμος, που λειτουργεί σαν ένας μικροαντιδραστήρας για την PCR. Στην ιδανική περίπτωση, ο κάθε μικροαντιδραστήρας περιέχει 1) ένα μικροσφαιρίδιο, που πάνω του βρίσκονται εκκινητές ειδικοί για τους αντίστοιχους αντάπτορες οι οποίοι έχουν αγκιστρωθεί στα θραύσματα DNA, 2) όλα τα ένζυμα και τα αντιδραστήρια που απαιτούνται προκειμένου να πραγματοποιηθεί επιτυχώς η PCR, 3) μια μοναδική αλυσίδα θραύσματος. Όταν η διαδικασία της ενίσχυσης που συμβαίνει πάνω στα μικροσφαιρίδια φτάσει στο τέλος της, θα έχουν προκύψει εκατομμύρια αντιγραφα του κλωνου που επιλέχθηκε από τη βιβλιοθήκη για να αλληλουχηθεί.

Bridge amplification: στη μέθοδο αυτή η ενίσχυση των θραυσμάτων DNA συμβαίνει πάνω σε στερεή επιφάνεια (κελί ροής). Πρώτα οι αντάπτορες, με τη βοήθεια του ενζύμου λιγάση, θα προσδεθούν στα άκρα των δίκλινων θραυσμάτων DNA, τα οποία στη συνέχεια θα αποδιαταχθούν, οπότε θα προκύψουν μονόκλωνα DNA θραύσματα, τα οποία εξακολουθούν να φέρουν στα άκρα τους τους αντάπτορες. Σε επόμενο στάδιο θα ακολουθήσει η πρόσδεσή τους σε στερεή φάση που φέρει τους συμπληρωματικούς αντάπτορες. Με τη σύνδεση των συμπληρωματικών άκρων προκύπτει μια δομή γέφυρας, η οποία είναι το αρχικό εκμαγείο που θα δράσουν τα ένζυμα πολυμερισμού. Η διαδικασία αυτή θα επαναληφθεί πολλές φορές και έτσι θα προκύψουν τα clusters με το προς αλληλούχιση προϊόν. Για να ξεκινήσει η διαδικασία της αλληλούχισης θα πρέπει πρώτα να προστεθούν μέσα στο κελί ροής ειδικές DNA πολυμεράσες, σημασμένα με φθορίζουσες ουσίες νουκλεοτίδια και οι κατάλληλοι εκκινητές. Η ανάγνωση των σημασμένων που τερματίζουν την αντίδραση γίνεται με ακτίνα laser, από την οποία προκαλείται και ο φθορισμός τους.

Όπως γίνεται αντιληπτό από τα παραπάνω, η NGS μπορεί να εφαρμοστεί με διάφορες μεθόδους χημείας και αυτό εξαρτάται από την πλατφόρμα που θα χρησιμοποιηθεί σε κάθε περίπτωση. Για παράδειγμα στην πλατφόρμα Ion Torrent συνιστάται η χρήση ημιαγωγού, στην 454 Life Science η πυροαλληλούχιση, στις πλατφόρμες της Illumina η μέθοδος των αναστρέψιμων τερματιστών, ενώ στην SOLiD η μέθοδος της αντίδρασης λιγάσης.

Κάθε μια από τις πλατφόρμες χρησιμοποιεί το δικό της λογισμικό, το οποίο δίνει τη δυνατότητα, με τη χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή, να παρακολουθούμε την πορεία της διαδικασίας και να την οργανώσουμε αλλά και για συλλογή, επεξεργασία και διαχείριση των δεδομένων που θα προκύψουν μετά το πέρας κάθε NGS.

Το γονιδίωμα αναφοράς αποτελείται από μια ακολουθία DNA και βάση αυτού στοιχίζονται οι πειραματικές αλληλουχίες και από αυτό αντλούμε τις πληροφορίες σχετικά με τις λειτουργίες του οργανισμού. Έτσι, μπορούν να εντοπιστούν τυχόν αλλαγές στο γονιδίωμα του υπό μελέτη οργανισμού, και να γίνει η ερμηνεία των δεδομένων που προέκυψαν από την NGS. Οι αλληλουχίες αναφοράς βρίσκονται διαθέσιμες στις βάσεις δεδομένων UCSC ή Ensembl.

Η NGS έχει χρησιμοποιηθεί κατά κόρον στην μοριακή διαγνωστική, μερικά παραδείγματα των εφαρμογών της είναι στην αλληλούχιση ολόκληρων γονιδιωμάτων, η στοχευμένη αλληλούχιση, η αλληλούχιση RNA, για τη μελέτη έκφρασης γονιδίων αλλά και μεταγραφικών παραγόντων. Η RNA-seq είναι μια μεθοδολογία με πάρα πολύ μεγάλη σημασία με μια ποικιλία από διαφορετικές τεχνικές και μπορεί να δώσει τόσο ποιοτική όσο και ποσοτική πληροφορία. Υπάρχουν δύο είδη, η RNA-seq με την οποία μπορούν να αλληλουχηθούν μεγάλα μόρια RNA (>200nt) και την small RNA-seq με την οποία αλληλουχούνται μόρια με μέγεθος μικρότερο από 200 nt. Στην πρώτη κατηγορία μεταξύ άλλων εντάσσεται και η περίπτωση της αλληλούχισης των lncRNAs. Για τις αναλύσεις αυτές μπορεί να χρησιμοποιηθεί δείγμα από ολικό αίμα. Με την χρήση της RNA-seq μπορούν να

ταυτοποιηθούν νέα εναλλακτικά μετάγραφα γονιδίων, να προσδιοριστεί το ποσοστό της έκφρασης των πολυαδενυλιωμένων μεταγραφών, να ανιχνευτούν χειμερικά μετάγραφα τα οποία αποδίδονται σε συμπτύξη γονιδίων.[2] Η αλληλουχία RNA (RNA-seq) είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική, που εφαρμόζεται σε διάφορους τομείς της βιολογικής και ιατρικής έρευνας. Παρακάτω περιγράφονται αρκετές κοινές εφαρμογές του RNA-seq:

1. Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης
2. Ανάλυση διαφορικής γονιδιακής έκφρασης
3. Ανακάλυψη νέων γονιδίων
4. Εναλλακτική ανάλυση ματίσματος
- 5. Ανακάλυψη βιοδεικτών**
6. Μη κωδικοποιητική έρευνα RNA
7. Διευκρίνιση γονιδιακής λειτουργίας
8. Πληθυσμιακή γενετική και εξελικτική βιολογία,

και με τις τεχνολογικές εξελίξεις, το εύρος των εφαρμογών RNA-seq συνεχίζει να επεκτείνεται ασταμάτητα. [153]

5.2 Μέθοδοι χρήσης των lncRNAs στη διάγνωση

Εφόσον ένα lncRNA έχει κατοχυρωθεί ως κλινικός βιοδείκτης, τότε η παρακολούθησή του στον ασθενή μπορεί να γίνεται με τη χρήση μεθόδων όπως η real time PCR.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά με σκοπό να ενισχύσει συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA και στις μέρες μας έχει εξελιχθεί σε ένα από τα πιο σημαντικά εργαλεία που χρησιμοποιούνται για την έρευνα στο πεδίο των βιολογικών επιστημών και την ιατρική. Αυτό οφείλεται και στο γεγονός ότι με τη χρήση του ενζύμου ανάστροφη μεταγραφάση έγινε εφικτή η επέκταση της μεθόδου και σε RNA αλληλουχίες. Έτσι, εφόσον πρώτα δημιουργηθεί συμπληρωματικό DNA (cDNA), στη συνέχεια ακολουθεί διαδικασία ενίσχυσης PCR, και μέθοδος αυτή ονομάζεται PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR). Ωστόσο, επειδή η κλασική μέθοδος της PCR υστερούσε στην αξιόπιστα για ακριβή ποσοτικοποίηση, η τεχνική βελτιώθηκε, και πλέον η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real time PCR) μας δίνει την δυνατότητα ποσοτικοποίησης με ακρίβεια [154]. Έτσι, η real time PCR, που ονομάζεται και ποσοτική PCR, δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της προόδου της PCR σε πραγματικό χρόνο, μέχρι να δημιουργηθούν τα πολυάριθμα αντίγραφα ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA. Τα συστατικά που απαιτούνται για να τρέξει η τεχνική αυτή είναι το πρότυπο DNA, οι

εκκινητές, τα νουκλεοτίδια (dNTPs) και η θερμοσταθερή DNA πολυμεράση . Εκτός από τη βελτιωμένη ακρίβεια, ευαισθησία και ταχύτητα, ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα της real time PCR σε της συμβατικής μεθόδου PCR, είναι η αξιόπιστη ποσοτική σχέση μεταξύ του αριθμού των αρχικών αλληλουχιών στόχου (πριν από την ενίσχυση με PCR) και του ποσότητα αμπλικονίου που λαμβάνουμε μετά από κάποιους κύκλος της μεθόδου . Η ιδιότητα αυτή έχει τεράστια αξία για τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό των νουκλεϊκών οξέων-στόχων, και κατ επέκταση για την για την ποσοτικοποίηση του mRNA στην ανάλυση γονιδιακής έκφρασης [155-157].

Ποσοτικοποίηση

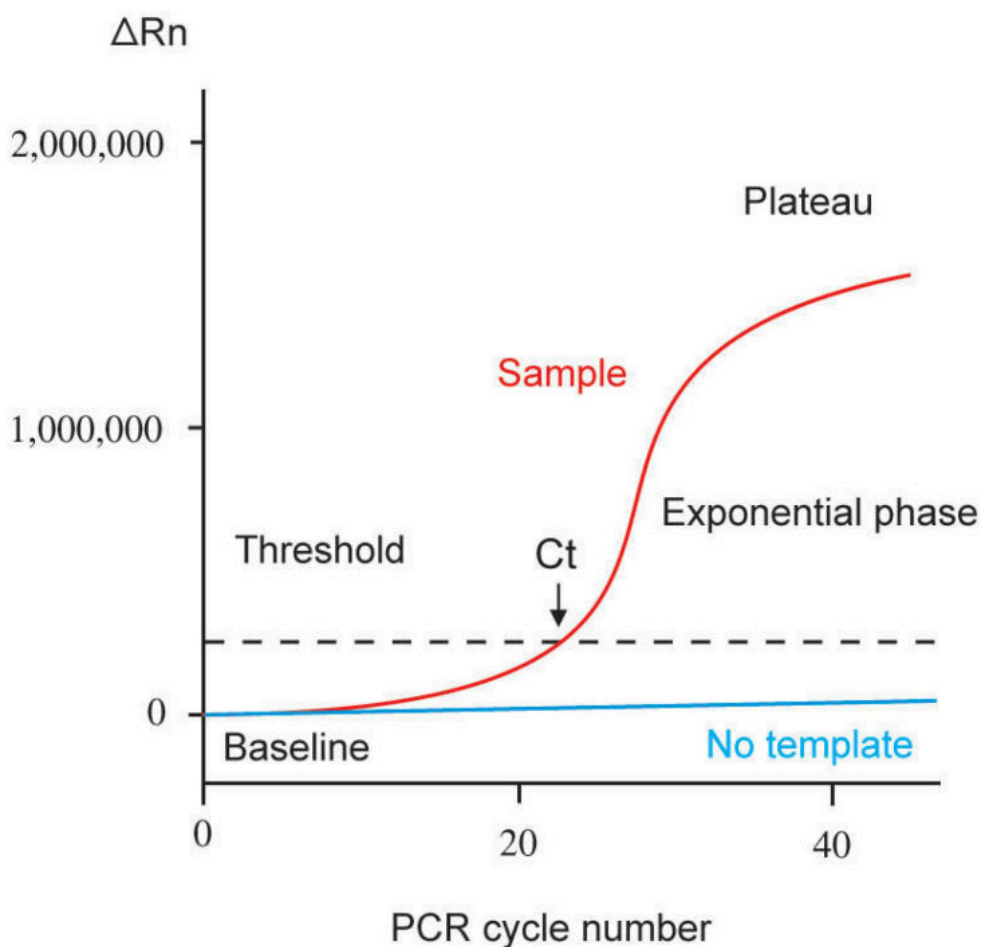
Ο αριθμός των μορίων DNA στο αρχικό μείγμα καθορίζει την ποσότητα του αμπλικονίου που πρόκειται να δημιουργηθεί ύστερα από έναν καθορισμένο αριθμό κύκλων PCR. Όταν τα αρχικά μόρια DNA είναι λίγα, τότε από την διαδικασία PCR στα πρώτα στάδια, θα προκύψει σχετικά μικρό αμπλικόνιο. Από την άλλη, εφόσον οι ποσότητες των αρχικών μορίων είναι μεγάλες, η ποσότητα του προϊόντος θα είναι επίσης μεγάλη. Αυτή η σχέση δίνει τη δυνατότητα να υπολογιστεί ο αριθμός των μορίων DNA που υπάρχει σε ένα δείγμα, μετρώντας δηλαδή την ποσότητα του προϊόντος που λαμβάνουμε. Στην συμβατική PCR, η συσχέτιση των μορίων DNA έναρξης και εκείνων που θα παραχθούν από τη διαδικασία της PCR δεν είναι απόλυτα σαφής επειδή έχει διαπιστωθεί ότι ακόμα και μεγάλες διαφορές στον αριθμό του αρχικού DNA θα δώσουν ως αποτέλεσμα σχετικά μικρές διαφορές στα προϊόντα που θα λάβουμε στο από την PCR. Αυτό έχει αποδοθεί σε διάφορους παράγοντες, κάποιοι από αυτούς είναι η παρουσία αναστολέων της αντίδρασης πολυμεράσης, ο περιορισμός του αντιδραστήριου και η συσσώρευση μορίων πυροφωσφορικού. Από την άλλη, η δυνατότητα παρακολούθησης του προϊόντος PCR σε πραγματικό χρόνο, και κυρίως κατά την διάρκεια της εκθετικής φάσης, καθιστά την real time PCR πολύ αξιόπιστη όσον αφορά στην ποσοτικοποίηση, και ο λόγος είναι ότι κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης της αντίδρασης PCR, υπάρχει μεγάλη ακρίβεια στην ποσοτική σχέση μεταξύ του αρχικού DNA και του προϊόντος PCR που λαμβάνουμε. Η ποσότητα του αμπλικονίου κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης, μας επιτρέπει τον υπολογισμό της ποσότητα του αρχικού DNA στο μείγμα, και κατά συνέπεια την συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων στο αρχικό δείγμα [155, 158].

Στο σχήμα παρουσιάζεται η γραφική παράσταση που συσχετίζει την ποσότητα του προϊόντος PCR (ενίσχυση) με τον αριθμό των κύκλων αντίδρασης. Από το συνδυασμό των δεδομένων αυτών, προκύπτει μια αντιπροσωπευτική καμπύλη ενίσχυσης PCR σε πραγματικό χρόνο.

Παρατηρώντας την καμπύλη ενίσχυσης του διαγράμματος, μπορούμε εύκολα να διακρίνουμε τρεις κύριες φάσεις, τη γραμμική (στην αρχή), την εκθετική (λογαριθμική-γραμμική), και στο πλατό. Η γραμμική φάση αντιστοιχεί στην αρχή της μεθόδου, και κατά τη διάρκεια των αρχικών κύκλων της διαδικασίας PCR, οι τιμές της εκπομπής φθορισμού του προϊόντος αντιπροσωπεύουν τη γραμμική φάση γείωσης και δεν υπερβαίνουν τη γραμμή βάσης. Περνώντας στο επόμενο στάδιο της εκθετικής φάσης οι συνθήκες που επικρατούν είναι οι πλέον ιδανικές και τα απαραίτητα συστατικά βρίσκονται σε αφθονία, οπότε η PCR θα αποκτήσει τη βέλτιστη ενίσχυση, με αποτέλεσμα τον διπλασιασμό του προϊόντος στο πέρας κάθε κύκλου. Οι υπολογισμοί γίνονται στη φάση αυτή με βάση την ένταση του φθορισμού. Μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους, τα συστατικά ερχίζονται να περιορίζονται σε σημείο που η διαδικασία χάνει την εκθετική της ιδιότητα, ο ρυθμός ενίσχυσης στόχου μειώνεται και η αντίδραση PCR φτάνει σε ένα επίπεδο. Επομένως, η ένταση φθορισμού όταν η διαδικασία φτάσει στο πλατό δεν είναι χρήσιμη για τον υπολογισμό των δεδομένων [155,159].

Στην Εικόνα 10, χρησιμοποιούνται διάφοροι όροι που σχετικοί με την καμπύλη ενίσχυσης της PCR πραγματικού χρόνου. Ως βασική γραμμή ορίζεται ως ο αριθμός των κύκλων PCR στους οποίους συσσωρεύεται ένα σήμα αναφοράς φθορισμού αλλά παραμένει κάτω από τα όρια ανίχνευσης. Το κατώφλι αναφέρεται σε μια αυθαίρετη τιμή που επιλέγεται με βάση τη μεταβλητότητα της γραμμής βάσης για να αντικατοπτρίζει μια στατιστικά σημαντική αύξηση του σήματος σε σχέση με τη γραμμή βάσης, διακρίνοντας έτσι ένα σχετικό σήμα ενίσχυσης από το φόντο. Γενικά ορίζεται στο $10 \times$ την τυπική απόκλιση για το μέσο σήμα του φθορισμού γραμμής βάσης. Ένα σήμα φθορισμού που μπορεί να ανιχνευθεί πάνω από το όριο θεωρείται ότι είναι ένα πραγματικό σήμα που χρησιμοποιείται για τον καθορισμό του κύκλου κατωφλίου (C_t) για ένα δείγμα. Το C_t αναφέρεται στον κλασματικό αριθμό κύκλου PCR στον οποίο το επίπεδο φθορισμού αναφοράς είναι υψηλότερο από το ελάχιστο επίπεδο ανίχνευσης, το κατώφλι. Η διαθεσιμότητα περισσότερων προτύπων νουκλεϊκού οξέος στην αρχή της αντίδρασης έχει ως αποτέλεσμα λιγότερους κύκλους που απαιτούνται για να επιτευχθεί η θέση στην οποία το σήμα φθορισμού είναι ουσιαστικά υψηλότερο από το φόντο. Η ποσοτικοποίηση του νουκλεϊκού οξέος μπορεί στη συνέχεια να πραγματοποιηθεί συγκρίνοντας τις τιμές C_t των δειγμάτων σε μια συγκεκριμένη τιμή φθορισμού με παρόμοια δεδομένα που λαμβάνονται από μια σειρά προτύπων κατασκευάζοντας μια πρότυπη καμπύλη [155,160,161]. Μια τυπική καμπύλη μπορεί να δημιουργηθεί με βάση μια σειριακή αραίωση μιας αρχικής ποσότητας γνωστών νουκλεϊκών οξέων, όπως ένα πλασμίδιο για το γονίδιο ενδιαφέροντος ή ένα χημικά συντιθέμενο μονόκλωνο νόημα ολιγονουκλεοτίδιο για ολόκληρο

το αμπλικόνιο. Εναλλακτικά, μια τυπική καμπύλη μπορεί επίσης να δημιουργηθεί με βάση μια κυτταρική γραμμή με γνωστό αριθμό αντιγράφων ή επίπεδο έκφρασης του γονιδίου που ενδιαφέρει. Ελλείψει τυπικών καμπυλών, η σχετική ποσοτικοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί συγκρίνοντας τις τιμές Ct των δειγμάτων με αυτές ενός ελέγχου αναφοράς [155].



Εικόνα 10: Αναπαράσταση ενιαίας γραφικής παράστασης ενίσχυσης ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο. ΔRn = εκπομπή φθορισμού του αμπλικονίου σε κάθε χρονικό σημείο μείον την εκπομπή φθορισμού της γραμμής βάσης. Ct = κύκλος κατωφλίου. Η γραμμή βάσης αναφέρεται στους κύκλους PCR στους οποίους συσσωρεύεται το φθορίζον σήμα ενός ανταποκριτή. Ωστόσο, είναι κάτω από τα όρια ανίχνευσης του οργάνου

Πηγή: doi: 10.3390/genes13122387

Θεωρητικά, η PCR πραγματικού χρόνου μπορεί να εφαρμοστεί μόνο στην ενίσχυση μήτρας με τη μορφή μορίων DNA. Πώς, λοιπόν, να ανιχνεύσουμε και να ποσοτικοποιήσουμε ένα δείγμα RNA; Εκτός από την ενίσχυση μητρας αρχικό δείγμα DNA, η PCR πραγματικού

χρόνου μπορεί να εφαρμοστεί και για RNA δείγματα. Για να συμβεί αυτό, το μόριο RNA θα πρέπει πρώτα να μεταγραφεί αντίστροφα σε ένα συμπληρωματικό DNA (cDNA) με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση, ακολουθούμενο από μετατροπή του παραγόμενου μονόκλωνου cDNA σε δίκλωνο DNA. Αυτό το δίκλωνο DNA στη συνέχεια ενισχύεται χρησιμοποιώντας τυπική PCR. Αυτή η διαδικασία είναι γνωστή ως αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR σε πραγματικό χρόνο) [156]. Η RT-PCR σε πραγματικό χρόνο μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας μια μέθοδο ενός ή δύο σταδίων. Σε RT-PCR πραγματικού χρόνου ενός βήματος, το βήμα RT συνδέεται με PCR. Σε αυτή τη διαδικασία, το RNA μεταγράφεται αντίστροφα σε cDNA και στη συνέχεια ενισχύεται σε μία αντίδραση. Τα κύρια πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι η ταχύτητα, η οικονομία και η περιορισμένη επεξεργασία των δειγμάτων με αποτέλεσμα τη μείωση των σφαλμάτων και την αποφυγή της μόλυνσης που μπορεί να συμβεί από τη χρήση πιπέτας. Ωστόσο, καθώς αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί εκκινητές ειδικούς για γονίδιο τόσο για την RT όσο και για την PCR που εμφανίζονται σε έναν σωλήνα αντίδρασης, άλλα γονίδια ενδιαφέροντος δεν μπορούν να ενισχυθούν για μεταγενέστερη ανάλυση. Στην RT-PCR σε πραγματικό χρόνο δύο βημάτων, η διαδικασία αποτελείται από δύο ξεχωριστά βήματα. Το αρχικό βήμα είναι μια αντίδραση RT για την κατασκευή cDNA. Το δεύτερο βήμα είναι η ενίσχυση cDNA χρησιμοποιώντας παραδοσιακή PCR πραγματικού χρόνου. Το κύριο πλεονέκτημα της RT-PCR δύο σταδίων είναι ότι το cDNA δημιουργείται τυποποιημένα, χρησιμοποιώντας τυχαίους εκκινητές εξαμερούς ή ολιγο-dT, οι οποίοι επιτρέπουν την πλήρη μετατροπή των μηνυμάτων στο δείγμα RNA σε cDNA, επιτρέποντας έτσι μελλοντική ανάλυση άλλων γονιδίων. [162].

Κεφάλαιο 6: lncRNAs και καρδιαγγειακά νοσήματα.

Τα lncRNAs μπορούν να συσχετιστούν με πολλές ανθρώπινες ασθένειες συμπεριλαμβανομένων των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Η πρώτη συσχέτιση μεταξύ lncRNA και καρδιακής νόσου προήλθε από γενετικές μελέτες στις οποίες ανακαλύφθηκε ότι ο τόπος στον οποίο παρατηρούνται πολλοί πολυμορφισμοί οι οποίοι οφείλονται σε ένα νουκλεοτίδιο και εμπλέκονται με την ευαισθησία στο έμφραγμα του μυοκαρδίου δεν ήταν στην πραγματικότητα αυτό το οποίο κωδικοποιεί πρωτεΐνη, αντί αυτού την κωδικοποιείται από ένα ncRNA, το οποίο ονόμασαν MIAT ((myocardial infarction-associated transcript). Έκτοτε, σε πολλές μελέτες γίνεται αναφορά σχετικά με τη συσχέτιση μεταξύ lncRNA και CVD. [163]

Δεδομένης της ιδιαιτερότητας της έκφρασης των lncRNAs, θα ήταν αφελές να σκεφτούμε ότι η απορρύθμιση της έκφρασης αυτών των μορίων σε καρδιακές παθολογικές διεργασίες, ακόμα κι αν ο μοριακός μηχανισμός πίσω από αυτά δεν είναι απολύτως κατανοητός, είναι μια απλή σύμπτωση [164]. Η κακή διατήρηση αυτών των μεταγραφών μεταξύ των ειδών, δημιουργεί μεγάλη δυσκολία στην μεταφραση των ευρήματα που προκύπτουν από μοντέλα τρωκτικών για ανθρώπινες εφαρμογές. Ωστόσο, υπάρχουν αρκετές μελέτες που μας δίνουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα σχετικά με την πρόγνωση των καρδιαγγειακών νοσημάτων και νέες θεραπείες από την χρήση των καρδιακών lncRNAs [165-172]. Στην παρούσα διατριβή, μας απασχολούν οι ασθένειες εκείνες που προκύπτουν από την δημιουργία αθηρωματικής πλάκας, οπότε παραθέτονται οι βιοδείκτες που αφορούν την **στεφανιαία νόσο** και το **οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου** [163]

6.1. Στεφανιαία νόσος

6.1.1. Βιοδείκτες στεφανιαίας νόσου

6.1.1.1 aHIF

Σε όλα τα είδη μεταζώων, ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας 1 (HIF-1) λειτουργεί ως κύριος ρυθμιστής της ομοιόστασης του οξυγόνου ελέγχοντας τόσο την παροχή όσο και τη χρήση του O₂. Το HIF-1 είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται

από μια ρυθμιζόμενη με O₂ υπομονάδα HIF-1α και μια συστατικά εκφρασμένη υπομονάδα HIF-1. Τα έμβρυα ποντικών που είναι ομόζυγα για ένα αλληλόμορφο στον τόπο Hif1a, που κωδικοποιεί το HIF-1α, σταματούν την ανάπτυξή τους την εμβρυϊκή ημέρα 8,5 και πεθαίνουν μέχρι την εμβρυϊκή ημέρα 10,5 με καρδιακά και αγγειακά ελαττώματα καθώς και μειωμένη παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων, υποδεικνύοντας ότι και τα τρία από τα παραπάνω εξαρτώνται από το HIF-1. Μεταξύ των γονιδίων-στόχων HIF-1 είναι εκείνα που κωδικοποιούν εκκρινόμενους παράγοντες και υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας που ελέγχουν την παροχή O₂ ρυθμίζοντας την αγγειογένεση και την αγγειακή αναδιαμόρφωση. Το HIF-1 λειτουργεί ως κύριος ρυθμιστής σε αυτή τη διαδικασία επειδή ρυθμίζει συντονισμένα την έκφραση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων των οποίων τα πρωτεϊνικά προϊόντα παίζουν κρίσιμους ρόλους στη μεσολάβηση των αγγειακών αποκρίσεων στην υποξία και την ισχαιμία. Εκτός από την προώθηση της παροχής O₂, το HIF-1 ενεργοποιεί επίσης τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα, μεταφορείς και μιτοχονδριακές πρωτεΐνες που μειώνουν τη χρήση του O₂, λειτουργώντας και πάλι ως κύριος ρυθμιστής για τη μετάβαση των κυττάρων από τον οξειδωτικό μεταβολισμό στον γλυκολυτικό μεταβολισμό.

Μελέτες αποκάλυψαν ότι η υπό όρους εξουδετέρωση της έκφρασης του HIF-1α ή του HIF-1β στα ενδοθηλιακά κύτταρα της καρδιάς οδήγησε σε έλλειψη οξείας καρδιοπροστασίας μετά από ερέθισμα IPC. Το ATP μεταβολίζεται σε αδενοσίνη ως απόκριση σε ένα ερέθισμα IPC, οι ανταγωνιστές των υποδοχέων αδενοσίνης μπλοκάρουν την καρδιοπροστασία που προκαλείται από ένα ερέθισμα IPC και η έγχυση αδενοσίνης είναι αρκετή για να προκαλέσει καρδιοπροστασία. Το ATP μεταβολίζεται σε αδενοσίνη μέσω της δραστηριότητας δύο εξωκυτταρικών ενζύμων: CD39 (επίσης γνωστό ως τριφωσφορική διφωσφοϋδρολάση εκτονουκλεοζίτη), που υδρολύει το ATP σε ADP και στη συνέχεια σε AMP, και CD73 (γνωστό και ως εκτο-5'-νουκλεοτιδάση), το οποίο υδρολύει την AMP στην αδενοσίνη. Η γενετική κατάλυση ή η φαρμακολογική αναστολή της δραστηριότητας CD39 ή CD73 στην καρδιά του ποντικού οδηγεί σε απώλεια της επαγόμενης από την IPC καρδιοπροστασίας. Η αύξηση των επιπέδων αδενοσίνης στην καρδιά που προκλήθηκε από IPC μπλοκαρίστηκε με προεπεξεργασία της καρδιάς με βραχύ παρεμβαλλόμενο RNA έναντι του HIF-1α. Τα CD39 και CD73 εκφράζονται σε αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και η έκφραση τόσο του CD39 όσο και του CD73 mRNA προκλήθηκε από ένα ερέθισμα IPC σε καρδιές WT, αλλά όχι σε καρδιές Hif1a^{+/-}. Η IPC προκάλεσε επίσης καρδιακή έκφραση του υποδοχέα A2B

αδενοσίνης με τρόπο που εξαρτάται από το HIF-1α. Από τα δεδομένα που ελήφθησαν από πειράματα σε ποντικούς, προκύπτει ότι η IPC επάγει την εξαρτώμενη από το HIF-1 έκφραση CD39 και CD73 σε αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, οδηγώντας σε αυξημένα επίπεδα αδενοσίνης, η οποία είναι υποχρεωτικός μεσολαβητής της οξείας καρδιοπροστασίας. Τόσο τα ενδοθηλιακά κύτταρα όσο και τα καρδιομυοκύτταρα εκφράζουν υποδοχείς αδενοσίνης και η δέσμευση αδενοσίνης μπορεί να ενεργοποιήσει τη σηματοδότηση AKT - η οποία είναι εξασθενημένη στις καρδιές Hif1a+/- (41) - και άλλες οδούς που μεσολαβούν στις προστατευτικές επιδράσεις της IPC. [171]

6.1.1.2 APOA1-AS

Το APOA1-AS (αντιπληροφοριακό μεταγράφημα της απολιποπρωτεΐνης A-I (ApoA1)) είναι το κύριο πρωτεϊνικό συστατικό της λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (HDL), η οποία παίζει βασικό ρόλο στην αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης, προάγοντας την εκροή χοληστερόλης από τους ιστούς, δρώντας ως συμπαράγοντας για την ακυλοτρανσφεράση της λεκιθίνης χοληστερόλης.

Στα πλαίσια διεξαγωγής έρευνας, μετρήθηκαν τα επίπεδα τριών lncRNA που σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση σε μονοκύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) από 20 ασθενείς με στεφανιαία νόσο και 20 συμμετέχοντες χωρίς νόσο, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της RT σε πραγματικό χρόνο PCR. Βρέθηκε ότι τα επίπεδα του lncRNA KCNQ1 αντίθετου κλώνου/αντιπληροφοριακού μεταγραφήματος 1 (KCNQ1OT1), του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα 1 άλφα αντιπληροφοριακού RNA 2 (HIF1A-AS2) και της απολιποπρωτεΐνης A-1 αντιπληροφοριακού RNA (APOA1-AS) αυξήθηκαν σημαντικά στο CAD ασθενείς (το KCNQ1OT1 αυξήθηκε κατά 2,38 φορές, $P = 0,00042$, HIF1A-AS2 αυξήθηκε κατά 2,00 φορές, $P = 0,0001$, APOA1-AS αυξήθηκε κατά 4,52 φορές, $P = 0,000048$). Η περιοχή κάτω από την καμπύλη ROC ήταν 0,865 για το KCNQ1OT1, 0,852 για το HIF1A-AS2 και 0,967 για το APOA1-AS. Επιπλέον, ο συνδυασμός lncRNAs οδήγησε σε πολύ υψηλότερη τιμή AUC 0,990 για την πρόβλεψη της στεφανιαίας νόσου. Η ανάλυση συσχέτισης του Spearman έδειξε ότι το APOA1-AS συσχετίστηκε θετικά με τα NT-proBNP, CKMB, MYO και HsTnT, ενώ το HIF1A-AS2 συσχετίστηκε με NT-proBNP και HsTnT. Ως εκ τούτου, η αύξηση των KCNQ1OT1, HIF1A-AS2 και APOA1-AS προβλέπει στεφανιαία νόσο και αυτά τα μόρια μπορούν να θεωρηθούν ως νέοι βιοδείκτες.[172]

6.1.1.3 AWPPH

Το lncRNA-AWPPH ασκεί καρκινογόνο δράση σε ανθρώπινους καρκίνους¹³ και έχει βρεθεί ότι επιδεινώνει τον καρκίνο των ωοθηκών ενεργοποιώντας την οδό Wnt/ β -κατενίνη, η οποία σχετίζεται επίσης με την δημιουργία αθηρωματικής πλάκας. Στα πλαίσια έρευνας, μελετήθηκαν τα επίπεδα του lncRNA-AWPPH στον ορό από 132 δείγματα ασθενών με στεφανιαία νόσο και από 50 μάρτυρες και ανιχνεύθηκαν με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qRT-PCR). Επίσης, με βάση το ιατρικό ιστορικό θεραπείας με στατίνες, εξετάστηκαν διαφορικές εκφράσεις του lncRNA-AWPPH σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο. Στη συνέχεια, αναλύθηκε η συσχέτιση μεταξύ του επιπέδου lncRNA-AWPPH και των κλινικών δεδομένων ασθενών με στεφανιαία νόσο και αξιολογήθηκαν οι παράγοντες κινδύνου που επηρεάζουν την πρόγνωση της στεφανιαίας νόσου με πολυπαραγοντική ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης. Βρέθηκε ότι το lncRNA-AWPPH εκφραζόταν σε μεγάλο βαθμό στον ορό των ασθενών με στεφανιαία νόσο, ιδιαίτερα εκείνων που λάμβαναν θεραπεία με ροσουβαστατίνη. Η LDL-C, η hs-CRP και το lncRNA-AWPPH ορού ήταν ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου για στεφανιαία νόσο, ενώ η HDL-C ήταν ευνοϊκή για τη νόσο. Συμπερασματικά, το lncRNA-AWPPH εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στον ορό ασθενών με στεφανιαία νόσο, μπορεί να μειωθεί με θεραπεία με στατίνες και θα μπορούσε να είναι ένας πιθανός δείκτης ορού για την πρόβλεψη της πρόγνωσης της στεφανιαίας νόσου. [173]

6.1.1.4 CoroMarker

Στα πλαίσια μελέτης λήφθηκαν δείγματα αίματος από 134 συμμετέχοντες οι οποίοι αρχικά υποβλήθηκαν σε στεφανιογραφία. Από αυτούς, εγγράφηκαν και τους ταξινόμησαν ως ασθενείς με στεφανιαία νόσο 89 άτομα και ως υγιείς 45 άτομα. Για την αξιολόγηση της έκφρασης του CoroMarker χρησιμοποιήθηκε ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και η δοκιμή ανοσοπροσροφητικού συνδεδεμένου με ένζυμο χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση φλεγμονωδών κυτοκινών συμπεριλαμβανομένων υψηλής ευαισθησίας αντιδραστικής πρωτεΐνης C (hsCRP), ιντερλευκίνης (IL)-1 β (IL-1 β), IL-6, πρωτεΐνης υποδοχέα τύπου NOD 3 (NLRP3) και δεικτών σταθερότητας της στεφανιαίας πλάκας συμπεριλαμβανομένης της μεταλλοπεπτιδάσης μήτρας 9 (MMP-9) και του διαλυτού συνδέτη

CD40 (sCD40L). Η σοβαρότητα της στεφανιαίας στένωσης προσδιορίστηκε από το Gensini Score.

Σε αυτή τη μελέτη, βρέθηκε ότι η έκφραση του κυκλοφορούντος Coromarker ήταν αυξημένη σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο και η καμπύλη ROC έδειξε ισχυρή προγνωστική αξία για τον κίνδυνο νόσησης. Αυτά τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να αποδοθούν στη θετική ρύθμιση της συστημικής φλεγμονής από τον Coromarker lncRNA, που έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου, όπως υποδεικνύεται από τη θετική συσχέτιση με τις φλεγμονώδεις κυτοκίνες, συμπεριλαμβανομένων των hsCRP, IL-1β και IL-6. Το επίπεδο έκφρασης του Coromarker συνδέθηκε επίσης με το Gensini Score, υποδεικνύοντας ότι συσχετίστηκε με στένωση στεφανιαίας αρτηρίας. Υποτέθηκε ότι ο Coromarker μπορεί να ρυθμίζει τη μεταγραφή των προφλεγμονωδών παραγόντων, να αυξάνει την έκφραση της κυτοκίνης και να επιταχύνει την ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου και να επιδεινώνει τον βαθμό της στένωσης των στεφανιαίων αγγείων. Θεωρήθηκε επίσης ότι η IL-1 και η IL-6 ήταν ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη της νόσου. Η IL-1β ρυθμίζει προς τα πάνω την έκφραση των μορίων προσκόλλησης στην επιφάνεια του ενδοθηλίου, προάγει τον πολλαπλασιασμό των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων και διεγείρει την παραγωγή κυτοκινών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη AS.²³ Η IL-6 ενεργοποιεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα, επιταχύνει την πήξη και προάγει τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων. [174]

6.1.1.5 H19

Μελέτες έχουν δείξει ότι το H19 σχετίζεται με ΣΝ. Ενώ ο μηχανισμός του είναι ακόμη άγνωστος, είναι ευρέως γνωστό ότι το H19 μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον TGF-β1 και ότι ο TGF-β1 σχετίζεται με την ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου. Σε μελέτη που έγινε σε 30 άτομα που έπασχαν από στεφανιαία νόσο και σε 30 υγιή άτομα, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ H19 και TGF-β1 διερευνήθηκαν μέσω υπερέκφρασης H19 και βρέθηκε ότι σε σύγκριση με κύτταρα ελέγχου και κύτταρα αρνητικού ελέγχου, η έκφραση του H19 αυξήθηκε σημαντικά μετά τον μετασχηματισμό με φορέα έκφρασης H19, υποδεικνύοντας την επιτυχώς εγκατεστημένη κυτταρική σειρά υπερέκφρασης H19. Μετά την υπερέκφραση H19, το επίπεδο έκφρασης του TGF-β1 αυξήθηκε σημαντικά τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι το H19 μπορεί να προάγει την έκφραση του TGF-β1 για να συμμετέχει στη στεφανιαία νόσο.

Συμπερασματικά, το επίπεδο του H19 στον ορό ήταν υψηλότερο σε ασθενείς με ΣΝ από ό,τι σε υγιή άτομα ή ασθενείς με άλλους τύπους καρδιαγγειακών παθήσεων. Ο ορός H19 είναι ένας σταθερός, ειδικός και ακριβής διαγνωστικός δείκτης για ΣΝ. Το επίπεδο έκφρασης H19 στον ορό συσχετίστηκε θετικά με το επίπεδο του TGF-β1 στο πλάσμα και η υπερέκφραση του H19 αύξησε σημαντικά το επίπεδο πρωτεΐνης TGF-β1 στο HCAEC. Η μελέτη μας εξακολουθεί να είναι περιορισμένη από το μικρό μέγεθος του δείγματος. Μπορεί να χρειαστούν μελλοντικές μελέτες με πιο σημαντικά μεγέθη δειγμάτων για να επιβεβαιωθούν περαιτέρω τα συμπεράσματά μας [175-177]

6.1.1.6 LIPCAR

Σε μελέτη που έγινε για να διερευνηθούν 8 μεμονωμένα lncRNAs που είναι γνωστό ότι σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση χρησιμοποιήθηκαν δείγματα πλάσματος από 300 ασθενείς με ΣΝ και 180 άτομα ελέγχου χρησιμοποιώντας ποσοτικές μεθόδους αλυσιδωτής αντίδρασης ανάστροφης μεταγραφής-πολυμεράσης (qRT-PCR) σε πραγματικό χρόνο. Διαπιστώθηκε ότι το επίπεδο πλάσματος του H19 και το μακροχρόνιο διαγονιδιακό μη κωδικοποιητικό RNA που προβλέπει καρδιακή αναδιαμόρφωση (LIPCAR) ήταν σημαντικά αυξημένα σε ασθενείς με ΣΝ. Η περιοχή κάτω από τη χαρακτηριστική καμπύλη λειτουργίας του δέκτη ήταν 0,631 για το H19 και 0,722 για το LIPCAR. Οι πολυπαραγοντικές αναλύσεις λογιστικής παλινδρόμησης έδειξαν ότι το H19 και το LIPCAR του πλάσματος ήταν ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες για ΣΝ, ακόμη και μετά από προσαρμογή για παραδοσιακούς παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου. Περαιτέρω μελέτες εντόπισαν ότι τα επίπεδα του H19 και του LIPCAR στο πλάσμα ήταν επίσης αυξημένα σε ασθενείς με ΣΝ με καρδιακή ανεπάρκεια σε σύγκριση με εκείνους με φυσιολογική καρδιακή λειτουργία. Συνολικά, τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν ότι τα αυξημένα επίπεδα H19 και LIPCAR στο πλάσμα σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ΣΝ και μπορεί να θεωρηθούν ως νέοι βιοδείκτες για ΣΝ.

Το LIPCAR θεωρείται ως ένα lncRNA που προέρχεται από μιτοχόνδρια και μπορεί να ανιχνευθεί εύκολα στην κυκλοφορία. Βρέθηκε ότι τα αυξημένα επίπεδα LIPCAR στο πλάσμα συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ΣΝ. Περαιτέρω αναλύσεις έδειξαν ότι τα επίπεδα LIPCAR στο πλάσμα ήταν υψηλότερα σε ασθενείς με ΣΝ με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια σε σύγκριση με εκείνους χωρίς χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια. Ο μηχανισμός στον οποίο βασίζεται η συσχέτιση του LIPCAR με τη ΣΝ παραμένει ασαφής. Έχει βρεθεί ότι το

LIPCAR συσχετίζεται ισχυρά με την περίμετρο μέσης, την ινσουλίνη νηστείας πλάσματος, τον όγκο του υποδόριου λίπους και την HDL-C. Τα δεδομένα μας έδειξαν επίσης ότι το επίπεδο του LIPCAR στο πλάσμα συσχετίστηκε αυξημένη συγκέντρωση Έτσι, η αυξημένη LIPCAR μπορεί να προκαλέσει μεταβολική δυσομειοσταση, η οποία με τη σειρά της προάγει την αθηροσκλήρωση. Επιπλέον, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία εμπλέκεται στην αιτιολογία των καρδιαγγειακών παθήσεων, ιδιαίτερα της ΣΝ. Έτσι, ως lncRNA που προέρχεται από μιτοχόνδρια, μια πιθανή λειτουργία του LIPCAR στη ρύθμιση των μιτοχονδριακών οδών, όπως η οξειδωτική φωσφορυλίωση και η ενεργοποίηση του φλεγμονώδους, πρέπει να διερευνηθεί σε μελλοντικές μεταγραφικές μελέτες. [178,179]

6.1.1.7 MALAT1 και MIAT

Υπάρχουν ενδείξεις ότι δυο lncRNA, το MIAT (μεταγράφημα σχετιζόμενο με έμφραγμα του μυοκαρδίου) και το MALAT1(σχετιζόμενο με μετάσταση μεταγραφή 1 αδενοκαρκινώματος πνεύμονα), μπορεί να εμπλέκονται στην παθογένεση της στεφανιαίας νόσου.

Σε σχετική μελέτη έγινε προσδιορισμός των κυκλοφορούντων επιπέδων MIAT και MALAT1 σε 110 ασθενείς με ΣΝ και 117 χωρίς ΣΝ και αυξη συσχετίστηκαν τα επίπεδά τους με τα κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα. Τα επίπεδα έκφρασης του περιφερικού αίματος ποσοτικοποιήθηκαν με qPCR σε πραγματικό χρόνο. Το διάμεσο επίπεδο έκφρασης MIAT σε ασθενείς με ΣΝ ήταν σημαντικά 12 φορές υψηλότερο από τους ελέγχους ($p < 0,001$). Όμως, το διάμεσο επίπεδο έκφρασης MALAT1 ήταν παραπλήσιο στις ομάδες ασθενών και ελέγχου. Και τα δύο lncRNA έδειξαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σχετικής έκφρασης σε ασθενείς με θετικό ιστορικό προηγούμενων καρδιακών ισχαιμικών συμβάντων και το MIAT έδειξε σημαντικά υψηλότερη έκφραση σε διαβητικούς ασθενείς με ΣΝ. Η περιοχή κάτω από την καμπύλη του MIAT ($0,888 \pm 0,02$ με ευαισθησία 95,5% και ειδικότητα 72,7%), ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή του MALAT1 ($0,601 \pm 0,04$ με ευαισθησία 50% και ειδικότητα 63,6%) για την ανίχνευση της παρουσίας σημαντικής CAD. Τα τρέχοντα ευρήματα υποδηλώνουν ότι το lncRNA MIAT θα μπορούσε να έχει διαγνωστική σημασία σε ασθενείς με ΣΝ. Τα επίπεδα MALAT1, ωστόσο, δεν φάνηκε να είναι αξιόπιστα για να έχουν κλινική χρήση.

Ένα από τα πρώιμα αναγνωρισμένα lncRNA που σχετίζονται με έμφραγμα του μυοκαρδίου (MI) είναι το μεταγράφημα που σχετίζεται με έμφραγμα του μυοκαρδίου

Το MIAT (μεταγράφημα σχετιζόμενο με έμφραγμα του μυοκαρδίου) είναι ένα lncRNA που κωδικοποιείται από το γονίδιο MIAT πέντε εξόνων στο χρωμόσωμα 22q12.1. Η in vitro λειτουργική ανάλυση αποκάλυψε μια παραλλαγή ευαισθησίας στον μυοκάρδιο στο εξόνιο 5 του MIAT, που σχετίζεται με αυξημένο μεταγραφικό επίπεδο του γονιδίου, υποδηλώνοντας έναν πιθανό ρόλο του MIAT στην παθογένεση του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Επιπλέον, το MIAT αποδείχθηκε ότι εμπλέκεται στην αγγειακή ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, γεγονός που υποδηλώνει έναν ρόλο στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης.

Υπάρχουν πρόσφατες αναφορές ότι το MIAT έχει επίδραση στο miR-150-5p που επηρεάζει την καταστολή του VEGF (αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα), ο οποίος προάγει τη φλεγμονώδη κυτταρική μετανάστευση στον έσω χιτώνα, καθώς και την πρόκληση παθολογικής αγγειογένεσης. Κατά τη διαδικασία της αγγειογένεσης, το οποίο είναι ένα φυσικό φαινόμενο μετά από ένα στεφανιαίο καρδιαγγειακό επεισόδιο, το MIAT αυξανόταν, επιρεάζοντας το miR-150-5p, ρυθμίζοντας έτσι το επίπεδο του VEGF και άλλων παραγόντων που συμβάλλουν στην αθηροσκλήρωση. Επιπλέον, πρόσφατα βρέθηκε ότι το MIAT αυξάνεται σε ασθενείς με ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο, μια ασθένεια που μοιράζεται παρόμοια παθογένεια με τη ΣΝ.

Το MALAT1 (μετάγραφο 1 σχετιζόμενο με το πνευμονικό αδενοκαρκίνωμα), είναι ένα lncRNA που κωδικοποιείται από το γονίδιο MALAT1 στο χρωμόσωμα 11q13.1 και πιθανολογείτε ότι σχετίζεται με κάποιο τρόπο με την παθογένεση της στεφανιαίας νόσου. Στο αγγειακό σύστημα, αυτό το lncRNA που εκφράζεται από το ενδοθήλιο μπορεί να ρυθμίσει την ανάπτυξη και τη λειτουργία των αγγείων και έχει αποδειχθεί ότι παίζει ρόλο στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς και στην προώθηση της διαφοροποίησης των σκελετικών μυών. Είναι ενδιαφέρον ότι τα επίπεδα του MALAT1 φαίνεται να αυξάνονται σημαντικά με την υποξία και αυτό αποτελεί μια ένδειξη ότι ίσως να έχει κάποιο ρόλο στη ΣΝ, στην οποία υπάρχει τοπική υποξία στις ισχαιμικές περιοχές.

Όμως υπάρχουν ακόμη αρκετά κενά στη γνώση σχετικά με το MIAT και μόνο λίγες αμφιλεγόμενες μελέτες είναι διαθέσιμες μέχρι σήμερα σχετικά με το επίπεδο έκφρασης του MIAT στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΣΝ. Επιπλέον, το MALAT1 έχει ρόλο στη λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων, αλλά είναι άγνωστο εάν παίζει αιτιολογικό ρόλο στη ΣΝ. Αυτή η μελέτη στοχεύει να προσδιορίσει το επίπεδο έκφρασης των MIAT και MALAT1 σε ασθενείς με ΣΝ και να συσχετίσει αυτά τα επίπεδα με τα κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα των ασθενών. [180]

6.1.1.8 SMILR

Στα πλαίσια μελέτης, με χρήση RNA αλληλουχιών, εντοπίστηκαν περισσότερα από 300 lncRNA των οποίων η έκφραση άλλαξε σε κύτταρα λείου μυός των αγγείων των ανθρώπων μετά από διέγερση με ιντερλευκίνη-1α και αυξητικό παράγοντα που προέρχεται από αιμοπετάλια. Φάνηκε ότι το lncRNA που προκαλείται από λείους μυς ενισχύει την αντιγραφή (SMILR). Μετά τη διέγερση, η έκφραση SMILR αυξήθηκε τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα και ανιχνεύθηκε με ρυθμισμένα μέσα. Επιπλέον, η καταστροφή του SMILR μείωσε σημαντικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Παρατηρήθηκε επίσης ότι η έκφραση των γονιδίων που βρίσκονται κοντά στο SMILR άλλαξε με τη θεραπεία με αυξητικό παράγοντα που προέρχεται από ιντερλευκίνη-1α/αιμοπετάλια και η έκφραση HAS2 μειώθηκε με την αναστολή του SMILR. Σε ανθρώπινα δείγματα, παρατηρήθηκε η αυξημένη έκφραση του SMILR σε ασταθείς αθηρωματικές πλάκες και ανιχνεύτηκαν αυξημένα επίπεδα στο πλάσμα από ασθενείς με υψηλή C-αντιδρώσα πρωτεΐνη στο πλάσμα.

Τα μονοπάτια υψηλής συντηρημένης ιντερλευκίνης-1α (IL1α) και αυξητικού παράγοντα που προέρχεται από αιμοπετάλια (PDGF) παίζουν εξέχοντα ρόλο στις παθολογίες που σχετίζονται με τα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων. Επιπλέον, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι ο τραυματισμός της απολίνωσης έχει ως αποτέλεσμα μειωμένο σχηματισμό νέου έσω χιτώνα σε ποντίκια με νοκ-άουτ υποδοχέα IL1. Οι μεταγενέστεροι μεσολαβητές περιλαμβάνουν τα μόρια σηματοδότησης MEKK1 και p38 και τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ που ενεργοποιεί μεσολαβητές φλεγμονής και κυτταρική μετανάστευση.⁷ Το PDGF είναι ισχυρό μιτογόνο και χημειοελκτικό και η έκφραση αυξάνεται μετά από αγγειακό τραυματισμό.⁸ Αντίθετα, μια μείωση της έκφρασης του PDGF μειώνει την πάχυνση του εσωτερικού χιτώνα και το κυτταρικό περιεχόμενο του νεοέσω χιτώνα. συνεργιστικές επιδράσεις. Αυτό περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του NF-κΒ που οδηγεί στην ανοδική ρύθμιση των γονιδίων μεταλλοπρωτεΐνης 3 και 9,10 που είναι κρίσιμα για την ανάπτυξη αγγειοπολλαπλασιαστικών παθολογιών. [181]

6.2 Οξύ Έμφραγμα του Μυοκαρδίου

6.2.1. Βιοδείκτες οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου

6.2.1.1 aHIF

Σε όλα τα είδη μεταζώων, ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας 1 (HIF-1) λειτουργεί ως κύριος ρυθμιστής της ομοιόστασης του οξυγόνου ελέγχοντας τόσο την παροχή όσο και τη χρήση του O₂. Το HIF-1 είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από μια ρυθμιζόμενη με O₂ υπομονάδα HIF-1α και μια συστατικά εκφρασμένη υπομονάδα HIF-1β. Τα έμβρυα ποντικών που είναι ομόζυγα για ένα αλληλόμορφο στον τόπο Hif1a, που κωδικοποιεί το HIF-1α, σταματούν την ανάπτυξή τους την εμβρυϊκή ημέρα 8,5 και πεθαίνουν μέχρι την εμβρυϊκή ημέρα 10,5 με καρδιακά και αγγειακά ελαττώματα καθώς και μειωμένη παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων, υποδεικνύοντας ότι και τα τρία από τα παραπάνω εξαρτώνται από το HIF-1. Μεταξύ των γονιδίων-στόχων HIF-1 είναι εκείνα που κωδικοποιούν εκκρινόμενους παράγοντες και υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας που ελέγχουν την παροχή O₂ ρυθμίζοντας την αγγειογένεση και την αγγειακή αναδιαμόρφωση. Το HIF-1 λειτουργεί ως κύριος ρυθμιστής σε αυτή τη διαδικασία επειδή ρυθμίζει συντονισμένα την έκφραση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων των οποίων τα πρωτεϊνικά προϊόντα παίζουν κρίσιμους ρόλους στη μεσολάβηση των αγγειακών αποκρίσεων στην υποξία και την ισχαιμία. Εκτός από την προώθηση της παροχής O₂, το HIF-1 ενεργοποιεί επίσης τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα, μεταφορείς και μιτοχονδριακές πρωτεΐνες που μειώνουν τη χρήση του O₂, λειτουργώντας και πάλι ως κύριος ρυθμιστής για τη μετάβαση των κυττάρων από τον οξειδωτικό μεταβολισμό στον γλυκολυτικό μεταβολισμό.

Μελέτες αποκάλυψαν ότι η υπό όρους εξουδετέρωση της έκφρασης του HIF-1α ή του HIF-1β στα ενδοθηλιακά κύτταρα της καρδιάς οδήγησε σε έλλειψη οξείας καρδιοπροστασίας μετά από ερέθισμα IPC. Το ATP μεταβολίζεται σε αδενοσίνη ως απόκριση σε ένα ερέθισμα IPC, οι ανταγωνιστές των υποδοχέων αδενοσίνης μπλοκάρουν την καρδιοπροστασία που προκαλείται από ένα ερέθισμα IPC και η έγχυση αδενοσίνης είναι αρκετή για να προκαλέσει καρδιοπροστασία. Το ATP μεταβολίζεται σε αδενοσίνη μέσω της δραστηριότητας δύο εξωκυτταρικών ενζύμων: CD39 (επίσης γνωστό ως τριφωσφορική διφωσφοϋδρολάση εκτονουκλεοζίτη), που

υδρολύει το ATP σε ADP και στη συνέχεια σε AMP, και CD73 (γνωστό και ως εκτο-5'-νουκλεοτιδάση), το οποίο υδρολύει την AMP στην αδενοσίνη. Η γενετική κατάλυση ή η φαρμακολογική αναστολή της δραστηριότητας CD39 ή CD73 στην καρδιά του ποντικού οδηγεί σε απώλεια της επαγόμενης από την IPC καρδιοπροστασίας. Η αύξηση των επιπέδων αδενοσίνης στην καρδιά που προκλήθηκε από IPC μπλοκαρίστηκε με προεπεξεργασία της καρδιάς με βραχύ παρεμβαλλόμενο RNA έναντι του HIF-1α. Τα CD39 και CD73 εκφράζονται σε αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και η έκφραση τόσο του CD39 όσο και του CD73 mRNA προκλήθηκε από ένα ερέθισμα IPC σε καρδιές WT, αλλά όχι σε καρδιές Hif1a^{+/-}. Η IPC προκάλεσε επίσης καρδιακή έκφραση του υποδοχέα A2B αδενοσίνης με τρόπο που εξαρτάται από το HIF-1α. Από τα δεδομένα που ελήφθησαν από πειράματα σε ποντικούς, προκύπτει ότι η IPC επάγει την εξαρτώμενη από το HIF-1 έκφραση CD39 και CD73 σε αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, οδηγώντας σε αυξημένα επίπεδα αδενοσίνης, η οποία είναι υποχρεωτικός μεσολαβητής της οξείας καρδιοπροστασίας. Τόσο τα ενδοθηλιακά κύτταρα όσο και τα καρδιομυοκύτταρα εκφράζουν υποδοχείς αδενοσίνης και η δέσμευση αδενοσίνης μπορεί να ενεργοποιήσει τη σηματοδότηση AKT - η οποία είναι εξασθενημένη στις καρδιές Hif1a^{+/-} και άλλες οδούς που μεσολαβούν στις προστατευτικές επιδράσεις της IPC. [182]

6.2.1.2 CDR1AS και ZFAS1

Σε μελέτη με σκοπό την αξιολόγηση lncRNAs σαν πιθανούς βιοδείκτες για το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου μετρήθηκαν τα κυκλοφορούντα επίπεδα 15 μεμονωμένων lncRNAs, τα οποία είναι γνωστό ότι σχετίζονται με την καρδιαγγειακή νόσο, χρησιμοποιώντας δείγματα ολικού αίματος που συλλέχθηκαν από 103 ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, 149 άτομα χωρίς οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και 95 υγιείς εθελοντές. Βρέθηκε ότι μόνο δύο από αυτά, το ZFAS1 και το CDR1AS, έδειξαν σημαντική διαφορική έκφραση μεταξύ ασθενών με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και υγιών ατόμων. Το κυκλοφορικό επίπεδο του ZFAS1 ήταν σημαντικά χαμηλότερο στο οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου από ό,τι σε άτομα χωρίς οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, ενώ το CDR1AS έδειξε τις αντίθετα αποτελέσματα με το επίπεδο στο αίμα του σημαντικά υψηλότερο στο οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και από αναλύσεις αυτά τα δύο lncRNA προσδιορίστηκαν ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες για το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Παρόμοιες αποτελέσματα των κυκλοφορούντων

ZFAS1 και CDR1AS παρατηρήθηκαν σταθερά σε ένα μοντέλο με ποντίκια με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου.

Το ZFAS1 είναι ένα αντιπληροφοριακό άκρο μεταγραφής στο άκρο 5' του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Znf1 και φιλοξενεί εσωτερικά τρία C/D box snoRNAs (SNORDs): Snord12, Snord12b και Snord12c. Το ZFAS1 βρέθηκε εξαιρετικά σταθερό με χρόνο ημιζωής >32 hrs σε κύτταρα νευροβλαστώματος και ZFAS1 εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στον μαστικό αδένα και παρουσιάζεται μειωμένο στους όγκους του μαστού σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ιστό. Η εσωτερική οδός (ονομάζεται επίσης αποπτωτική οδός με τη μεσολάβηση των μιτοχονδρίων) και η εξωτερική οδός είναι οι δύο οδοί που ρυθμίζουν την απόπτωση, με την πρώτη να παίζει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων. Η απόπτωση με τη μεσολάβηση των μιτοχονδρίων ξεκινά από ενδοκυτταρικά ερεθίσματα, όπως το οξειδωτικό στρες, η υποξία και η στέρηση θρεπτικών ουσιών, που προκαλεί ανισορροπία στην έκφραση των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl2 (προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες (Bax) που ρυθμίζονται προς τα πάνω και αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες. Bcl2)), που οδηγεί στην επαγωγή της μιτοχονδριακής διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης και στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος C. Το κυτόχρωμα C προάγει τη συγκρότηση αποπτοσώματος που σχετίζεται με την κασπάση-9. Μελέτη έδειξε ότι η καταστροφή του ZFAS1 προστατεύει τα καρδιομυοκύτταρα από την απόπτωση. Στην ίδια μελέτη βρέθηκε επίσης ότι η έκφραση των πρωτεϊνών κασπάσης-3, κασπάσης-9 και Bax που σχετίζονται με την απόπτωση από την προκαλούμενη από μιτοχόνδρια αποπτωτική οδό αυξήθηκε σημαντικά σε ποντικούς με έμφραγμα του μυοκαρδίου και το Bcl2 μειώθηκε σε σχέση με τα υγιή ζώα. Συγκεκριμένα, το shZFAS1-V ανέστρεψε την ανώμαλη έκφραση αυτών των πρωτεϊνών.

Το CDR1AS είναι μια αντιπληροφοριακή πρωτεΐνη 1 που σχετίζεται με τον εκφυλισμό της παρεγκεφαλίδας, που ανήκει στην κατηγορία των κυκλικών RNA. Εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στον ανθρώπινο εγκέφαλο, το νωτιαίο μυελό, την καρδιά, τους πνεύμονες, τον θύμο αδένα και τον θυρεοειδή. Οι μεταβολικές διαταραχές και το αυξημένο οξειδωτικό στρες είναι κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας του μυοκαρδίου. Έχουν διερευνηθεί οι επιδράσεις του CDR1as στη μιτοχονδριακή λειτουργία και το οξειδωτικό στρες σε ποντικούς με έμφραγμα του μυοκαρδίου και υποξικά νεογνικά καρδιομυοκύτταρα ποντικού (NMCMs). Τα δεδομένα έδειξαν ότι το επίπεδο της συνολικής κυτταρικής παραγωγής ROS και μιτοχονδρίων ROS αυξήθηκε σε NMCM που υποβλήθηκαν σε αγωγή με υποξία, το οποίο αποκαταστάθηκε εν μέρει, αλλά σημαντικά αποκαταστάθηκε σε κύτταρα προεπεξεργασμένα με si-CDR1as Έχει βρεθεί ότι τόσο το ZFAS1 όσο και το CDR1AS είναι σε αφθονία στο μυοκάρδιο και στο αίμα, σύμφωνα με τις τιμές Ct από προσδιορισμούς qPCR και είναι καλοί προγνωστικοί

δείκτες του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Παρά το γεγονός ότι τα επίπεδά τους στο αίμα μεταβάλλονται με αντίστροφο τρόπο, ο συνδυασμός των δύο μπορεί να κάνει την πρόβλεψη πιο έγκυρη.

Οι αμοιβαίες αλλαγές των κυκλοφορούντων ZFAS1 και CDR1AS προβλέπουν ανεξάρτητα το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και μπορεί να θεωρηθούν νέοι βιοδείκτες του οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. [183, 184]

6.2.1.3 HOTAIR

Το αντιπληροφοριακό μη κωδικοποιητικό RNA lncRNA HOX (HOTAIR), ένα lncRNA 2,2 kb που μεταγράφηκε από τον τόπο HOXC, περιγράφηκε αρχικά για να μειώσει την έκφραση του γονιδίου HOXD μέσω της στρατολόγησης πολυκομβικού συμπλόκου καταστολής 2 (PRC2) για την τριμεθυλίωση της ιστόνης H3 (H3K27). Μέχρι στιγμής, το HOTAIR έχει αποδειχθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη διαφόρων περίπλοκων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού, του καρκίνου του παχέος εντέρου, του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος του οισοφάγου και της καρδιακής νόσου. Επιπλέον, το HOTAIR έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζεται από την υποξία και ότι ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, τη μετανάστευση και την εισβολή. Ο ρόλος του HOTAIR στο καρδιακό σύστημα έχει σταδιακά αναγνωριστεί, το HOTAIR αναφέρθηκε ότι ρυθμίζεται σημαντικά προς τα πάνω στα καρδιομυοκύτταρα από σηπτικά ποντίκια και ως προς τα κάτω σε ένα μοντέλο καρδιακής υπερτροφίας σε ποντίκια, το HOTAIR βρέθηκε επίσης μειωμένο σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια από RNA-seq δεδομένα.

Σε μελέτη που έγινε σε 50 εγγεγραμμένους ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης του HOTAIR στον ορό και αναλύθηκε η συσχέτισή του με την έκφραση της καρδιακής τροπονίνης I (cTnI). Άλλα 50 άτομα με αντιστοιχία ηλικίας και φύλου χρησίμευσαν ως υγιείς μάρτυρες. Στη συνέχεια, η έκφραση HOTAIR ανιχνεύθηκε στον ορό από ποντικούς C57BL/6J που υποβλήθηκαν σε απολίνωση της στεφανιαίας αρτηρίας και σε καρδιομυοκύτταρα νεογνών αρουραίου που προκλήθηκαν από υποξία. Η μελέτη αυτή αποκάλυψε ότι η έκφραση HOTAIR μειώθηκε σημαντικά στον ορό ασθενών με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου σε σύγκριση με αυτόν των υγιών μαρτύρων. Ομοίως, παρατηρήθηκε ότι το HOTAIR ρυθμίστηκε προς τα κάτω στον ορό ποντικών που υποβλήθηκαν σε απολίνωση της στεφανιαίας αρτηρίας και σε καλλιιεργημένα καρδιομυοκύτταρα που εκτέθηκαν σε υποξία. Τα αποτελέσματα της μελέτης οδήγησαν στο

συμπέρασμα ότι το HOTAIR είναι ένας προστατευτικός παράγοντας για τα καρδιομυοκύτταρα και ότι η συγκέντρωση του HOTAIR στο πλάσμα μπορεί να χρησιμεύσει ως βιοδείκτης για τη διάγνωση οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου στον άνθρωπο. [185]

6.2.1.4 KCNQ1OT1

Το KCNQ1OT1 ρυθμίζει την έκφραση KCNQ1, της οποίας η ανεπάρκεια προκαλεί συγγενές long-QT σύνδρομο που μπορεί να προκαλέσει αρρυθμίες. Το KCNQρι δρα σε επιγενετικό επίπεδο και προάγει το σχηματισμό της κατασταλτικής δομής της χρωματίνης και εμπλέκεται στην καρδιακή ανάπτυξη. Πολλές έρευνες έχουν αποδείξει την εμπλοκή του KCNQ1 (Kcnq1ot1) σε καρδιακές παθήσεις. Το Kcnq1ot1 μεσολαβεί στη διαμόρφωση της χρωματίνης και το Kcnq1 στην αναπτυσσόμενη καρδιά. Επιπλέον, το KCNQ1OT1 ρυθμίστηκε προς τα πάνω σε ασθενείς με EM και η σίγαση KCNQ1OT1 αποδείχθηκε ότι προστατεύει από την κυτταρική απόπτωση από τραυματισμό σε περιστατικά ισχαιμίας του μυοκαρδίου/επαναιμάτωσης μετά από EM. Ακόμα υπάρχουν αναφορές ότι τα lncRNA ρυθμίζουν την έκφραση των αγγελιαφόρων RNA (mRNAs) μέσω ανταγωνιστικού ρυθμιστικού δικτύου ενδογενούς RNA (ceRNA) σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. [186]

6.2.1.5 ANRIL

Στα πλαίσια έρευνας που είχε ως στόχο την αξιολόγηση τραυματισμού που προκαλείται από υποξία, προσδιορίζοντας τη βιωσιμότητα, τη μετανάστευση, την εισβολή και την απόπτωση των κυττάρων H9c2 σε διαφορετικές συνθήκες, αντίστοιχα. Οι γονιδιακές εκφράσεις αξιολογήθηκαν με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο ή ανάλυση western blot, όπως απαιτείται. Ανοσοκαταβύθιση RNA και αναλύσεις αναφοράς λουσιφεράσης εφαρμόστηκαν για να επιβεβαιώσουν τις συσχετίσεις μεταξύ των γονιδίων. Αποτελέσματα: Η έκφραση ANRIL ενισχύθηκε δραματικά σε κύτταρα H9c2 που έχουν τραυματιστεί από υποξία και η αποσιώπηση του ANRIL επιδείνωσε τον τραυματισμό των κυττάρων H9c2 που προκαλείται από υποξία.

Για να διερευνήσουμε εάν το ANRIL έπαιξε ρόλο στον τραυματισμό των κυττάρων H9c2 που προκαλείται από την υποξία, σιώσαμε την έκφραση ANRIL στα κύτταρα H9c2 χρησιμοποιώντας το shANRIL. Τα ακόλουθα αποτελέσματα έδειξαν ότι η καταστροφή του ANRIL κατέστειλε περαιτέρω τη βιωσιμότητα, τη μετανάστευση και την εισβολή, ενώ αύξησε την κυτταρική απόπτωση σε κύτταρα H9c2 που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με υποξία. Εκτός από αυτό, η μείωση του ANRIL ρύθμιζε περαιτέρω την έκφραση των

προαποπτωτικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένου του Bax, της διασπασμένης κασπάσης-3 και της διασπασμένης κασπάσης-9, καθώς και μια εμφανής μείωση της έκφρασης Bcl-2, εν τω μεταξύ. Με άλλα λόγια, το knockdown ANRIL επιδεινώνει τον τραυματισμό που προκαλείται από την υποξία.

Το ANRIL είναι ένα lncRNA που ανακαλύφθηκε πρόσφατα και συσχετίστηκε σταθερά με καρδιαγγειακές παθήσεις καθώς και με άλλες ανθρώπινες ασθένειες όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης κ.α. Εκτός από αυτό, ο σημαντικός ρόλος του μη φυσιολογικού ANRIL σε καρδιαγγειακά περιστατικά, συμπεριλαμβανομένου του ΕΜ έχει επίσης αποκαλυφθεί από διάφορες μελέτες. Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος του ANRIL στον τραυματισμό του μυοκαρδίου που προκαλείται από υποξία ή στον έμφραγμα του μυοκαρδίου δεν έχει γίνει κατανοητός. Σε μελέτη που είχε ως στόχο την αξιολόγηση τραυματισμού που προκαλείται από υποξία, προσδιορίζοντας τη βιωσιμότητα, τη μετανάστευση, την εισβολή και την απόπτωση των κυττάρων H9c2 σε διαφορετικές συνθήκες παρατηρήθηκε σημαντική ανοδική ρύθμιση του ANRIL σε υποξικά κύτταρα H9c2 και η αποσιώπηση του ANRIL επιδείνωσε τον τραυματισμό των κυττάρων H9c2 που προκαλείται από υποξία. Η αποσιώπηση του ANRIL κατέστειλε περαιτέρω τη βιωσιμότητα, τη μετανάστευση και την εισβολή, ενώ αύξησε την κυτταρική απόπτωση σε κύτταρα H9c2 που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με υποξία. Εκτός από αυτό, η μείωση του ANRIL ρύθμιζε περαιτέρω την έκφραση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένου του Bax, της διασπασμένης κασπάσης-3 και της διασπασμένης κασπάσης-9, καθώς και μια εμφανής μείωση της έκφρασης Bcl-2. Το συμπέρασμα είναι ότι η εξάλειψη του ANRIL επιδεινώνει τον τραυματισμό που προκαλείται από την υποξία. Παρατηρήθηκε ακόμα ότι το ANRIL ρύθμιζε θετικά την έκφραση της sirtuin 1 (SIRT1) μέσω ανταγωνιστικής δέσμευσης με miR-7-5p. Επιπλέον, η αναστολή του miR-7-5p εξουδετέρωσε τον τραυματισμό της εξάντλησης του ANRIL στα υποξικά κύτταρα H9c2, ενώ, η αναγκαστική έκφραση SIRT1 μείωσε την επίδραση που προάγει τον τραυματισμό της ανοδικής ρύθμισης του miR-7-5p στα υποξικά κύτταρα H9c2. Συμπερασματικά προκύπτει ότι το ANRIL παίζει προστατευτικό ρόλο στον τραυματισμό των κυττάρων H9c2 που προκαλείται από υποξία μέσω της διαμόρφωσης του άξονα miR-7-5p/SIRT1, υποδηλώνοντας τις μεγάλες δυνατότητες του ANRIL ως πιθανό βιοδείκτη για το AMI. [187,188]

6.2.1.6 MHRT

Είναι ευρέως γνωστό ότι τα υψηλά επίπεδα καρδιακών κυτταρικών βλαβών που προκαλούνται από τα ενεργά είδη οξυγόνου (ROS) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην

παθογένεση πολλών καρδιακών παθήσεων συμπεριλαμβανομένου του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου. Πρόσφατες μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι τα ROS, όπως το υπεροξείδιο και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές έκφρασης πολλαπλών γονιδίων και είναι εν μέρει υπεύθυνα για τη μεσολάβηση του ROS καρδιακού κυτταρικού τραυματισμού. Επί του παρόντος, οι επιδράσεις των ROS στην έκφραση του lncRNA και οι ρόλοι των lncRNAs σε τραυματισμό που προκαλείται από ROS στα καρδιακά μυοκύτταρα είναι αβέβαιοι. Στα πλαίσια μελέτης, δημιουργήθηκε ένα μοντέλο οξειδωτικού στρες που προκαλείται από το H_2O_2 σε καρδιομυοκύτταρα αρουραίου και βρέθηκε ότι η έκθεση σε H_2O_2 οδήγησε σε αυξημένη έκφραση του MHRT στα καρδιομυοκύτταρα. Επιπλέον, διερευνήθηκε η πιθανή προστατευτική επίδραση του MHRT στο οξειδωτικό στρες που προκαλείται από H_2O_2 σε καρδιομυοκύτταρα αρουραίου *in vitro*, και φάνηκε ότι το lncRNA MHRT είναι ένας προστατευτικός παράγοντας για τα καρδιομυοκύτταρα και η συγκέντρωση του MHRT στο πλάσμα μπορεί να χρησιμεύσει ως βιοδείκτης για τη διάγνωση του εμφράγματος του μυοκαρδίου σε ανθρώπους με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. [189]

6.2.1.7 UCA1

Το UCA1 εντοπίστηκε αρχικά στο καρκίνωμα μεταβατικών κυττάρων της ανθρώπινης ουροδόχου κύστης και εκφράστηκε σε μεγάλο βαθμό στον καρκίνο του πνεύμονα. Σε φυσιολογικές καταστάσεις, το UCA1 εκφράζεται μόνο στην καρδιά και τον σπλήνα μετά τη γέννηση και υψηλότερη έκφραση στην καρδιά, γεγονός που δίνει μια υποψία ότι θα μπορούσε να είναι βιοδείκτης για καρδιακές παθήσεις όπως το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η άνω εικασία, διενεργήθηκε έρευνα, κατά την οποία ανιχνεύτηκε το επίπεδο του UCA1 στο πλάσμα ασθενών με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και πλάσμα υγιών ατόμων με χρήση της μεθόδου της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής-πολυμεράσης (qRT-PCR). Επιπλέον, ελέγχθηκε το επίπεδο του miR-1 καθώς αναφέρεται ότι ρυθμίζει την έκφραση του UCA1. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το επίπεδο της UCA1 στο πλάσμα μειώνεται στην πρώιμη κατάσταση των ασθενών με OEM και αυξάνεται την ημέρα 3 μετά την OEM. Επιπλέον, η μεταβολή του UCA1 σχετίζεται αντιστρόφως με την έκφραση του miR-1. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι το κυκλοφορούν UCA1 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένας πολλά υποσχόμενος νέος βιοδείκτης για τη διάγνωση και/ή την πρόγνωση του AMI. Επιπλέον, πρόσφατη μελέτη δείχνει ότι το UCA1 επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και την κατανομή του κυτταρικού κύκλου του καρκίνου του παχέος εντέρου και ότι το UCA1 θα μπορούσε να προστατεύσει τα καρδιομυοκύτταρα από την επαγόμενη

από το H₂O₂ απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων. Η υποξία ή η απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων που προκαλείται από την επανοξυγόνωση είναι μία από τις κύριες αιτίες της OEM, υποδεικνύοντας ότι το UCA1 μπορεί να είναι ο προγνωστικός βιοδείκτης για τη διάγνωση και/ή την πρόγνωση του OEM. [190,191]

Άλλα lncRNA για τα οποία έχει προκύψει από μελέτες ότι θα μπορούσαν να είναι βιοδείκτες για το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου είναι τα H19, MALAT και LIPCAR, τα οποία αναλύθηκαν στην ενότητα 6.1

Κεφάλαιο 7: Συμπεράσματα - Συζήτηση

Στις μέρες μας τα καρδιαγγειακά νοσήματα (CVD) εξακολουθούν να αποτελούν την κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως. Ο έγκαιρος εντοπισμός των ατόμων που επηρεάζονται περισσότερο από CVD και η λήψη κατάλληλης θεραπείας μπορεί να βοηθήσει στη μείωση της θνησιμότητας από καρδιαγγειακές νόσους. Καθοριστικής σημασίας είναι η ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών και βιοδεικτών με δυνατότητα πρόβλεψης της εξέλιξης της νόσου.

Το 2012 η Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE), έδωσε μια νέα ερμηνεία αυτού που θεωρείται λειτουργική περιοχή του ανθρώπινου γονιδιώματος και αυτό λόγω της ανακάλυψης ότι τα κωδικοποιητικά μεταγραφήματα (δηλαδή mRNA) δεν αντιπροσωπεύουν περισσότερο από το 3% του γονιδιώματος, ενώ όλα τα υπόλοιπα αφορούν μεταγραφές που έχουν μικρή ή καθόλου ικανότητα σύνθεσης πρωτεΐνης. Τα τελευταία είναι γνωστά ως μη κωδικοποιητικά RNA (ncRNAs) και για πάρα πολύ καιρό παραμελήθηκαν επειδή θεωρούνταν ως «σκουπίδια του DNA», «θόρυβος μεταγραφής» ή «σκοτεινή ύλη του γονιδιώματος». Φαίνεται όμως πως τα ncRNA δεν απλώς λειτουργικά και ενεργά, αλλά κατέχουν βασική θέση στα ρυθμιστικά δίκτυα έκφρασης γονιδίων σε επιγενετικό, μεταγραφικό, ακόμη και μετα-μεταγραφικό επίπεδο.

Τα lncRNAs ανήκουν στην περίπτωση αυτή και μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση γονιδίων σε πολλαπλά επίπεδα. Ωστόσο, τα lncRNAs έχουν τραβήξει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας και οι πληροφορίες για αυτά, συμπεριλαμβανομένης της δυνατότητάς τους ως βιοδείκτη είναι ακόμα περιορισμένες. Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων LncRNA Disease v2.0 υπάρχουν περισσότερες από 205.959 συσχετίσεις μεταξύ lncRNA και διαφόρων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων CVD. Παρόλο που οι έρευνες για την κατανόηση του ρόλου των lncRNAs επιταχύνονται, υπάρχουν ακόμα πολλά σημεία που πρέπει να διευκρινηθούν και σε αυτή την κατεύθυνση γίνονται προσπάθειες για να αποσαφηνιστεί ο ρόλος των lncRNAs ως πιθανών ρυθμιστών σε διάφορες βιολογικές και παθολογικές διεργασίες. Η κατανόηση του ρόλου των lncRNA στη ρύθμιση των αλληλεπιδράσεων ξενιστή-παθογόνου εικάζεται ότι θα μπορούσε να χρησιμεύσει στον εντοπισμό διαφορετικών lncRNA, που θα είναι δυνητικά νέοι βιοδείκτες. (Πίνακας 1)

Γνωρίζουμε ότι αρκετά lncRNA είναι υπεύθυνα για τη διεξαγωγή των λειτουργιών των ECs, VSMCs, αγγειακής φλεγμονής και κυτταρικού μεταβολισμού, η απορρύθμιση της έκφρασης συγκεκριμένων μη κωδικοποιημένων μακρών μεταγραφών εμπλέκεται με την ανάπτυξη και την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης και, κατά συνέπεια, της CHD και αυτό έκανε αρκετούς ερευνητές να διερευνήσουν για πιθανούς βιοδείκτες. Στα πλαίσια αυτών των ερευνών έχει

βρεθεί πως τα υψηλά επίπεδα έκφρασης H19 συσχετίστηκαν με τη διάγνωση της ΣΝ και συνδέονταν με την υπερομοκυστεϊναιμία, έναν σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη της στεφανιαίας νόσου, και με πολυμορφισμούς συσχετιζόμενους με τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου. Το ANRIL lncRNA, είναι ένα ακόμη παράδειγμα μεταγραφής που επίσης έχει συσχετιστεί με την αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης της νόσου.]. Στα VSMCs, το lincRNA-p21 αναιρεί τη σύνδεση μεταξύ του p53), οδηγώντας στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και τελικά την απόπτωση που όμως έχει αποδειχθεί ότι έχει χαμηλή έκφραση στους ιστούς της στεφανιαίας αρτηρίας στα νοσούντα άτομα. Τα MIAT και MALAT1 φαίνεται να εμπλέκονται στην παθογένεση της στεφανιαίας νόσου και με βάση τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, και τα δύο lncRNA έδειξαν υψηλά επίπεδα έκφρασης στο πλάσμα σε άτομα με στεφανιαία νόσο. Ωστόσο, το MIAT έχει συσχετιστεί και με την αγγειακή ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και τα δεδομένα για το MALAT1 εξακολουθούν να είναι ασαφή.

Πίνακας 1: Δυνητικά νέοι lncRNA βιοδείκτες

lncRNA	CVDs
aHIF	MI
aHIF	CHD
APOA1-AS	CHD
AWPPH	CHD
CDR1-AS	MI
Coro Marker	CHD
H19	CHD, MI
HOTAIR	MI
KCNQ1OT1	MI
LIPCAR	CHD
MALAT1	CHD, MI
MHRT	MI

MIAT	CHD
SMILR	CHD
ZFAS1	MI
UCA1	MI

Σε μελέτες που έγιναν τα επίπεδα του H19 στον ορό των ασθενών με ΣΝ ήταν υψηλά και μάλιστα όχι μόνο σε σχέση με τα υγιή άτομα αλλά και σε σχέση με ασθενείς οι οποίοι είχαν κάποιον άλλο τύπο καρδιαγγειακής νόσου, που του προσδίδει μια εξειδίκευση. Ο ορός H19 φάνηκε να είναι ένας σταθερός, ειδικός και ακριβής διαγνωστικός δείκτης για τη στεφανιαία νόσο. Επίσης το H19 που εντοπίστηκε παρατηρήθηκε να έχει κάποια θετική συσχέτιση με το επίπεδο του TGF-β1 στο πλάσμα και το H19 υπερεκφράζεται, τότε ακολουθεί και μια σημαντική αύξηση στο επίπεδο πρωτεΐνης TGF-β1 στο HCAEC. Παρά το γεγονός ότι οι μελέτες είναι ακόμα περιορισμένης κλίμακας, υπάρχουν θετικές ενδείξεις οι οποίες θα άξιζαν περισσότερη διερεύνηση.

Σε μελέτη με σκοπό την αξιολόγηση lncRNAs σαν πιθανούς βιοδείκτες για το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου βρέθηκε ότι το **ZFAS1** και το **CDR1AS**, έδειξαν σημαντική διαφορική έκφραση μεταξύ ασθενών με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και υγιών ατόμων. Το κυκλοφορικό επίπεδο του ZFAS1 ήταν σημαντικά χαμηλότερο στο οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου από ό,τι σε άτομα χωρίς οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, ενώ το CDR1AS έδειξε τις αντίθετα αποτελέσματα με το επίπεδο στο αίμα του σημαντικά υψηλότερο στο οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και από αναλύσεις αυτά τα δύο lncRNA προσδιορίστηκαν ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες για το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου.

Τόσο το ZFAS1 όσο και το CDR1AS είναι σε αφθονία στο μυοκάρδιο και στο αίμα και είναι καλοί προγνωστικοί δείκτες του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Παρά το γεγονός ότι τα επίπεδά τους στο αίμα μεταβάλλονται με αντίστροφο τρόπο, ο συνδυασμός των δύο μπορεί να κάνει την πρόβλεψη πιο έγκυρη. Οι αμοιβαίες αλλαγές των κυκλοφορούντων ZFAS1 και CDR1AS μπορούν να προβλέψουν ανεξάρτητα το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και θα μπορούσαν να είναι νέοι βιοδείκτες του οξέως έμφραγμα του μυοκαρδίου.

Στα πλαίσια μελέτης, βρέθηκε ότι η έκθεση σε H₂O₂ οδήγησε σε αυξημένη έκφραση του **MHRT** στα καρδιομυοκύτταρα. Επιπλέον, διερευνήθηκε η πιθανή προστατευτική επίδραση του MHRT στο οξειδωτικό στρες που προκαλείται από H₂O₂ σε καρδιομυοκύτταρα αρουραίου in vitro, και φάνηκε ότι το lncRNA MHRT είναι ένας προστατευτικός παράγοντας για τα καρδιομυοκύτταρα και η συγκέντρωση του MHRT στο πλάσμα μπορεί να χρησιμεύσει

ως βιοδείκτης για τη διάγνωση του εμφράγματος του μυοκαρδίου σε ανθρώπους με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου.

Μελλοντικές Κατευθύνσεις

Γενικά πιστεύεται ότι η βιομηχανία βιοδεικτών θα συνεχίσει να επεκτείνεται γρήγορα και ανθίζει στο εγγύς μέλλον. Η αναπτυσσόμενη έρευνα στην ανάπτυξη βιοδεικτών απαιτεί μια συστηματική οργάνωση δεδομένων με τη χρήση τυποποιημένης ταξινόμησης που διευκολύνει τη διαδικτυακή κοινή χρήση μεταδεδομένων βιοδεικτών μεταξύ των ερευνητών. Απαιτούνται μεγάλες επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες για την αξιολόγηση της σχέσης κόστους-αποτελεσματικότητας των βιοδεικτών. Η διαλογή βιοδεικτών κρίνεται απαραίτητη λόγω του περιορισμένου προϋπολογισμού κονδυλίων για την υγεία και μόνο εκείνοι που παρουσιάζουν τέλεια χαρακτηριστικά θα χρησιμοποιηθούν σε εγκαταστάσεις πρωτοβάθμιας περίθαλψης. Είναι πιθανό ότι ορισμένοι βιοδείκτες μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως μη συνταγογραφούμενες δοκιμές καθώς το κοινό συνεχίζει το ενδιαφέρον για την ενημέρωσή του σε σχέση με την υγεία του. Βιοδείκτες που είναι οικονομικά αποδοτικοί για την πρόληψη όψιμων συνεπειών της καρδιαγγειακής νόσου πιθανότατα θα επιβιώσει από αυτό τον ανταγωνισμό. Διαγνωστικοί δείκτες θα βρουν χρήση σε δοκιμές ακριβώς στο σημείο της φροντίδας σε τμήματα επειγόντων περιστατικών και δίπλα στο κρεβάτι του ασθενούς. Βιοδείκτες που αποδίδουν καλά και οικονομικά στις δοκιμή του γρήγορης διαλογής και εκείνες που βοηθούν στη διαλογή των ασθενών σε θεραπεία χαμηλού και υψηλού κινδύνου θα ενσωματωθούν στα πρωτόκολλα κλινικής λήψης αποφάσεων. Βιοδείκτες (συμπεριλαμβανομένων των φαρμακογενετικών) που διευκολύνουν την επιλογή του καταλληλότερου φαρμάκου, αυτοί επιτρέπουν στον καθορισμό της δοσολογίας του φαρμάκου για την αποφυγή παρενεργειών και τη μεγιστοποίηση των θεραπευτικών αποτελεσμάτων είναι πιθανό να είναι ελκυστικοί για τους κλινικούς γιατρούς. Η ανάπτυξη βιοδεικτών πρέπει να πηγαίνει παράλληλα με ταυτόχρονες εξελίξεις στην εκπαίδευση των ιατρών για να μπορούν να χρησιμοποιούν τη γκάμα των διαθέσιμων βιοδεικτών, ώστε οι κλινικοί γιατροί να μπορούν να ζητούν τις κατάλληλες εξετάσεις και να είναι σε θέση να ερμηνεύσουν σωστά τα αποτελέσματά τους. Παράλληλες εξελίξεις πρέπει να συμβούν και στα ιατρικά πληροφοριακά συστήματα, στις διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου εντός κλινικών εργαστηρίων και σε την ερμηνευτική αναφορά δοκιμών βιοδεικτών. Η έλευση των γονιδιωματικών βιοδεικτών έχει δημιούργησε έναν αριθμό ηθικών 411 και κανονιστικών

θεμάτων 412 που πρέπει να αντιμετωπιστούν ταυτόχρονα. Τελικά, η εξέλιξη των βιοδεικτών CVD θα αντιπροσωπεύει το συντονισμένη και εναρμονισμένη προσπάθεια βασικών επιστημόνων, κλινικών ιατρών, ειδικών τεχνολογίας, επιδημιολόγων, στατιστικολόγων, ομοσπονδιακών και βιομηχανικών χορηγών και ρυθμιστικών φορέων στο πλαίσιο της συνεργασίας.

Βιβλιογραφία

1. World Health Organization, Cardiovascular diseases (CVDs), 11 June 2021
[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
2. Ανδρέας Σκορίλας, Κλινική Βιοχημεία και Μοριακή Διαγνωστική-Βασικές Αρχές και Σύγχρονες Προσεγγίσεις, 2020, BROKEN HILL PUBLISHERS LTD
3. Sary HC, Chandler AB, Glagov S, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:840-856.
4. Herbert C. Sary, A. Bleakley Chandler, Robert E. Dinsmore, Valentin Fuster, Seymour Glagov, William Insull Jr, Michael E. Rosenfeld, Colin J. Schwartz, William D. Wagner and Robert W. Wissler. 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, 1 Sep 1995
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.92.5.1355>, *Circulation*. 1995;92:1355–1374
5. James A. de Lemos and Torbjørn Omland, Chronic Coronary Artery Disease,
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42880-4.00004-2>
6. Bäck M, Gasser TC, Michel JB, et al.: Biomechanical factors in the biology of aortic wall and aortic valve diseases, *Cardiovasc Res* 99:232–241, 2013.
7. Kwak BR, Bäck M, Bochaton-Piallat ML, et al.: Biomechanical factors in atherosclerosis: mechanisms and clinical implications, *Eur Heart J* 35:3013–3020, 2014. 3020a–3020d.
8. Bäck M, Weber C, Lutgens E: Regulation of atherosclerotic plaque inflammation, *J Intern Med* 278:462–482, 2015.
9. Shi GP, Bot I, Kovanen PT: Mast cells in human and experimental cardiometabolic diseases, *Nat Rev Cardiol* 12:643–658, 2015.
10. Hansson GK, Hermansson A: The immune system in atherosclerosis, *Nat Immunol* 12:204–212, 2011.
11. Spitz C, Winkels H, Burger C, et al.: Regulatory T cells in atherosclerosis: critical immune regulatory function and therapeutic potential, *Cell Mol Life Sci* 73:901–922, 2016.
12. Gisterå A, Robertson AK, Andersson J, et al.: Transforming growth factor-beta signaling in T cells promotes stabilization of atherosclerotic plaques through an interleukin-17-dependent pathway, *Sci Transl Med* 5:196ra100, 2013.
13. Seimon T, Tabas I: Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis, *J Lipid Res* 50(Suppl):S382–S387, 2009.
14. Serhan CN: Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology, *Nature* 510:92–101, 2014.
15. Michel JB, Thauinat O, Houard X, et al.: Topological determinants and consequences of adventitial responses to arterial wall injury, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:1259–1268, 2007.
16. Weih F, Grabner R, Hu D, et al.: Control of dichotomic innate and adaptive immune responses by artery tertiary lymphoid organs in atherosclerosis, *Front Physiol* 3:226, 2012.

17. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, et al.: NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals, *Nature* 464:1357–1361, 2010.
18. Rajamaki K, Lappalainen J, Oömi K, et al.: Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation, *PLoS One* 5:e11765, 2010.
19. Bäck M, Hansson GK: Anti-inflammatory therapies for atherosclerosis, *Nat Rev Cardiol* 12:199–211, 2015.
20. Ridker PM: From C-reactive protein to interleukin-6 to interleukin-1: moving upstream to identify novel targets for atheroprotection, *Circ Res* 118:145–156, 2016.
21. Libby P, Ridker PM: Inflammation and atherosclerosis: role of C-reactive protein in risk assessment, *Am J Med* 116(Suppl 6A):9S–16S, 2004.
22. van der Vorst EP, Döring Y, Weber C: Chemokines, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35:e52–e56, 2015.
23. Burke JE, Dennis EA: Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling, *J Lipid Res (Suppl)*:S237–S242, 2009.
24. Suckling KE: Phospholipase A2 inhibitors in the treatment of atherosclerosis: a new approach moves forward in the clinic, *Expert Opin Investig Drugs* 18:1425–1430, 2009.
25. Rosenson RS, Hurt-Camejo E: Phospholipase A2 enzymes and the risk of atherosclerosis, *Eur Heart J* 33:2899–2909, 2012.
26. Capra V, Bäck M, Angiolillo DJ, et al.: Impact of vascular thromboxane prostanoid receptor activation on hemostasis, thrombosis, oxidative stress, and inflammation, *J Thromb Haemost* 12:126–137, 2014.
27. Bäck M, Yin L, Ingelsson E: Cyclooxygenase-2 inhibitors and cardiovascular risk in a nation-wide cohort study after the withdrawal of rofecoxib, *Eur Heart J* 33:1928–1933, 2012.
28. Bäck M, Dahlen SE, Drazen JM, et al.: International Union of Basic and Clinical Pharmacology.LXXXIV: leukotriene receptor nomenclature, distribution, and pathophysiological functions, *Pharmacol Rev* 63:539–584, 2011.
29. Bäck M, Hansson GK: Leukotriene receptors in atherosclerosis, *Ann Med* 38:493–502, 2006.
30. Bäck M: Inhibitors of the 5-lipoxygenase pathway in atherosclerosis, *Curr Pharm Des* 15:3116–3132, 2009.
31. Ingelsson E, Yin L, Bäck M: Nationwide cohort study of the leukotriene receptor antagonist montelukast and incident or recurrent cardiovascular disease, *J Allergy Clin Immunol* 129:702–707, 2012. e2.
32. Brezinski DA, Nesto RW, Serhan CN: Angioplasty triggers intracoronary leukotrienes and lipoxin A4. Impact of aspirin therapy, *Circulation* 86:56–63, 1992.
33. Van Noolen L, Bäck M, Arnaud C, et al.: Docosahexaenoic acid supplementation modifies fatty acid incorporation in tissues and prevents hypoxia induced-atherosclerosis progression in apolipoprotein-E deficient mice, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 91:111–117, 2014.
34. Laguna-Fernandez A, Petri M, Thul S, et al.: In Steinhilber D, editor: *Lipoxygenases in Inflammation*, Springer, Switzerland, 2016, http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-27766-0_6.
35. Petri MH, Laguna-Fernandez A, Gonzalez-Diez M, et al.: The role of the FPR2/ALX receptor in atherosclerosis development and plaque stability, *Cardiovasc Res* 105:65–74, 2015.

36. Bäck M, Powell WS, Dahlen SE, et al.: Update on leukotriene, lipoxin and oxoeicosanoid receptors: IUPHAR Review 7, Br J Pharmacol 171:3551–3574, 2014.
37. Drechsler M, de Jong R, Rossaint J, et al.: Annexin A1 counteracts chemokine-induced arterial myeloid cell recruitment, Circ Res 116:827–835, 2015.
38. Fredman G, Kamaly N, Spolitu S, et al.: Targeted nanoparticles containing the proresolving peptide Ac2-26 protect against advanced atherosclerosis in hypercholesterolemic mice, Sci Transl Med 7, 2015. 275ra20.
39. Petri MH, Laguna-Fernandez A, Tseng CN, et al.: Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A(4) signals through FPR2/ALX in vascular smooth muscle cells and protects against intimal hyperplasia after carotid ligation, Int J Cardiol 179:370–372, 2015.
40. ORIGIN Trial Investigators, Bosch J, Gerstein H, et al.: n-3 fatty acids and cardiovascular outcomes in patients with dysglycemia, N Engl J Med 367:309–318, 2012.
41. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, et al.: Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome, Nature 440:237–241, 2006.
42. Ridker PM, Thuren T, Zalewski A, et al.: Interleukin-1beta inhibition and the prevention of recurrent cardiovascular events: rationale and design of the Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS), Am Heart J 162:597–605, 2011.
43. Adamson PD, Newby DE, Dweck MR: Translational coronary atherosclerosis imaging with PET, Cardiol Clin 34:179–186, 2016.
44. Reference Values for Arterial Stiffness Collaboration: Determinants of pulse wave velocity in healthy people and in the presence of cardiovascular risk factors: “establishing normal and reference values,” Eur Heart J 31:2338–2350, 2010
45. Demer LL, Tintut Y: Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease, Circulation 117:2938–2948, 2008.
46. Krohn JB, Hutcheson JD, Martinez-Martinez E, et al.: Extracellular vesicles in cardiovascular calcification: expanding current paradigms, J Physiol 594(11):2895–2903, 2016.
47. Miller JD, Weiss RM, Heistad DD: Calcific aortic valve stenosis: methods, models, and mechanisms, Circ Res 108:1392–1412, 2011.
48. Massague J, Wotton D: Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system, EMBO J 19:1745–1754, 2000.
49. Schurgers LJ, Uitto J, Reutelingsperger CP: Vitamin K-dependent carboxylation of matrix Glaprotein: a crucial switch to control ectopic mineralization, Trends Mol Med 19:217–226, 2013.
50. Brandenburg VM, Schurgers LJ, Kaesler N, et al.: Prevention of vasculopathy by vitamin K supplementation: can we turn fiction into fact? Atherosclerosis 240:10–16, 2015.
51. Sandberg WJ, Yndestad A, Øie E, et al.: Enhanced T-cell expression of RANK ligand in acute coronary syndrome: possible role in plaque destabilization, Arterioscler Thromb Vasc Biol 26:857–863, 2006.
52. Ovchinnikova O, Gylfe A, Bailey L, et al.: Osteoprotegerin promotes fibrous cap formation in atherosclerotic lesions of ApoE-deficient mice—brief report, Arterioscler Thromb Vasc Biol 29:1478–1480, 2009.

53. Bennett BJ, Scatena M, Kirk EA, et al.: Osteoprotegerin inactivation accelerates advanced atherosclerotic lesion progression and calcification in older ApoE^{-/-} mice, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:2117–2124, 2006.
54. Panizo S, Cardus A, Encinas M, et al.: RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway, *Circ Res* 104:1041–1048, 2009.
55. Zhou S, Fang X, Xin H, et al.: Osteoprotegerin inhibits calcification of vascular smooth muscle cell via down regulation of the Notch1-RBP-Jkappa/Msx2 signaling pathway, *PLoS One* 8:e68987, 2013.
56. Hansson GK, Libby P, Tabas I: Inflammation and plaque vulnerability, *J Intern Med* 278:483–493, 2015.
57. Michel JB, Martin-Ventura JL, Nicoletti A, et al.: Pathology of human plaque vulnerability: mechanisms and consequences of intraplaque haemorrhages, *Atherosclerosis* 234:311–319, 2014.
58. Bäck M, Ketelhuth DF, Agewall S: Matrix metalloproteinases in atherothrombosis, *Prog Cardiovasc Dis* 52:410–428, 2010.
59. Falk E, Nakano M, Bentzon JF, et al.: Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view, *Eur Heart J* 34:719–728, 2013.
60. Raman SV, Winner MW 3rd, Tran T, et al.: In vivo atherosclerotic plaque characterization using magnetic susceptibility distinguishes symptom-producing plaques, *JACC Cardiovasc Imaging* 1:49–57, 2008.
61. Hennekens CH, Gaziano JM. Antioxidants and heart disease: Epidemiology and clinical evidence. *Clin Cardiol* 1993;16 4 Suppl 1:110-3.
62. 2. Baradaran A. Lipoprotein(a), type 2 diabetes and nephropathy; the mystery continues. *J Nephropathol* 2012;1:126-9.
63. Ross R. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease”. *New England Journal of Medicine*. 1999;340:115-26.
64. Rahimi Z. ACE insertion/deletion (I/D) polymorphism and diabetic nephropathy. *J Nephropathol* 2012;1:143-51.
65. Tavafi M. Complexity of diabetic nephropathy pathogenesis and design of investigations. *J Renal Inj Prev* 2013;2:61-5.
66. Nayer A, Ortega LM. Catastrophic antiphospholipid syndrome: Aclinical review. *J Nephropathol* 2014;3:9-17.
67. Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest* 1992;90:1138-44.
68. Burke-Gaffney A, Brooks AV, Bogle RG. Regulation of chemokine expression in atherosclerosis. *Vascul Pharmacol* 2002;38:283-92.
69. Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:3883-7.
70. Corsini A, Bernini F, Quarato P, Donetti E, Bellosta S, Fumagalli R, et al. Non-lipid-related effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Cardiology* 1996;87:458-68

71. Behradmanesh S, Nasri P. Serum cholesterol and LDL-C n association with level of diastolic blood pressure in type 2 diabetic patients. *J Renal Inj Prev* 2012;1:23-6.
72. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: Current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med* 2011;17:1410-22.
73. Owen DR, Lindsay AC, Choudhury RP, Fayad ZA. Imaging of atherosclerosis. *Annu Rev Med* 2011;62:25-40.
74. Nayer A, Ortega LM. Catastrophic antiphospholipid syndrome: Aclinical review. *J Nephropathol* 2014;3:9-17.
75. Nasri H. Association of Ca ×PO₄ product with levels of serum C-reactive protein in regular hemodialysis patients. *J Renal Inj Prev* 2012;1:55-9.
76. Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003;170:191-203.
77. Nayer A, Asif A. Idiopathic membranous nephropathy and anti-phospholipase A2 receptor antibodies. *J Nephropathol* 2013;2:214-6.
78. RossR. The pathogenesis of atherosclerosis: Aerspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-9.
79. World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2010. WHO Press; Geneva, Switzerland: 2011
80. Pearson TA, Blair SN, Daniels SR, Eckel RH, Fair JM, Fortmann SP, Franklin BA, Goldstein LB, Greenland P, Grundy SM, Hong Y, Houston Miller N, Lauer RM, Ockene IS, Sacco RL, Sallis JF Jr, Smith SC Jr, Stone NJ, Taubert KA. AHA guidelines for primary prevention of cardiovascular disease and stroke: 2002 update: consensus panel guide to comprehensive risk reduction for adult patients without coronary or other atherosclerotic vascular diseases. *Circulation*. 2002; 106: 388–391
81. Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman WP, Tracy RE, Wattigney WA. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults: the Bogalusa Heart Study. *N Engl J Med*. 1998; 338: 1650–1656; Raitakari OT, Juonala M, Kahonen M, Taittonen L, Laitinen T, Maki-Torkko N, Jarvisalo MJ, Uhari M, Jokinen E, Ronnema T, Akerblom HK, Viikari JSA. Cardiovascular risk factors in childhood and carotid artery intima-media thickness in adulthood: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study
82. Psaty BM, Furberg CD, Kuller LH, Bild DE, Rautaharju PM, Polak JF, Bovill E, Gottdiener JS. Traditional risk factors and subclinical disease measures as predictors of first myocardial infarction in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Arch Intern Med*. 1999; 159: 1339–1347
83. Jokhadar M, Jacobsen SJ, Reeder GS, Weston SA, Roger VL. Sudden death and recurrent ischemic events after myocardial infarction in the community. *Am J Epidemiol*. 2004; 159: 1040–1046.
84. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001; 69: 89–95
85. Aronson JK, Ferner RE. (2017). Biomarkers-A General Review. *Curr Protoc Pharmacol*. 76:9.23.1-9.23.17. doi: 10.1002/cpph.19
86. Kyle Strimbu and Jorge A. Tavel (2010). What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*. 2010 Nov; 5(6): 463–466. doi: 10.1097/COH.0b013e32833ed177

87. Lesko LJ, Atkinson AJ. (2001). Use of biomarkers and surrogate endpoints in drug development and regulatory decision making: criteria, validation, strategies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 41:347-66. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.41.1.347
88. Cagney DN, Sul J, Huang RY, Ligon KL, Wen PY, Alexander BM. The FDA NIH Biomarkers, EndpointS, and other Tools (BEST) resource in neuro-oncology. *Neuro Oncol.* 2018 Aug 2;20(9):1162-1172. doi: 10.1093/neuonc/nox242. PMID: 29294069; PMCID: PMC6071649.
89. FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); Bethesda (MD): National Institutes of Health (US), www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/.
90. Ray P, Le Manach Y, Riou B, Houle TT. (2010). Statistical evaluation of a biomarker. *Anesthesiology.* 112(4):1023-40. doi: 10.1097/ALN.0b013e3181d47604.
91. Ramachandran S. Vasan, MD, Biomarkers of Cardiovascular Disease: Molecular Basis and Practical Considerations, *Circulation*, Volume 113, Number 19 <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.482570>
92. Patrick M Bossuyt 1, Johannes B Reitsma, David E Bruns, Constantine A Gatsonis, Paul P Glasziou, Les M Irwig, Jeroen G Lijmer, David Moher, Drummond Rennie, Henrica C W de Vet; Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy, Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative. *Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy*, PMID: 12507953 DOI: 10.1373/49.1.1
93. Lisa M McShane 1, Douglas G Altman, Willi Sauerbrei, Sheila E Taube, Massimo Gion, Gary M Clark; Statistics Subcommittee of the NCI-EORTC Working Group on Cancer Diagnostics, Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies, PMID: 16172462 DOI: 10.1200/JCO.2004.01.0454
94. A Wade, Derivation versus validation, PMID: 11087274, PMCID: PMC1718576 DOI: 10.1136/adc.83.6.459
95. J A Hanley, B J McNeil, The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve, PMID: 7063747, DOI: 10.1148/radiology.143.1.7063747
96. J A Swets , Measuring the accuracy of diagnostic systems, PMID: 3287615 DOI: 10.1126/science.3287615
97. J A Swets , Measuring the accuracy of diagnostic systems, PMID: 3287615 DOI: 10.1126/science.3287615
98. Stuart G Baker , The central role of receiver operating characteristic (ROC) curves in evaluating tests for the early detection of cancer, PMID: 12671018 DOI: 10.1093/jnci/95.7.511
99. M S Pepe, An interpretation for the ROC curve and inference using GLM procedures Affiliations expand, PMID: 10877289, DOI: 10.1111/j.0006-341x.2000.00352.x
100. Jonathan J Deeks 1, Douglas G Altman, Diagnostic tests 4: likelihood ratios Affiliations expand, PMID: 15258077, PMCID: PMC478236, DOI: 10.1136/bmj.329.7458.168
101. Frank Vitzthum 1, Fritz Behrens, N Leigh Anderson, John H Shaw, Proteomics: from basic research to diagnostic application. A review of requirements & needs Affiliations expand, PMID: 16083257, DOI: 10.1021/pr050080b

102. Newman TB, Browner WS, Cummings SR. Designing studies of medical tests. In: Hulley SB, Cummings SR, Browner WS, Grady D, Hearst N, Newman TB, eds. *Designing Clinical Research*. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins; 2001: 175–194.
103. Griner PF, Mayewski RJ, Mushlin AI, Greenland P. Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures: principles and applications. *Ann Intern Med*. 1981; 94: 557–592.
104. Lindholt JS, Juul S, Fasting H, Henneberg EW. Screening for abdominal aortic aneurysms: single centre randomised controlled trial. *BMJ*. 2005; 330: 750, DOI: 10.1136/bmj.38369.620162.82
105. Diamond GA, Denton TA, Berman DS, Cohen I. Prior restraint: a Bayesian perspective on the optimization of technology utilization for diagnosis of coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 1995; 76: 82–86. PMID: 7793413 DOI: 10.1016/s0002-9149(99)80809-1
106. Diamond GA, Kaul S. Prior convictions: Bayesian approaches to the analysis and interpretation of clinical megatrials. *J Am Coll Cardiol*. 2004; 43: 1929–1939. PMID: 15172393, DOI: 10.1016/j.jacc.2004.01.035
107. Fagan TJ. Nomogram for Bayes theorem. *N Engl J Med*. 1975; 293: 257. PMID: 1143310, DOI: 10.1056/NEJM197507312930513
108. Gail MH, Pfeiffer RM. On criteria for evaluating models of absolute risk. *Biostatistics*. 2005; 6: 227–239. PMID: 15772102, DOI: 10.1093/biostatistics/kxi005
109. van Houwelingen HC. Validation, calibration, revision and combination of prognostic survival models. *Stat Med*. 2000; 19: 3401–3415. PMID: 11122504, DOI: 10.1002/1097-0258(20001230)19:24<3401::aid-sim554>3.0.co;2-2
110. Justice AC, Covinsky KE, Berlin JA. Assessing the generalizability of prognostic information. *Ann Intern Med*. 1999; 130: 515–524. PMID: 10075620, DOI: 10.7326/0003-4819-130-6-199903160-00016
111. Lemeshow S, Hosmer DW Jr. A review of goodness of fit statistics for use in the development of logistic regression models. *Am J Epidemiol*. 1982; 115: 92–106. PMID: 7055134, DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a113284
112. Wilson PWF, D’Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*. 1998; 97: 1837–1847. PMID: 9603539, DOI: 10.1161/01.cir.97.18.1837
113. Wang TJ, Massaro JM, Levy D, Vasan RS, Wolf PA, D’Agostino RB, Larson MG, Kannel WB, Benjamin EJ. A risk score for predicting stroke or death in individuals with new-onset atrial fibrillation in the community: the Framingham Heart Study. *JAMA*. 2003; 290: 1049–1056. PMID: 12941677, DOI: 10.1001/jama.290.8.1049
114. Lee DS, Austin PC, Rouleau JL, Liu PP, Naimark D, Tu JV. Predicting mortality among patients hospitalized for heart failure: derivation and validation of a clinical model. *JAMA*. 2003; 290: 2581–2587. PMID: 14625335, DOI: 10.1001/jama.290.19.2581
115. Liu J, Hong Y, D’Agostino RB Sr, Wu Z, Wang W, Sun J, Wilson PWF, Kannel WB, Zhao D. Predictive value for the Chinese population of the Framingham CHD risk assessment tool compared with the Chinese Multi-provincial Cohort Study. *JAMA*. 2004; 291: 2591–2599. PMID: 15173150, DOI: 10.1001/jama.291.21.2591

116. Long non-coding RNAs: Biogenesis, functions, and clinical significance in gastric cancer Ying Liu,^{1,2,3} Wei Ding,⁴ Wanpeng Yu,² Yuan Zhang,³ Xiang Ao,^{1,2} and Jianxu Wang^{1,2}, *Molecular Therapy: Oncolytics* Vol. 23 December 2021 a 2021 The Author(s).<https://doi.org/10.1016/j.omto.2021.11.005>.
117. Liu, H., Wan, J., and Chu, J. (2019). Long non-coding RNAs and endometrial cancer. *Biomed. Pharmacother.* 119, 109396.<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109396>
118. Bermúdez, M., Aguilar-Medina, M., Lizárraga-Verdugo, E., Avendaño-Félix, M., Silva-Benítez, E., López-Camarillo, C., and Ramos-Payán, R. (2019). LncRNAs as regulators of autophagy and drug resistance in colorectal cancer. *Front. Oncol.* 9, 1008.
119. Wu, H., Yang, L., and Chen, L.L. (2017). The diversity of long noncoding RNAs and their generation. *Trends Genet.* 33, 540–552.<https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.05.004>
120. Begolli, R., Sideris, N., and Giakountis, A. (2019). LncRNAs as chromatin regulators in cancer: from molecular function to clinical potential. *Cancers* 11, 1524. <https://doi.org/10.3390/cancers11101524>
121. Zhang, F., Wang, H., Yu, J., Yao, X., Yang, S., Li, W., Xu, L., and Zhao, L. (2021). LncRNA CRNDE attenuates chemoresistance in gastric cancer via SRSF6-regulated alternative splicing of PICALM. *Mol. Cancer* 20, 6.
122. Zhang, X., Hong, R., Chen, W., Xu, M., and Wang, L. (2019). The role of long non-coding RNA in major human disease. *Bioorg. Chem.* 92, 103214.<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103214>
123. Alessio, E., Bonadio, R.S., Buson, L., Chemello, F., and Cagnin, S. (2020). A single cell but many different transcripts: a journey into the world of long non-coding RNAs. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 302.; <https://doi.org/10.3390/ijms21010302>
124. Gourvest, M., Brousset, P., and Bousquet, M. (2019). Long noncoding RNAs in acute myeloid leukemia: functional characterization and clinical relevance. *Cancers* 11, 1638.
125. Wilusz, J.E., Freier, S.M., and Spector, D.L. (2008). 3' end processing of a long nuclear-retained noncoding RNA yields a tRNA-like cytoplasmic RNA. *Cell* 135, 919–932.<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.012>
126. Chen, L.L. (2016). The biogenesis and emerging roles of circular RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 205–211.
127. Quinn, J.J., and Chang, H.Y. (2016). Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat. Rev. Genet.* 17, 47–62.
128. Sleutels, F., Zwart, R., and Barlow, D.P. (2002). The non-coding air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature* 415, 810–813.
129. Tam, C., Wong, J.H., Tsui, S.K.W., Zuo, T., Chan, T.F., and Ng, T.B. (2019). LncRNAs with miRNAs in regulation of gastric, liver, and colorectal cancers: up- dates in recent years. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 4649–4677.
130. Bhan, A., Soleimani, M., and Mandal, S.S. (2017). Long noncoding RNA and cancer: a new paradigm. *Cancer Res.* 77, 3965–3981.
131. Wang, Y.Y., Chen, M., and Li, B. (2012). Dosage compensation mechanism of X chromosome. *Yi Chuan* 34, 977–984.
132. Teng, F., Zhang, J.X., Chen, Y., Shen, X.D., Su, C., Guo, Y.J., Wang, P.H., Shi, C.C., Lei, M., Cao, Y.O., et al. (2021). LncRNA NKX2-1-AS1 promotes tumor progression and

- angiogenesis via upregulation of SERPINE1 expression and activation of the VEGFR-2 signaling pathway in gastric cancer. *Mol. Oncol.* 15, 1234–1255.
133. Toki, N., Takahashi, H., Zucchelli, S., Gustincich, S., and Carninci, P. (2020). Synthetic in vitro transcribed lncRNAs (SINEUPs) with chemical modifications enhance target mRNA translation. *FEBS Lett.* 594, 4357–4369.
 134. Zucchelli, S., Cotella, D., Takahashi, H., Carrieri, C., Cimatti, L., Fasolo, F., Jones, M.H., Sblattero, D., Sanges, R., Santoro, C., et al. (2015). SINEUPs: a new class of natural and synthetic antisense long non-coding RNAs that activate translation. *RNA Biol.* 12, 771–779.
 135. Carrieri, C., Cimatti, L., Biagioli, M., Beugnet, A., Zucchelli, S., Fedele, S., Pesce, E., Ferrer, I., Collavin, L., Santoro, C., et al. (2012). Long non-coding antisense RNA controls Uchl1 translation through an embedded SINEB2 repeat. *Nature* 491, 454–457.
 136. Toki, N., Takahashi, H., Sharma, H., Valentine, M.N.Z., Rahman, F.M., Zucchelli, S., Gustincich, S., and Carninci, P. (2020). SINEUP long non-coding RNA acts via PTBP1 and HNRNPK to promote translational initiation assemblies. *Nucleic Acids Res.* 48, 11626–11644.
 137. Indrieri, A., Grimaldi, C., Zucchelli, S., Tammaro, R., Gustincich, S., and Franco, B. (2016). Synthetic long non-coding RNAs [SINEUPs] rescue defective gene expression in vivo. *Sci. Rep.* 6, 27315.
 138. Mechanisms and Functions of Long Non-Coding RNAs at Multiple Regulatory Levels Xiaopei Zhang 1, Wei Wang 1, Weidong Zhu , Jie Dong , Yingying Cheng 1, Zujun Yin 2,* and Fafu Shen 1,**Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 5573; doi:10.3390/ijms20225573
 139. Jain, A.K.; Xi, Y.; McCarthy, R.; Allton, K.; Akdemir, K.C.; Patel, L.R.; Aronow, B.; Lin, C.; Li, W.; Yang, L.; et al. LncPRESS1 Is a p53-Regulated LncRNA that Safeguards Pluripotency by Disrupting SIRT6-Mediated De-acetylation of Histone H3K56. *Mol. Cell* 2016, 64, 967–981.
 140. Sun, T.-T.; He, J.; Liang, Q.; Ren, L.-L.; Yan, T.-T.; Yu, T.-C.; Tang, J.-Y.; Bao, Y.-J. Hu, Y.; Lin, Y.; et al. LncRNA GCInc1 Promotes gastric carcinogenesis and may act as a modular scaffold of WDR5 and KAT2A complexes to specify the histone modification pattern. *Cancer Discov.* 2016, 6, 784–801.
 141. Song, C.; Xiong, Y.; Liao, W.; Meng, L.; Yang, S. Long noncoding RNA ATB participates in the development of renal cell carcinoma by downregulating p53 via binding to DNMT1. *J. Cell. Physiol.* 2019, 234, 12910–12917.
 142. Zhao, X.; Hu, X. Downregulated long noncoding RNA LINC00313 inhibits the epithelial–mesenchymal transition, invasion, and migration of thyroid cancer cells through inhibiting the methylation of ALX4. *J. Cell. Physiol.* 2019, 234, 20992–21004.
 143. Thomson, D.W.; Dinger, M.E. Endogenous microRNA sponges: Evidence and controversy. *Nat. Rev. Genet.* 2016, 17, 272–283.
 144. Li, J.-H.; Liu, S.; Zhou, H.; Qu, L.-H.; Yang, J.-H. starBase v2.0: Decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein–RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. *Nucleic Acids Res.* 2014, 42, D92–D97.
 145. Wang, P.; Zhi, H.; Zhang, Y.; Liu, Y.; Zhang, J.; Gao, Y.; Guo, M.; Ning, S.; Li, X. miRSponge: A manually curated database for experimentally supported miRNA sponges and ceRNAs. *Database J. Biol. Databases Curation* 2015, 2015, bav098.

146. Karakulah, G.; Yucebilgili Kurtoglu, K.; Unver, T. PeTmBase: A Database of Plant Endogenous Target Mimics (eTMs). *PLoS ONE* 2016, 11, e0167698.
147. Denzler, R.; Agarwal, V.; Stefano, J.; Bartel, D.P.; Stoffel, M. Assessing the ceRNA hypothesis with quantitative measurements of miRNA and target abundance. *Mol. Cell* 2014, 54, 766–776.
148. Denzler, R.; McGeary, S.E.; Title, A.C.; Agarwal, V.; Bartel, D.P.; Stoffel, M. Impact of MicroRNA levels, target-site complementarity, and cooperativity on competing endogenous RNA-regulated gene expression. *Mol. Cell* 2016, 64, 565–579.
149. Cai, X.; Cullen, B.R. The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. *RNA* 2007, 13, 313–316.
150. Keniry, A.; Oxley, D.; Monnier, P.; Kyba, M.; Dandolo, L.; Smits, G.; Reik, W. The H19 lincRNA is a developmental reservoir of miR-675 that suppresses growth and Igf1r. *Nat. Cell Biol.* 2012, 14, 659–665.
151. Johnson, C.; Kasprzewska, A.; Tennessen, K.; Fernandes, J.; Nan, G.-L.; Walbot, V.; Sundaresan, V.; Vance, V.; Bowman, L.H. Clusters and superclusters of phased small RNAs in the developing inflorescence of rice. *Genome Res.* 2009, 19, 1429–1440. [CrossRef]
152. REVIEW article *Front. Genet.*, 01 July 2021 Sec. RNA Volume 12 - 2021 | <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.649619>, Long Non-coding RNAs: Mechanisms, Experimental, and Computational Approaches in Identification, Characterization, and Their Biomarker Potential in Cancer
153. CD Genomics-The genomics services company, <https://www.cd-genomics.com/rna-seq-transcriptome.html>
154. Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis, I Made Artika,^{1,2,*} Yora Permata Dewi,³ Ita Margaretha Nainggolan,² Josephine Elizabeth Siregar,² and Ungke Antonjaya⁴, Anelia D. Horvath, Academic Editor, *Genes* (Basel). 2022 Dec; 13(12): 2387. Published online 2022 Dec 16. doi: 10.3390/genes13122387
155. Arya M., Shergill I.S., Williamson M., Gommersall L., Arya N., Patel H.R.H. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2005;5:209–219. doi: 10.1586/14737159.5.2.209.
156. Artika I.M., Wiyatno A., Ma'roef C.N. Pathogenic viruses: Molecular detection and characterization. *Infect. Genet. Evol.* 2020;81:1–14. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104215.
157. Rocha A.J., Miranda R.d.S., Sousa A.J.S., da Silva A.L.C. Polymerase Chain Reaction for Biomedical Applications. InTech; London, UK: 2016. Guidelines for successful quantitative gene expression in real-time qPCR assays.
158. Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., Sindelka R., Sjöback R., Sjögreen B., Strömbom L., et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Asp. Med.* 2006;27:95–125. doi: 10.1016/j.mam.2005.12.007.
159. Wong M.L., Medrano J.F. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques.* 2005;39:75–85. doi: 10.2144/05391RV01.
160. Higuchi H., Fockler C., Dollinger G., Watson R. Kinetic PCR analysis: Real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology.* 1993;11:1026–1030. doi: 10.1038/nbt0993-1026.

161. Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 2002;30:1292–1305. doi: 10.1093/nar/30.6.1292.
162. Wacker M.J., Godard M.P. Analysis of one-step and two-step real-time RT-PCR using SuperScript III. *J. Biomol. Tech.* 2005;16:266–271.
163. Camila Caldas Martins Correia 1,2,†, Luis Felipe Rodrigues 2,†, Bruno Rocha de Avila Pelozin 2,†, Edilamar Menezes Oliveira 2 and Tiago Fernandes 2,* Long Non-Coding RNAs in Cardiovascular Diseases: Potential Function as Biomarkers and Therapeutic Targets of. <https://doi.org/10.3390/ncrna7040065>
164. Yeh, C.-F.; Chang, Y.-C.E.; Lu, C.-Y.; Hsuan, C.-F.; Chang, W.-T.; Yang, K.-C. Expedition to the Missing Link: Long Noncoding RNAs in Cardiovascular Diseases. *J. Biomed. Sci.* 2020, 27, 1–16. DOI: 10.1186/s12929-020-00647-w
165. McMullen, J.R.; Drew, B.G. Long Non-Coding RNAs (lncRNAs) in Skeletal and Cardiac Muscle: Potential Therapeutic and Diagnostic Targets? *Clin. Sci.* 2016, 130, 2245–2256.
166. Gomes, C.P.C.; Spencer, H.; Ford, K.L.; Michel, L.Y.M.; Baker, A.H.; Emanuelli, C.; Balligand, J.-L.; Devaux, Y. The Function and Therapeutic Potential of Long Non-Coding RNAs in Cardiovascular Development and Disease. *Mol. Ther.-Nucleic Acids* 2017, 8, 494–507. DOI: 10.1016/j.omtn.2017.07.014
167. Uchida, S.; Dimmeler, S. Long Noncoding RNAs in Cardiovascular Diseases. *Circ. Res.* 2015, 116, 737–750.
169. Greco, S.; Somoza, A.S.; Devaux, Y.; Martelli, F. Long Noncoding RNAs and Cardiac Disease. *Antioxidants Redox Signal.* 2018, 29, 880–901. DOI: 10.1089/ars.2017.7126
170. Hobuß, L.; Bär, C.; Thum, T. Long Non-Coding RNAs: At the Heart of Cardiac Dysfunction? *Front. Physiol.* 2019, 10, 30.
171. Semenza, G.L. Hypoxia-Inducible Factor 1 and Cardiovascular Disease. *Annu. Rev. Physiol.* 2014, 76, 39–56.
172. Zhang, Y.; Zhang, L.; Wang, Y.; Ding, H.; Xue, S.; Yu, H.; Hu, L.; Qi, H.; Wang, Y.; Zhu, W.; et al. KCNQ 1 OT 1, HIF 1A-AS 2 and APOA 1-AS Are Promising Novel Biomarkers for Diagnosis of Coronary Artery Disease. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2019, 46, 635–642. DOI: 10.1111/1440-1681.13094
173. Tang, T.-T.; Wang, B.-Q. Clinical Significance of lncRNA-AWPPH in Coronary Artery Diseases. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2020, 24, 11747–11751. DOI: 10.26355/eurev_202011_23826
174. Gang Liu, Xun Hu, Yi Li, Ming Long, Circulating long non-coding RNA Coromarker expression correlated with inflammation, coronary artery stenosis, and plaque vulnerability in patients with coronary artery disease 26 September 2022 <https://doi.org/10.1002/jcla.24716>
175. Zhou, M.; Zou, Y.-G.; Xue, Y.-Z.; Wang, X.-H.; Gao, H.; Dong, H.-W.; Zhang, Q. Long Non-Coding RNA H19 Protects Acute Myocardial Infarction through Activating Autophagy in Mice. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2018, 22, 5647–5651. DOI: 10.26355/eurev_201809_15831
176. Choong, O.K.; Chen, C.-Y.; Zhang, J.; Lin, J.-H.; Lin, P.-J.; Ruan, S.-C.; Kamp, T.J.; Hsieh, P.C. Hypoxia-Induced H19/YB-1 Cascade Modulates Cardiac Remodeling after Infarction. *Theranostics* 2019, 9, 6550–6567. DOI: 10.7150/thno.35218

177. Wang, X.-M.; Li, X.-M.; Song, N.; Zhai, H.; Gao, X.-M.; Yang, Y.-N. Long Non-Coding RNAs H19, MALAT1 and MIAT as Potential Novel Biomarkers for Diagnosis of Acute Myocardial Infarction. *Biomed. Pharmacother.* 2019, 118, 109208. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109208
178. Kumarswamy, R.; Bauters, C.; Volkmann, I.; Maury, F.; Fetisch, J.; Holzmann, A.; Lemesle, G.; de Groote, P.; Pinet, F.; Thum, T. Circulating Long Noncoding RNA, LIPCAR, Predicts Survival in Patients with Heart Failure. *Circ. Res.* 2014, 114, 1569–1575. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.3039>
179. Zhang, Z.; Gao, W.; Long, Q.-Q.; Zhang, J.; Lian-Sheng, W.; Liu, D.-C.; Yan, J.-J.; Yang, Z.-J.; Wang, L.-S. Increased Plasma Levels of lncRNA H19 and LIPCAR Are Associated with Increased Risk of Coronary Artery Disease in a Chinese Population. *Sci. Rep.* 2017, 7, 1–9. DOI: 10.1038/s41598-017-07611-z
180. Wang, X.-M.; Li, X.-M.; Song, N.; Zhai, H.; Gao, X.-M.; Yang, Y.-N. Long Non-Coding RNAs H19, MALAT1 and MIAT as Potential Novel Biomarkers for Diagnosis of Acute Myocardial Infarction. *Biomed. Pharmacother.* 2019, 118, 109208. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109208
181. Ballantyne, M.D.; Pinel, K.; Dakin, R.S.; Vesey, A.T.; Diver, L.; MacKenzie, R.M.; Garcia, R.; Welsh, P.; Sattar, N.A.; Hamilton, G.; et al. Smooth Muscle Enriched Long Noncoding RNA (SMILR) Regulates Cell Proliferation. *Circulation* 2016, 133, 2050–2065. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.02101>
182. Semenza, G.L. Hypoxia-Inducible Factor 1 and Cardiovascular Disease. *Annu. Rev. Physiol.* 2014, 76, 39–56. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021113-170322
183. Yunqi Liu, Jiapan Wang, Xiuye Zhao, Wen Li, Yaohua Liu, Xingda Li, Dan Zhao, Jie Yu, Hongyu Ji, Bing Shao, Zhendong Li, Jia Wang, Yilian Yang, Yan Hao, Yuting Wu, Ye Yuan, Zhimin Du, CDR1as promotes arrhythmias in myocardial infarction via targeting the NAMPT-NAD⁺ pathway, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115267>
184. Zhang, Y.; Sun, L.; Xuan, L.; Pan, Z.; Li, K.; Liu, S.; Huang, Y.; Zhao, X.; Huang, L.; Wang, Z.; et al. Reciprocal Changes of Circulating Long Non-Coding RNAs ZFAS1 and CDR1AS Predict Acute Myocardial Infarction. *Sci. Rep.* 2016, 6, 22384. DOI: 10.1038/srep22384
185. Gao, L.; Liu, Y.; Guo, S.; Yao, R.; Wu, L.; Xiao, L.; Wang, Z.; Liu, Y.; Zhang, Y. Circulating Long Noncoding RNA HOTAIR is an Essential Mediator of Acute Myocardial Infarction. *Cell. Physiol. Biochem.* 2017, 44, 1497–1508. DOI: 10.1159/000485588
186. Bihong Liao, Shaohong Dong, Zhenglei Xu, Fei Gao, Suihao Zhang, Ruijuan Liang, lncRNA Kcnq1ot1 renders cardiomyocytes apoptosis in acute myocardial infarction model by up-regulating Tead1, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117811>
187. Vausort, M.; Wagner, D.R.; Devaux, Y. Long Noncoding RNAs in Patients with Acute Myocardial Infarction. *Circ. Res.* 2014, 115, 668–677. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.303836
188. Ahmed, W.; Ali, I.S.; Riaz, M.; Younas, A.; Sadeque, A.; Niazi, A.K.; Niazi, S.H.; Ali, S.H.B.; Azam, M.; Qamar, R. Association of ANRIL Polymorphism (rs1333049:C>G) with Myocardial Infarction and Its Pharmacogenomic Role in Hypercholesterolemia. *Gene* 2013, 515, 416–420. DOI: 10.1016/j.gene.2012.12.044

189. Zhang, J.; Gao, C.; Meng, M.; Tang, H. Long Noncoding RNA MHRT Protects Cardiomyocytes against H₂O₂-Induced Apoptosis. *Biomol. Ther.* 2016, 24, 19–24. DOI: 10.4062/biomolther.2015.066
190. Chen, J.; Hu, Q.; Zhang, B.-F.; Liu, X.-P.; Yang, S.; Jiang, H. Long Noncoding RNA UCA1 Inhibits Ischaemia/Reperfusion Injury Induced Cardiomyocytes Apoptosis via Suppression of Endoplasmic Reticulum Stress. *Genes Genom.* 2019, 41, 803–810. DOI: 10.1007/s13258-019-00806-w
191. Yan, Y.; Zhang, B.; Liu, N.; Qi, C.; Xiao, Y.; Tian, X.; Li, T.; Liu, B. Circulating Long Noncoding RNA UCA1 as a Novel Biomarker of Acute Myocardial Infarction. *BioMed Res. Int.* 2016, 2016, 1–7. DOI: 10.1155/2016/8079372