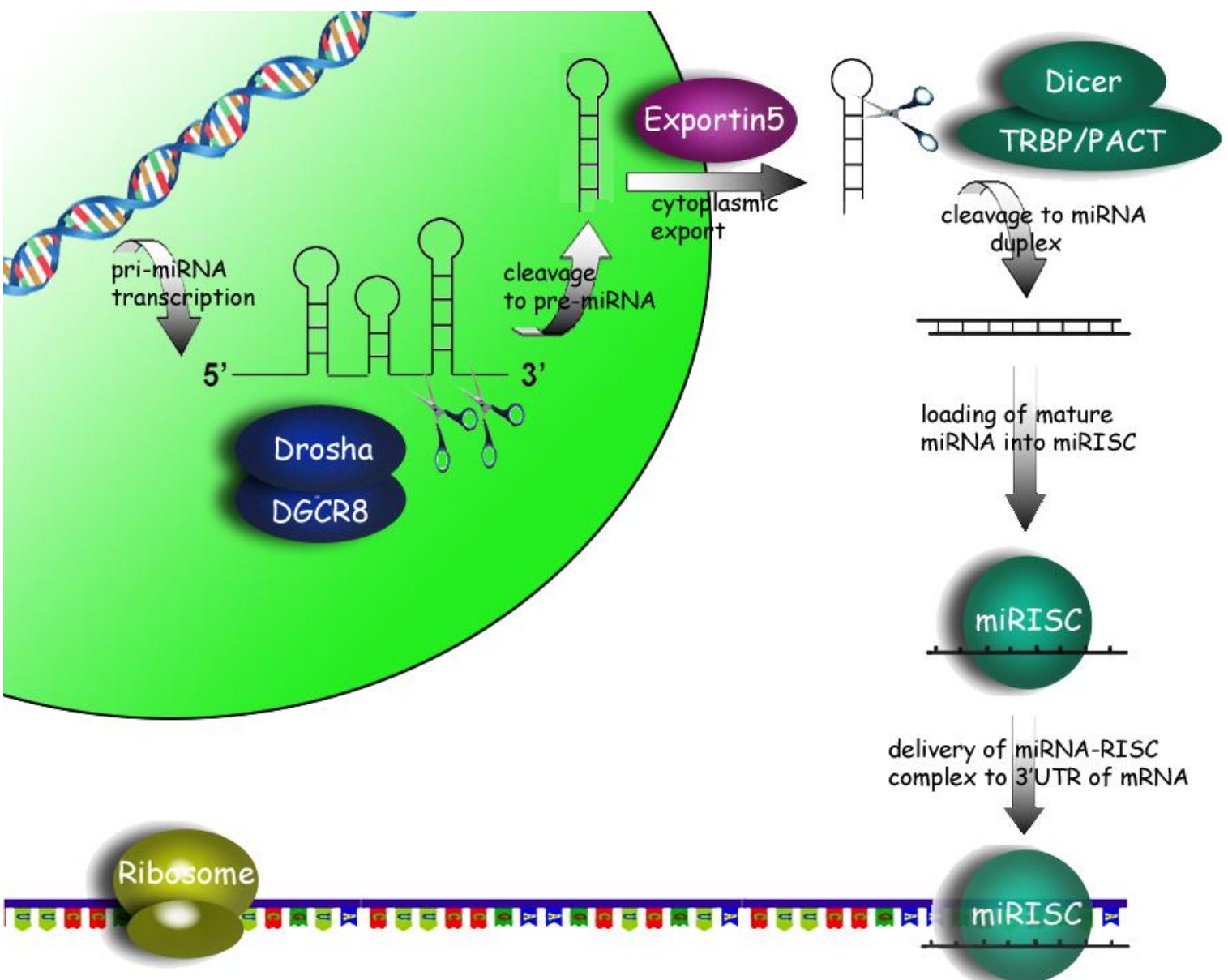




ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ - ΔΙΑΤΡΟΦΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΞΕΙΑΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΕΝΑΛΛΑΣΣΟΜΕΝΗΣ ΕΝΤΑΣΗΣ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ
ΜΙΚΡΟΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΤΟΥ ΣΑΛΙΟΥ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΟ
ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ





ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ - ΔΙΑΤΡΟΦΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΞΕΙΑΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΕΝΑΛΛΑΣΣΟΜΕΝΗΣ ΕΝΤΑΣΗΣ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ
ΜΙΚΡΟΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΤΟΥ ΣΑΛΙΟΥ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΟ
ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

ΟΝΟΜΑ/ΕΠΩΝΥΜΟ: ANNA ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΙΔΟΥ

ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΗΤΡΩΟΥ: 4521008

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Λάμπρος Συντώσης

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ: Λάμπρος Συντώσης

Βασίλης Μούγιος

Γεώργιος Δεδούσης

ΙΟΥΝΙΟΣ 2014

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο πλαίσιο του ΠΜΣ «Εφαρμοσμένη Διαιτολογία-Διατροφή» του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου και πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με το Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. Τα πειράματα της μελέτης πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Υγιεινής και Διατροφής Αθλουμένων του ΤΕΦΑΑ ΑΠΘ, ενώ ορισμένα τμήματα του πειραματικού πρωτοκόλλου πραγματοποιήθηκαν στο τμήμα Βιολογίας και στο τμήμα Φαρμακευτικής ΑΠΘ.

Δεδομένης, λοιπόν, της συνεργασίας μου με τρία διαφορετικά τμήματα, οφείλω αλλά και αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους που με βοήθησαν, ο καθένας με τον τρόπο του, να ολοκληρώσω την εργασία αυτή, παρά τις δυσκολίες και τις «ανατροπές» που παρουσιάστηκαν κατά τη διάρκεια της προσπάθειάς μου.

Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή κ. Λάμπρο Συντώση, που με μύησε στη «μαγεία του μεταβολισμού» και μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ ερευνητικά με αυτό που πραγματικά ήθελα, συνδυάζοντας τις βασικές μου σπουδές στη Βιολογία με όλες τις καινούριες για μένα γνώσεις που απέκτησα ως μεταπτυχιακή φοιτήτρια του τμήματος Διατροφής και Διαιτολογίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον κ. Βασίλη Μούγιο, καθηγητή του ΤΕΦΑΑ ΑΠΘ, όχι μόνο για την προθυμία του να συνεργαστούμε σε αυτή την προσπάθεια, αλλά και για την ουσιαστική βοήθεια και συνεχή καθοδήγηση που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης μας. Πράγματι, ένιωσα σαν κανονικό μέλος της ερευνητικής του ομάδας, δούλεψα σε ένα περιβάλλον ιδιαίτερα φιλικό και συνάμα αποδοτικό, και αποκόμισα γνώσεις και δεξιότητες μελετώντας και δουλεύοντας μαζί του.

Ευχαριστώ πολύ την κ. Μαργαρίτα Χατζοπούλου, καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας ΑΠΘ, για τη φιλοξενία που μου προσέφερε στο εργαστήριό της, αλλά και την ερευνητική της ομάδα που με βοήθησε σε αρκετά πρακτικά ζητήματα της διατριβής μου. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την κ. Ιωάννα Βαλιάνου για το χρόνο που μου αφιέρωσε και την άψογη συνεργασία που είχαμε κατά τη χρονική περίοδο που φιλοξενήθηκα στο εργαστήριο αυτό.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ιωάννη Πασπαλτσή, επιστημονικό συνεργάτη του Τμήματος Φαρμακευτικής ΑΠΘ, για την προθυμία του να με δεχτεί στο εργαστήριο, αλλά και για τη βοήθεια και τις γνώσεις που μου προσέφερε στην τεχνική της qPCR. Ακόμη, ευχαριστώ πολύ τα μέλη της ερευνητικής ομάδας του κ. Άγγελου

Κανελλή, που μου παραχώρησαν τον εργαστηριακό εξοπλισμό και ενδιαφέρθηκαν για την πρόοδο της εργασίας μου.

Πολύ σημαντική ήταν και η συνεργασία με το γυμναστήριο «Life Fitness Center» και τον κ. Φίλιππο Μαρκόπουλο, ο οποίος μας έδωσε τη δυνατότητα να διεξάγουμε τις δειγματοληψίες στους πελάτες του γυμναστηρίου. Τον ευχαριστώ πολύ για τη φιλοξενία και την προσπάθεια που κατέβαλε να ενημερώσει τόσο τους αθλούμενους όσο και τους προπονητές τους, με σκοπό να διευκολύνει τη διαδικασία της δειγματοληψίας. Εννοείται πως χωρίς την προθυμία των εθελοντών η διεξαγωγή της έρευνας αυτής θα ήταν αδύνατη.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την οικογένειά μου, τόσο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όσο και για την εμπύχωση και τη συνεχή στήριξη που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου αυτής, αλλά και γενικότερα σε όλη την πορεία των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1. Βιογένεση των <i>miRNA</i>	11
1.1.1. Κανονικά και μη κανονικά <i>miRNA</i>	12
1.1.1.1. Βασικό μονοπάτι βιογένεσης (κανονικά <i>miRNA</i>).....	12
1.1.1.2. Εναλλακτικό μονοπάτι βιογένεσης <i>miRNA</i> (μη κανονικά <i>miRNA</i>).....	15
1.2. <i>MiRNA</i> και μεταβολισμός λιπιδίων.....	15
1.2.1. <i>MiR-27a/b</i>	16
1.2.2. <i>MiR-33a/b</i> , <i>miR-33a*/b*</i>	19
1.2.3. <i>MiR-143</i>	22
1.2.4. <i>MiR-146a</i>	23
1.2.5. <i>MiR-335</i>	23
1.2.6. <i>MiR-370</i>	24
1.2.7. <i>MiR-378/378*</i>	24
1.3. Η σωματική άσκηση μεταβάλλει την έκφραση των <i>miRNA</i>	28
1.3.1. Η επίδραση της άσκησης στην έκφραση των <i>miRNA</i> σε ιστούς και όργανα.....	28
1.3.2. Η επίδραση της άσκησης στην έκφραση των <i>miRNA</i> που περιέχονται σε βιολογικά υγρά.....	30
1.4. Η αφθονία των <i>miRNA</i> στα βιολογικά υγρά.....	33
1.5. Σκοπός της έρευνας.....	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΜΕΘΟΔΟΣ.....	36
2.1. Σχεδιασμός της έρευνας.....	36
2.2. Δείγμα της έρευνας.....	36
2.3. Άσκηση.....	37
2.4. Δειγματοληψία.....	38
2.5. Παρασκευή <i>RNA</i>	39
2.5.1. Απομόνωση <i>RNA</i>	39
2.5.2. Έλεγχος συγκέντρωσης /ποιότητας <i>RNA</i>	39
2.5.3. Αραίωση δειγμάτων.....	40

2.6. Ανάστροφη Μεταγραφή.....	40
2.7. Ενίσχυση των cDNA με qPCR.....	43
2.8. Στατιστική Ανάλυση/Υπολογισμοί.....	47
2.9. Βιοηθική.....	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	49
3.1. Ανθρωπομετρικά - δημογραφικά χαρακτηριστικά συμμετεχόντων.....	49
3.2. Ένταση της άσκησης.....	49
3.3. Συγκεντρώσεις RNA.....	50
3.4. Δοκιμασία Wilcoxon στις τιμές Ct.....	52
3.5. Περιγραφικά μέτρα Ct - επιλογή ενδογενούς γονιδίου αναφοράς.....	56
3.6. Δοκιμασία Wilcoxon / t test στις τιμές ΔCt.....	58
3.7. t test στις τιμές ΔΔCt.....	58
3.8. Δοκιμασία Wilcoxon στις τιμές $2^{-\Delta\Delta Ct}$	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	61
4.1. Είναι δυνατόν τα miRNA που εκφράζονται και δρουν σε συγκεκριμένους ιστούς και όργανα να εμφανίζονται στο σάλιο;.....	61
4.2. Με ποιους μηχανισμούς οι αλλαγές που επέφερε η άσκηση στην έκφραση των miR-33a και miR-378a επηρεάζουν το μεταβολισμό των λιπιδίων;.....	62
4.2.1. Επίδραση της άσκησης στο μεταβολισμό των λιπιδίων μέσω αύξησης της έκφρασης του miR-33a.....	62
4.2.2. Επίδραση της άσκησης στο μεταβολισμό των λιπιδίων μέσω μείωσης της έκφρασης του miR-378a.....	63
4.3. Περιορισμοί.....	64
4.3.1. Ένταση της άσκησης.....	65
4.3.2. Διασπορά τιμών Ct.....	65
4.4. Συμπεράσματα.....	66
4.5. Μελλοντικές κατευθύνσεις.....	67
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	68
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	75

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΣΚΟΠΟΣ: Τα μικροριβονουκλεϊκά οξέα (miRNA) είναι μικρά (μήκους ~22 νουκλεοτιδίων), μονόκλωνα μόρια RNA κωδικοποιούμενα από το γονιδίωμα, τα οποία δεσμεύονται σε συμπληρωματικές περιοχές που εντοπίζονται στο 3' αμετάφραστο άκρο των mRNA, προκαλώντας καταστολή της μετάφρασης και/ή αποσταθεροποίηση του mRNA. Η επίδραση της άσκησης στην έκφραση των miRNA αποτελεί ένα καινούργιο και ιδιαίτερα ενδιαφέρον ερευνητικό πεδίο, το οποίο εξελίσσεται ταχύτατα τα τελευταία δύο χρόνια. Η απόκριση των miRNA σε διαφορετικά είδη άσκησης έχει μελετηθεί τόσο σε ιστούς και όργανα (π.χ. σκελετικοί μύες, καρδιά), όσο και σε βιολογικά υγρά (π.χ. αίμα). Λόγω απουσίας σχετικών ερευνητικών δεδομένων, σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η μελέτη της επίδρασης της άσκησης στην έκφραση 8 miRNA που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων, σε δείγματα ανθρώπινου σάλιου. Τα miRNA που μελετήθηκαν είναι τα εξής: hsa-miR-27a, hsa-miR-27b, hsa-miR-33a, hsa-miR-143, hsa-miR-146a, hsa-miR-335, hsa-miR-370 και hsa-miR-378a.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ: 19 υγιείς άνδρες (VO_{2max} $40,9 \pm 4,7$ ml/kg/min) συμμετείχαν σε προγραμματισμένη άσκηση εναλλασσόμενης έντασης σε στατικό ποδήλατο (spinning), διάρκειας 50 λεπτών. Πριν την έναρξη και αμέσως μετά τη λήξη της συνεδρίας άσκησης, ελήφθησαν δείγματα σάλιου από κάθε συμμετέχοντα, τα οποία υποβλήθηκαν στις εξής πειραματικές διαδικασίες: 1. Απομόνωση RNA με τη χρήση του ειδικού kit mirVanaTM PARISTM της εταιρείας Ambion. 2. Ανάστροφη μεταγραφή με τη χρήση του ειδικού kit TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription της εταιρείας Applied Biosystems, με σκοπό την παρασκευή συμπληρωματικών (των προς μελέτη miRNA) αλυσίδων cDNA. 3. Ενίσχυση των cDNA με τη χρήση ειδικών εκκινήτων (TaqMan[®] Small RNA Assays της Applied Biosystems), με τη μέθοδο της qPCR. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η μεταβλητή $2^{-\Delta\Delta Ct}$, η οποία δείχνει τη διαφορά (fold change) στη συγκέντρωση κάθε miRNA μετά την παρέμβαση άσκησης, συγκρινόμενη με την τιμή της πριν την παρέμβαση. Η στατιστική σημαντικότητα της μεταβολής στην έκφραση κάθε miRNA προσδιορίστηκε μετά από σύγκριση των τιμών $2^{-\Delta\Delta Ct}$ με την τιμή 1 μέσω της δοκιμασίας Wilcoxon. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS[®] 18.0.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Στατιστικά σημαντικές μεταβολές μετά την άσκηση βρέθηκαν στο hsa-miR-33a (κατά $7,66 \pm 2,94$ φορές, $p = 0,012$), το οποίο ρυθμίζει την ομοιόσταση της χοληστερόλης και την οξείδωση των λιπαρών οξέων, και στο hsa-miR-378a (κατά 0,79

$\pm 0,11$ φορές, $p = 0,048$), το οποίο ελέγχει την ενεργειακή ομοιόσταση και συμμετέχει στη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων και τη λιπογένεση.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Η συγκεκριμένη άσκηση (spinning) μετέβαλε σημαντικά την έκφραση δύο miRNA που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων. Γνωρίζοντας το ρυθμιστικό ρόλο των συγκεκριμένων miRNA, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι η μεταβολή της έκφρασής τους ίσως συμβάλλει στην απόκριση των φυσιολογικών διεργασιών του ανθρώπινου οργανισμού στην άσκηση (π.χ. αυξημένη παροχή λιπιδίων από το ήπαρ και μειωμένη συσσώρευση τριγλυκεριδίων στο λιπώδη ιστό). Επιπλέον, τα ευρήματα αυτά ενισχύουν την υπόθεση ότι οι μεταβολές στην έκφραση των miRNA που δρουν σε συγκεκριμένα όργανα είναι εφικτό να ανιχνευθούν σε βιολογικά υγρά όπως το σάλιο.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: miRNA, μεταβολισμός λιπιδίων, άσκηση, σάλιο

ABSTRACT

INTRODUCTION-AIM: Micro-ribonucleic acids (miRNAs) are short (~ 22 nucleotides long), single-stranded RNAs encoded by the genome, which bind to complementary target sites in the 3' untranslated regions (3' UTR) of messenger RNAs, causing translational repression and/or mRNA destabilization. The effect of exercise on miRNA expression is a new and highly interesting research field, which has been rapidly developing during the last two years. The response of miRNA expression to different types of exercise has been studied both in specific tissues and organs (e.g., skeletal muscle and heart), as well as other biological fluids (e.g., blood). In view of the absence of relevant research data, the aim of this study was to investigate the effect of exercise on the expression of 8 miRNAs involved in lipid metabolism in human saliva samples. We examined the following miRNAs: hsa-miR-27a, hsa-miR-27b, hsa-miR-33a, hsa-miR-143, hsa-miR-146a, hsa-miR-335, hsa-miR-370, and hsa-miR-378a.

MATERIAL AND METHODS: 19 healthy men (VO_{2max} 40.9 ± 4.7 ml/kg/min) participated in a scheduled, 50-min aerobic interval exercise program on a stationary bicycle (spinning). Saliva samples were collected from each participant before and immediately after the exercise session, and the following experimental procedures were performed: (1) RNA isolation, using mirVana™ PARIS™ kit by Ambion, (2) reverse transcription, using TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription kit by Applied Biosystems in order to produce complementary cDNA clones, and (3) cDNA amplification, using specific primers (TaqMan® Small RNA Assays by Applied Biosystems) by performing qPCR. Finally, we calculated the variable, $2^{-\Delta\Delta Ct}$, which represents the difference (fold change) in the concentration of each miRNA after exercise, compared to its corresponding value before exercise. The statistical significance of the alteration in the expression levels of each miRNA was determined by comparing the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ values with 1 through the Wilcoxon test. The SPSS®, v. 18.0, was used to analyze the data.

RESULTS: Statistically significant alterations were observed after the exercise session in the expression of miR-33a (fold change 7.66 ± 2.94 , $p = 0.012$), which regulates cholesterol homeostasis and fatty acid oxidation, and miR-378a (fold change 0.79 ± 0.11 , $p = 0.048$), which controls energy homeostasis and plays a role in adipogenesis and lipogenesis.

CONCLUSIONS: This type of exercise (spinning) significantly altered the expression of miR-33a and miR-378a, which are involved in lipid metabolism. Considering the

regulatory role of these miRNAs, we conclude that the alteration of their expression may contribute to several physiological procedures of the human organism in response to aerobic exercise (e.g., increased lipid supply by the liver and decreased triacylglyceride accumulation in the adipose tissue). Moreover, these findings indicate that alterations in the expression of miRNAs that regulate the function of specific organs may be detectable in biological fluids such as saliva.

KEY WORDS: miRNA, lipid metabolism, exercise, saliva

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα μικροριβονουκλεϊκά οξέα (miRNA) αποτελούν μια ομάδα μικρών (μήκους ~22 νουκλεοτιδίων), μονόκλωνων μορίων RNA που κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα. Τα miRNA δεσμεύονται σε συμπληρωματικές περιοχές που εντοπίζονται στο 3' αμετάφραστο άκρο των mRNA, προκαλώντας καταστολή της μετάφρασης και/ή αποσταθεροποίηση του mRNA [1-3]. Συνήθως, τα μόρια αυτά κωδικοποιούνται από γονίδια ή περιοχές του γονιδιώματος που δεν χρησιμοποιούνται για πρωτεϊνοσύνθεση και ονομάζονται ιντρόνια (introns) [4]. Ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans* το 1993 και μέχρι σήμερα έχει αποδειχθεί ότι τέτοιου είδους μόρια κωδικοποιούνται από τα γονιδιώματα των περισσότερων ευκαρυωτών και ορισμένων ιών [5-7]. Μέχρι σήμερα, έχουν αναγνωριστεί περισσότερα από 700 miRNA στο ανθρώπινο γονιδίωμα [8, 9]. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ένα μόριο miRNA μπορεί να έχει πολλαπλούς στόχους. Έτσι, δημιουργείται ένας μηχανισμός ικανός να ρυθμίσει ταυτόχρονα τη μετα-μεταγραφική έκφραση πολλών γονιδίων που εμπλέκονται σε συγκεκριμένα μονοπάτια ή φυσιολογικές διεργασίες [1-3].

Τα περισσότερα miRNA ονομάζονται miR-#, όπου # αντιπροσωπεύει έναν αριθμό. Οι αλληλουχίες των miRNA μπορούν να εντοπιστούν στο 3' ή στο 5' άκρο της πρόδρομης δομής τους, η οποία ονομάζεται pre-miRNA. Εάν το ώριμο miRNA προκύπτει από το 5' άκρο, ονομάζεται miR-#-5p, ενώ αν προκύπτει από το 3' άκρο, ονομάζεται miR-#-3p [8]. Αυτά τα γενικά χαρακτηριστικά των miRNA καθορίζονται από παράγοντες που σχετίζονται με τη διεργασία ωρίμανσης των miRNA μέσω της επεξεργασία τους με διάφορα ένζυμα, όπως θα αναλυθεί παρακάτω.

1.1. Βιογένεση των miRNA

Τα γονίδια των miRNA μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II ή, σε ορισμένες περιπτώσεις, από την RNA πολυμεράση III, προκειμένου να παραχθούν τα πρωτογενή μεταγραφήματα των miRNA (pri-miRNA) [8, 10-12]. Ως εκ τούτου, τα μόρια pri-miRNA είναι μεγάλα σε μήκος και μπορεί να περιέχουν τροποποιήσεις στα 5' και 3' άκρα τους, όμοιες με αυτές που συναντώνται στα mRNA ή τα pre-mRNA. Πράγματι, πολλές αλληλουχίες που κωδικοποιούν miRNA εντοπίζονται σε συγκεκριμένα γονίδια ή επικαλύπτονται από άλλα γονίδια, τα οποία συχνά αναφέρονται ως γονίδια ξενιστές (host genes) [11].

Τα γονίδια των miRNA δεν έχουν καθοριστεί πειραματικά με τόση σαφήνεια όσο τα γονίδια πρωτεϊνών και τα pri-miRNA δεν έχουν χαρακτηριστεί σε τόση έκταση όσο άλλα μεταγραφήματα, όπως τα mRNA [11]. Εάν βρεθεί ότι μια ακολουθία DNA που κωδικοποιεί κάποιο miRNA εντοπίζεται «μέσα» ή δίπλα σε κάποιο γνωστό γονίδιο, συχνά πιθανολογείται ότι η μεταγραφή του συγκεκριμένου γονιδίου οδηγεί στη δημιουργία του miRNA [11]. Βέβαια, ενδεχομένως ένα miRNA να διαθέτει δικό του υποκινητή, ο οποίος δεν σχετίζεται με αυτόν του γονιδίου ξενιστή [8, 11]. Επιπλέον, το μεταγράφημα ή τα μεταγραφήματα του γονιδίου ξενιστή μπορεί να είναι ένα από τα δύο ή περισσότερα πιθανά pri-miRNA, από το οποία θα προκύψει το ίδιο μόριο miRNA. Τέλος, υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες τα miRNA φαίνεται να σχηματίζουν δικές τους ανεξάρτητες μεταγραφικές μονάδες, παρά το ότι παραμένει πιθανό το ενδεχόμενο να «μοιράζονται» μεταγραφήματα με άλλα γονίδια [11].

1.1.1. Κανονικά και μη κανονικά miRNA

Τα miRNA των θηλαστικών μπορούν να χωριστούν σε δύο ευρείες κατηγορίες, κανονικά (canonical) και μη κανονικά (non-canonical), με βάση τον τρόπο επεξεργασίας των pri-miRNA, που οδηγεί στην παραγωγή των ώριμων miRNA [11].

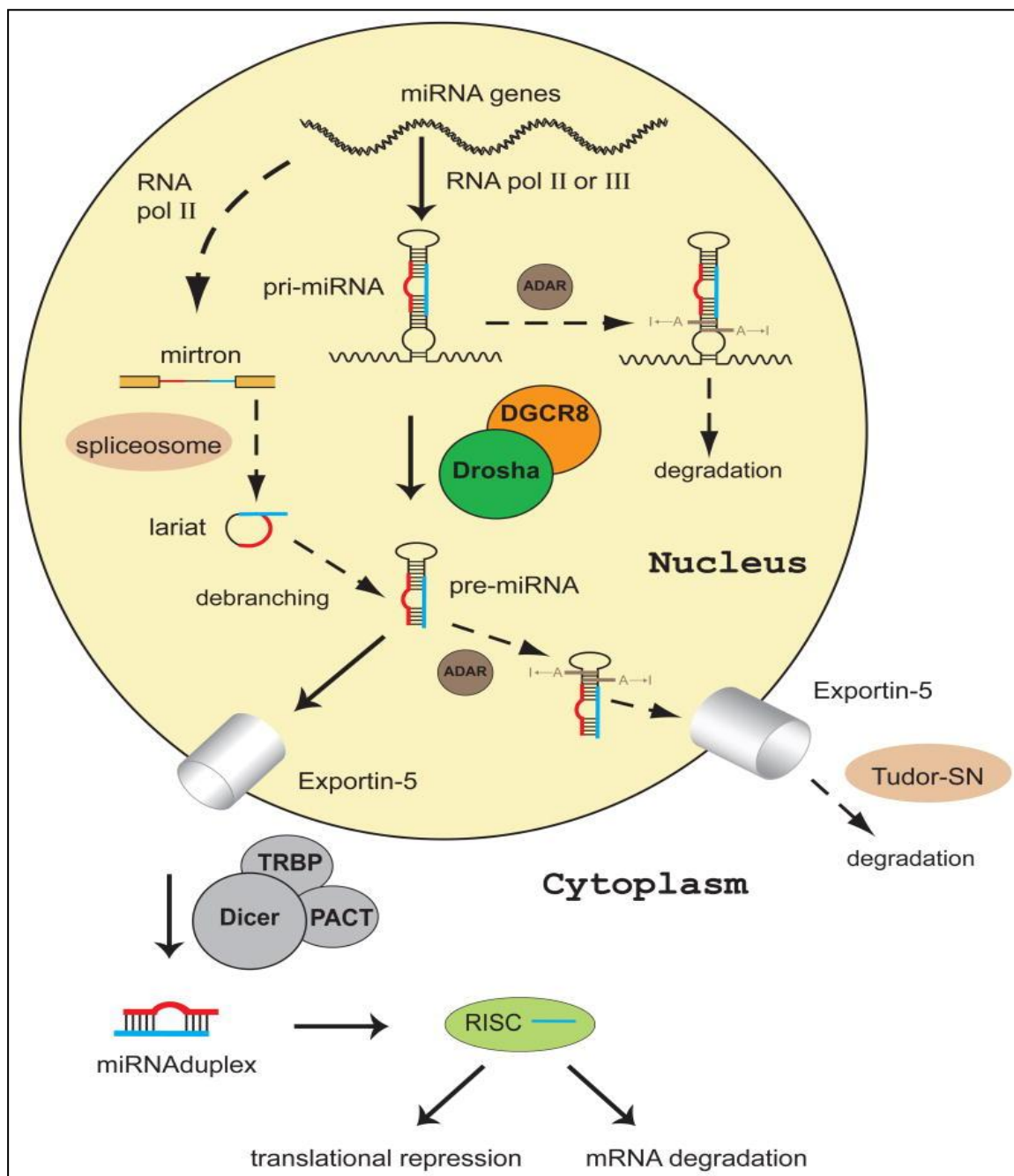
1.1.1.1. Βασικό μονοπάτι βιογένεσης (κανονικά miRNA)

Το κανονικό (βασικό) μονοπάτι βιογένεσης – ωρίμανσης των miRNA στα κύτταρα των θηλαστικών φαίνεται σχηματικά στην εικόνα 1. Όπως προαναφέρθηκε, τα miRNA συντίθενται στον πυρήνα ως μεγάλου μήκους πρωτογενή μεταγραφήματα (pri-miRNAs), τα οποία συχνά αποτελούνται από χιλιάδες νουκλεοτίδια. Αρχικά, το μεγάλου μήκους μόριο pri-miRNA αναγνωρίζεται και διασπάται από μια ριβονουκλεάση III, που ονομάζεται Drosha, μαζί με μια ειδική πρωτεΐνη που δεσμεύει το RNA (RNA-binding protein), η οποία ονομάζεται DGCR8 ή Pasha (Partner of Drosha) [8, 10-12]. Το σύμπλεγμα που σχηματίζουν οι δύο αυτές πρωτεΐνες ονομάζεται «μικροεπεξεργαστής» (Microprocessor complex) [8]. Το προϊόν της πρώτης αυτής διάσπασης είναι το μόριο pre-miRNA, το οποίο αποτελείται από περίπου 70 νουκλεοτίδια. Στη συνέχεια, το pre-miRNA μεταφέρεται διαμέσου της πυρηνικής μεμβράνης στο κυτταρόλυμα, με τη βοήθεια της εξπορτίνης-5 (Exportin-5), η οποία δρα σε συνδυασμό με τον συμπαραγόντα Ran-GTP [8, 10, 11].

Στο κυτταρόλυμα, το GTP του Ran αντικαθίσταται από GDP, οδηγώντας στην απελευθέρωση του pre-miRNA από την εξπορτίνη-5. Το pre-miRNA υφίσταται περαιτέρω διάσπαση σε ένα ζεύγος φωσφοδιεστερικών συνδέσεων κοντά στο βρόχο

που σχηματίζεται στο δίκλωνο μόριό του, από μια άλλη ριβονουκλεάση III, που ονομάζεται Dicer, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός δίκλωνου μορίου miRNA (μεγέθους περίπου 22 ζευγών βάσεων). Ακολούθως, το δίκλωνο miRNA ενσωματώνεται στο σύμπλεγμα RISC (RNA-induced silencing complex), πιθανώς μέσω της δραστηριότητας του συμπλέγματος Dicer-TRBP-PACT (οι τελευταίες είναι πρωτεΐνες που δεσμεύουν το RNA) [8, 11]. Το δίκλωνο miRNA μετατρέπεται στην ώριμη, μονόκλωνη μορφή του (guide strand), ενώ η συμπληρωματική του αλυσίδα (passenger strand ή miRNA*) συνήθως αποικοδομείται από το RISC. Τα ώριμα miRNA συνήθως προέρχονται από τη μία αλυσίδα του δίκλωνου miRNA. Τα miRNA* που τυχόν δεν αποικοδομούνται έχουν τη δυνατότητα να ενσωματωθούν στο RISC και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ενεργά στη ρύθμιση των γονιδίων [8].

Η εκτενής επεξεργασία των miRNA διασφαλίζει ότι μόνο τα μόρια που διαθέτουν τα κατάλληλα δομικά χαρακτηριστικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη γονιδιακή ρύθμιση. Αυτά τα δομικά χαρακτηριστικά αναγνωρίζονται από τους ειδικούς παράγοντες που συμμετέχουν στην επεξεργασία των miRNA [8].



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση των διαφορετικών μονοπατιών βιογένεσης-ωρίμανσης των miRNA. Τα γονίδια των miRNA μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II ή III, σχηματίζοντας μεταγραφώματα μεγάλου μήκους, που ονομάζονται pri-miRNA. Στο βασικό μονοπάτι (συμπαγή βέλη) το pri-miRNA διασπάται από μια ριβονουκλεάση III (RNase III), που ονομάζεται Drosha και δρα μαζί με μια ειδική πρωτεΐνη που δεσμεύει το RNA (RNA-binding protein) και ονομάζεται DGCR8. Στη συνέχεια, το pre-miRNA μεταφέρεται διαμέσου της πυρηνικής μεμβράνης στο κυτταρόλυμα, με τη βοήθεια της εξπορτίνης-5 (exportin-5), όπου διασπάται περαιτέρω από μια άλλη ριβονουκλεάση III, που ονομάζεται Dicer, με τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό του δίκλωνου μορίου miRNA. Ακολούθως, το δίκλωνο miRNA ενσωματώνεται στο σύμπλοκο RISC, πιθανώς μέσω της δραστηριότητας του συμπλόκου Dicer-TRBP-PACT, και μετατρέπεται στην τελική, μονόκλωνη μορφή του. Το ώριμο, πλέον, miRNA οδηγεί σε καταστολή της μεταγραφής ή αποδιάταξη του mRNA, ανάλογα με το συμπληρωματικό mRNA-στόχο. Το εναλλακτικό μονοπάτι ωρίμανσης των miRNA (διακεκομμένα βέλη) δεν απαιτεί τη διαμεσολάβηση της Drosha. Τα pre-miRNA που προέρχονται από μιρτρόνια σχηματίζονται με τη βοήθεια του ματισώματος και τη δράση του αποκλαδωτικού ενζύμου (debranching enzyme). Η μετατροπή της αδενοσίνης (A) σε ινοσίνη (I) στα pri-miRNA και/ή στα pre-miRNA από το ένζυμο απαμινάση της αδενοσίνης (ADAR) μπορεί να αναστείλει τη διάσπασή τους από την Drosha ή την Dicer ή να αλλάξει την εξειδίκευση των miRNA. Τα μη λειτουργικά είδη RNA αποδιάτασσονται από διάφορες νουκλεάσες, όπως την Tudor-SN, στο κυτταρόλυμα. Faller M, Guo F. *MicroRNA biogenesis: There's more than one way to skin a cat*. Biochimica et Biophysica Acta. 2008;1779(11):663-667. Αναπαράγεται με την ευγενική άδεια των συγγραφέων.

1.1.1.2. Εναλλακτικό μονοπάτι βιογένεσης (μη κανονικά miRNA)

Τα miRNA που βρίσκονται σε ιντρόνια συνήθως διασπώνται από την Drosha, παράλληλα με το μάτισμα των γονιδίων ξενιστών. Η αλληλούχιση του γονιδιώματος της *D. melanogaster* και του *C. elegans* επέτρεψε τον προσδιορισμό μιας νέας κατηγορίας ιντρονικών miRNA, τα οποία δεν περιέχουν την έλικα των 10 bp που είναι απαραίτητη για τη δράση της Drosha. Αυτά τα pre-miRNA, που ονομάστηκαν μιρτρόνια (mirtrons) αποδείχθηκε ότι υφίστανται επεξεργασία απευθείας από το ματίσωμα (spliceosome) και όχι από τη Drosha (εικόνα 1.1). Σε αντίθεση με τα pre-miRNA που παράγονται με τη βοήθεια της Drosha, τα μιρτρόνια που σχηματίζονται με τη βοήθεια του ματισώματος απαιτείται να γίνουν γραμμικά με τη δράση του αποκλαδωτικού ενζύμου (debranching enzyme), πριν την εξαγωγή τους στο κυτταρόλυμα από την εξαπορτίνη-5. Τόσο στα pre-miRNA που παράγονται από τη Drosha όσο και στα μιρτρόνια, δρα στη συνέχεια η Dicer. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα μιρτρόνια είναι ένα υποσύνολο των miRNA που μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II [8, 10-12].

Ενώ τα περισσότερα miRNA στα θηλαστικά προκύπτουν μέσω του κανονικού μονοπατιού βιογένεσης [11], έχειδειχθεί ότι στο ανθρώπινο γονιδίωμα και στα γονιδιώματα άλλων θηλαστικών υπάρχουν και μιρτρόνια [8]. Βέβαια, δεν είναι ακόμη ξεκάθαρο εάν τα γονίδια των κανονικών miRNA είναι περισσότερα από αυτά των μη κανονικών, δεδομένου ότι ανακαλύπτονται ολοένα και περισσότερα miRNA με χαμηλή αφθονία, των οποίων η προέλευση δεν έχει εξεταστεί [11].

Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι δράσεις των Drosha και Dicer δεν είναι οι μοναδικές που υφίστανται τα miRNA κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής τους. Η απαμινάση της αδενοσίνης που δρα στο RNA (ADAR) μπορεί να μετατρέψει κάποια αδενοσίνη (A) σε ινοσίνη (I), σε δίκλινα μόρια RNA (εικόνα 1.1). Η δράση της ADAR μπορεί να αυξήσει τη λειτουργική ποικιλότητα των miRNA. Εκτός από την ADAR, έχει βρεθεί και προσθήκη ενός νουκλεοτιδίου στο 3'- άκρο των miRNA, καθώς και απαμίνωση της κυτοσίνης. Η λειτουργική σημασία των τροποποιήσεων αυτών δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί [8, 11].

1.2. MiRNA και μεταβολισμός λιπιδίων

Παρά το γεγονός ότι ο ρόλος των miRNA στη ρύθμιση πολλών φυσιολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένων της απόπτωσης, της κυτταρικής διαφοροποίησης και του καρκίνου, είναι καλά εδραιωμένος, η σημασία αυτών των μικροσκοπικών μορίων RNA στη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων έχει αποκαλυφθεί μόλις

πρόσφατα. Οι εξελίξεις που έχουν σημειωθεί στην κατανόηση της ρύθμισης του μεταβολισμού των λιπιδίων δείχνουν ότι τα miRNA διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού της χοληστερόλης και των λιπαρών οξέων [13, 14].

Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί πολλά miRNA, τα οποία φαίνεται να συμμετέχουν στη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων. Στην παρούσα ενότητα θα αναφερθούμε αναλυτικά στη λειτουργία των 8 miRNA που μελετήθηκαν στο εργαστήριό μας, ενώ στο τέλος της ενότητας θα παρουσιαστεί ένας συγκεντρωτικός πίνακας, ο οποίος θα περιλαμβάνει τις βασικές λειτουργίες των miRNA που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων.

1.2.1. MiR-27a/b

Η οικογένεια των miR-27 περιλαμβάνει δύο ισομορφές: το miR-27a και το miR-27b. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα μόρια αυτά συμμετέχουν σε γνωστές φυσιολογικές διεργασίες, όπως π.χ αγγειογένεση, λιπογένεση, φλεγμονή, μεταβολισμός λιπιδίων, οξειδωτικό στρες, αντίσταση στην ινσουλίνη και διαβήτη τύπου 2 [15]. Στην εικόνα 1.2 παρουσιάζονται σχηματικά τα γονίδια-στόχοι των miR-27a/b και οι αντίστοιχες λειτουργίες τους, που σχετίζονται με το μεταβολισμό του λίπους.

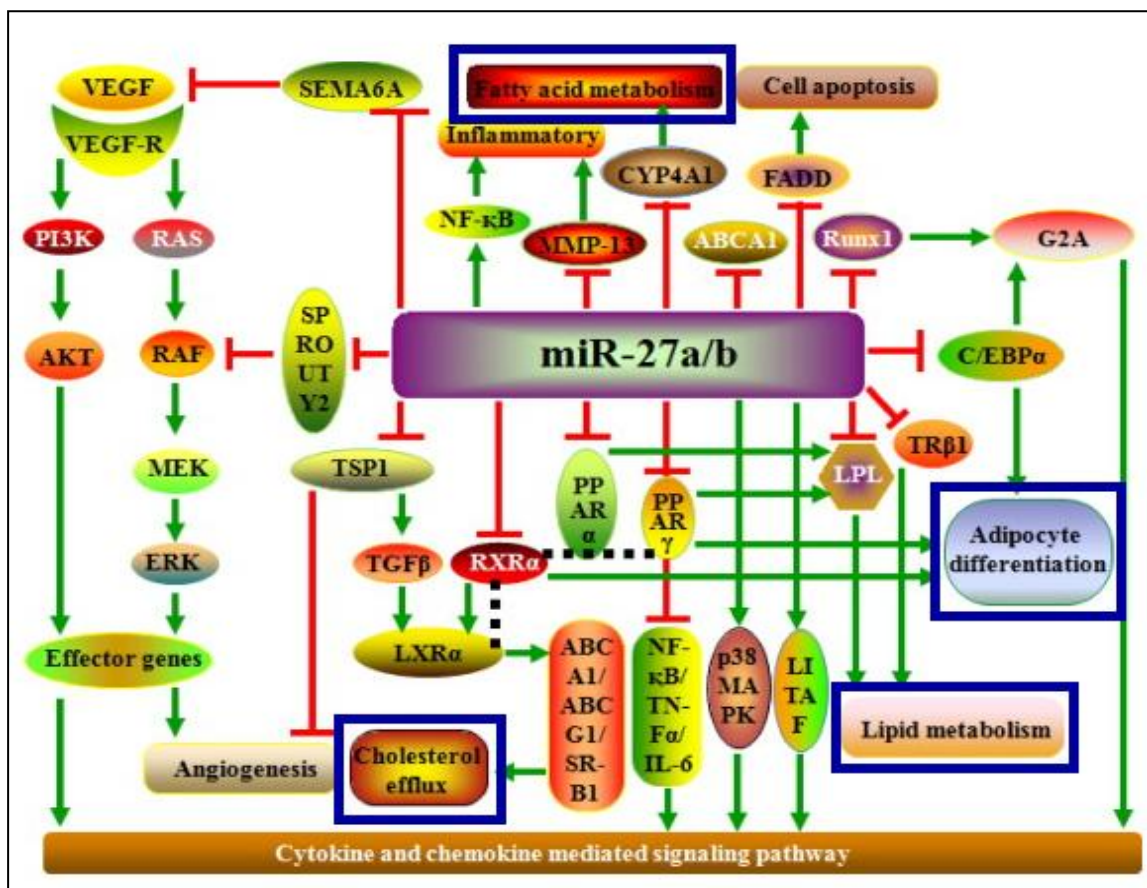
Τα miR-27a/b λειτουργούν ως αρνητικοί ρυθμιστές της λιπογένεσης και διαδραματίζουν βασικό ρόλο στο μεταβολισμό των λιπών. Η σημασία τους στη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων αποκαλύφθηκε με τη διεξαγωγή μιας μελέτης υπερέκφρασης, στην οποία διαπιστώθηκε ότι τα miR-27a/b αναστέλλουν την έκφραση των απαραίτητων για τη λιπογένεση πρωτεϊνών (PPAR γ και C/EBP α), αναστέλλοντας έτσι τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων [13-15].

Εκτός από το ρόλο τους στη λιπογένεση, πολλές έρευνες δίνουν έμφαση στην ικανότητα των miR-27a/b να ρυθμίζουν τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων και της χοληστερόλης. Τόσο το miR-27a όσο και το miR-27b ρυθμίζουν αρνητικά την έκφραση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (LPL). Η LPL εμπλέκεται στην υδρόλυση των τριγλυκεριδίων των λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL) και των χυλομικρών στην κυκλοφορία [14,15].

Τα miR-27a και 27b έχουν και δράσεις που δεν συμπίπτουν: το miR-27a μπορεί να μειώσει τον υποδοχέα θυρεοειδικών ορμονών $\beta 1$, ενώ το miR-27b μπορεί να καταστείλει την έκφραση, σε επίπεδο mRNA, πρωτεϊνών οι οποίες συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπιδίων, συμπεριλαμβανομένης της SREBP-1c (sterol regulatory element-binding protein). Επιπλέον, σε μια μελέτη που διεξήχθη σε παχύσαρκα ποντίκια, βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα των miR-27a και miR-27b στο λιπώδη ιστό. Αυτή

ήταν και η πρώτη έρευνα που έδειξε ότι η παχυσαρκία μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα έκφρασης των miRNA [14].

Ο ρόλος του miR-27b στη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων διερευνήθηκε από τον Vickers και τους συνεργάτες του σε μια πολύ πρόσφατη έρευνα που διεξήχθη σε ποντίκια. Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι τα επίπεδα του miR-27b στο ήπαρ ήταν «ευαίσθητα» στην υπερλιπιδαιμία του πλάσματος, κάτι που φάνηκε από την αύξηση της έκφρασης του miR-27b στο ήπαρ (3 φορές περίπου), μετά από δίαιτα υψηλή σε λίπος (42% της συνολικής ενέργειας) [16]. Επιπλέον, στην ίδια μελέτη βρέθηκε ότι το miR-27b ρυθμίζει την έκφραση (σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης) διαφόρων γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων, συμπεριλαμβανομένων των Angptl3 και Gram, σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα (κυτταρική σειρά Huh7) [16].



Εικόνα 1.2: Σχηματική απεικόνιση των ρόλων του miR-27a/b, συμπεριλαμβανομένων του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων, του μεταβολισμού άλλων λιπιδίων, της εκροής χοληστερόλης και της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων (μπλε πλαίσια). CYP4A1: Κυτόχρωμα P450, οικογένεια 4, υποοικογένεια α, πολυπεπτίδιο 1. C/EBPα: πρωτεΐνη α δεσμευτική του ενισχυτή του CCAAT. PPARG: υποδοχέας που ενεργοποιείται από πολλαπλασιαστές των υπεροξεισωμάτων γ. TRβ1: υποδοχέας θυρεοειδικών ορμονών β1, LPL: λιποπρωτεϊνική λιπάση. ABCA1 και ABCG1: μεταφορέας ATP-binding cassette A1 και G1. SR-B1: υποδοχέας scavenger, κλάση B, μέλος β1.

—|— ΑΝΑΣΤΟΛΗ —————> ΠΡΟΑΓΩΓΗ ■■■■■ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΕΤΕΡΟΔΙΜΕΡΟΥΣ. Chen WJ, Yin K, Zhao GJ, Fu YC, Tang CK. *The magic and mystery of MicroRNA-27 in atherosclerosis*. *Atherosclerosis*. 2012;222(2):314-323. Αναπαράγεται με την ευγενική άδεια των συγγραφέων.

1.2.2. *MiR-33a/b, miR-33a*/b**

Το miR-33 είναι το πιο γνωστό και καλά μελετημένο παράδειγμα miRNA που εμπλέκεται στη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων. Η οικογένεια miR-33 περιλαμβάνει δύο ισομορφές, miR-33a και miR-33b, οι οποίες στον άνθρωπο κωδικοποιούνται από τα γονίδια SREBP. Πιο συγκεκριμένα, το miR-33a βρίσκεται στο 16^ο ιντρόνιο του γονιδίου *Srebf2*, στο χρωμόσωμα 22, ενώ το miR-33b βρίσκεται στο 17^ο ιντρόνιο του γονιδίου *Srebf1*, στο χρωμόσωμα 17. Στα ποντίκια, έχει αποδειχθεί η ύπαρξη ενός μόνο miR-33 στο γονίδιο *Srebf2*, το οποίο είναι συγκρίσιμο με το ανθρώπινο miR-33a. Αυτή η διαπίστωση αποδεικνύει την εξελικτική διατήρηση του miR-33a μεταξύ ειδών [17-20, 13,14].

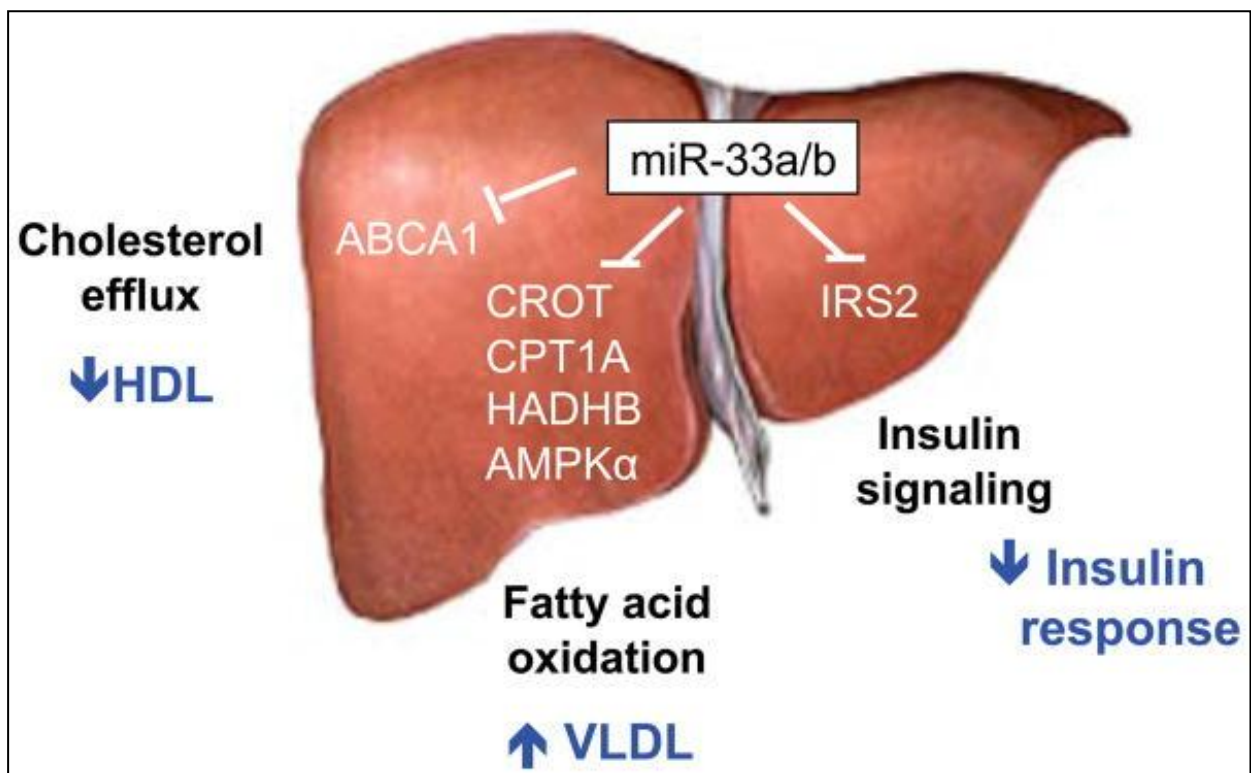
Πολλές έρευνες υπογραμμίζουν την ικανότητα του miR-33 να ρυθμίζει την ομοιόσταση της χοληστερόλης, στοχεύοντας συντηρημένες ακολουθίες στο 3' αμετάφραστο άκρο των γονιδίων *Abca1* και *Abcg1*, τα οποία κωδικοποιούν τους μεταφορείς ATP-binding cassette ABCA1 και ABCG1 αντίστοιχα. Ο μεταφορέας ABCA1 είναι υπεύθυνος για τη μετακίνηση της χοληστερόλης έξω από τα κύτταρα, ενώ ο ABCG1 κινητοποιεί την ελεύθερη χοληστερόλη των κυττάρων σε ώριμα HDL σωματίδια με σκοπό την εκκροή της από τα κύτταρα. Όταν μειώνονται τα επίπεδα των στερολών, το miR-33 αυξάνεται στο ήπαρ προκαλώντας μείωση της έκφρασης των *Abca1* και *Abcg1*, με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της ενδοκυτταρικής χοληστερόλης. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της μείωσης της βιογένεσης των HDL, λόγω της περιορισμένης εκροής χοληστερόλης στα εκκολαπτόμενα (nascent) σωματίδια HDL [13, 14, 17-20]. Στην εικόνα 1.3 συνοψίζονται οι δράσεις του miR-33a/b και τα γονίδια-στόχοι του, τα οποία εμπλέκονται σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια στο ήπαρ.

Αντίθετα, η καταστολή του miR-33 σε ποντίκια αυξάνει την έκφραση των *Abca1* και *Abcg1*, προκαλώντας αυξημένη εκροή χοληστερόλης στα εκκολαπτόμενα σωματίδια HDL και προωθώντας έτσι την αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι σε ποντίκια από τα οποία απουσίαζε ο υποδοχέας LDL η χορήγηση ανταγωνιστή του miR-33 αύξησε την εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα στον ορό, το ήπαρ και τα κόπρανα. Ακόμη, η καταστολή του miR-33 μείωσε τη συσσώρευση λιπιδίων στις αρτηριακές πλάκες και αύξησε τα επίπεδα της χοληστερόλης των HDL στην κυκλοφορία [14].

Σε μια πρόσφατη μελέτη που διεξήχθη στον αφρικανικό πράσινο πίθηκο, χρησιμοποιήθηκε ένα αντινοσηματικό ολιγονουκλεοτίδιο (antisense oligonucleotide - ASO), το οποίο στόχευε τα miR-33a και miR-33b, προκαλώντας αποσιώπησή τους [21]. Το ASO αύξησε την έκφραση του *Abca1* στο ήπαρ και τα επίπεδα της χοληστερόλης

των HDL στο πλάσμα, ευρήματα τα οποία συμφωνούν με τα αποτελέσματα πειραμάτων που διεξήχθησαν σε ποντίκια. Επιπλέον, το ASO οδήγησε σε αυξημένη έκφραση των γονιδίων-στόχων του miR-33 που συμμετέχουν στην οξείδωση των λιπαρών οξέων (*Crot*, *Cpt1a*, *Hadhb* και *Prkaa1*) και μειωμένη έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση των λιπαρών οξέων (*Srebf1*, *Fasn*, *Acly* και *Acaca*). Οι μεταβολές αυτές, οδήγησαν σε μείωση της αφθονίας των VLDL, λόγω μειωμένων επιπέδων apoB και τριγλυκεριδίων των VLDL στο πλάσμα. Το εύρημα αυτό δεν έχει ακόμη παρατηρηθεί σε ποντίκια [21]. Τέλος, σε μια πολύ πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη, παρουσιάστηκαν ευρήματα σχετικά με το ρόλο του miR-33*, ο οποίος παρέμενε άγνωστος μέχρι σήμερα [22]. Οι ερευνητές έδειξαν ότι τα miR-33a* και miR-33b* στοχεύουν στο ίδιο δίκτυο γονιδίων με τα miR-33a και miR-33b, επηρεάζοντας με παρόμοιο τρόπο το μεταβολισμό των λιπιδίων [22].

Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν ότι η φαρμακολογική αναστολή των miR-33a και miR-33b (ή και των miR-33a* και miR-33b*) ή ακόμη και η μείωση των επιπέδων τους μέσω συγκεκριμένης παρέμβασης, θα μπορούσαν να αποτελέσουν θεραπευτική στρατηγική, δεδομένου ότι τα μειωμένα επίπεδα HDL και τα αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων συνδέονται με το μεταβολικό σύνδρομο, την αθηροσκλήρωση και, κατ' επέκταση, με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο.



Εικόνα 1.3: Τα γονίδια-στόχοι των miR-33a/b στο ήπαρ και ο ρόλος τους στα μεταβολικά μονοπάτια του ήπατος. Συνοπτικά, η έκφραση του miR-33a ή b στο ήπαρ μειώνει την έκφραση του μεταφορέα ABCA1, με αποτέλεσμα τη μείωση της εκροής χοληστερόλης από τα κύτταρα και τη μείωση της HDL. Επιπλέον, τα miR-33a/b μειώνουν την οξείδωση των λιπαρών οξέων και αυξάνουν τα επίπεδα των VLDL, στοχεύοντας τα γονίδια CROT, Cpt1a, HADHB και AMPKα. Τέλος, τα miR-33a/b αναστέλλουν την έκφραση του IRS2, με ακόλουθο αποτέλεσμα τη διατάραξη της σηματοδότησης της ινσουλίνης. Rayner KJ, Fernandez-Hernando C, Moore KJ. *MicroRNAs regulating lipid metabolism in atherogenesis*. Thromb Haemost. 2012;107(4):642-647. Αναπαράγεται με την ευγενική άδεια των συγγραφέων.

1.2.3. *MiR-143*

Τα υπάρχοντα ερευνητικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι το miR-143 συμμετέχει στη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων [13, 23, 24]. Η ερευνητική ομάδα της Esau και των συνεργατών της έδειξε ότι τα επίπεδα του miR-143 αυξήθηκαν σε διαφοροποιούμενα λιποκύτταρα, ενώ η αναστολή της έκφρασης του miR-143 είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων [23]. Η αναστολή της έκφρασης του miR-143 επιτεύχθηκε μέσω της μεταφοράς ASO σε καλλιεργούμενα ανθρώπινα προλιποκύτταρα. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι τα κύτταρα στα οποία είχε μεταφερθεί το ASO παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης ERK5, το γονίδιο της οποίας έχει προταθεί ως στόχος του miR-143 [23]. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι το miR-143 εμπλέκεται στη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων και πιθανότατα δρα μέσω του γονιδίου *ERK5*.

Ο ρόλος του miR-143 στη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων επαληθεύτηκε σε μια πρόσφατη έρευνα, κατά την οποία μελετήθηκε η διαφοροποίηση των ενδομυϊκών λιποκυττάρων σε βοοειδή [25]. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι τα προλιποκύτταρα ήταν δυνατό να διαφοροποιηθούν σε ώριμα λιποκύτταρα με αύξηση της έκφρασης του miR-143. Επιπλέον, η μεταφορά του ASO στα προλιποκύτταρα προκάλεσε σημαντική μείωση της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων, κάτι που έγινε αντιληπτό μέσω της μειωμένης συσσώρευσης σταγονιδίων λίπους και της μειωμένης έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων, όπως το C/EBPα και το FABP-4, τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που δεσμεύουν τα λιπαρά οξέα [25].

Επιπλέον, πειράματα σε ποντίκια τα οποία ακολούθησαν διαιτολόγιο υψηλό σε λίπος έδειξαν αύξηση της έκφρασης του miR-143 στο μεσεντέριο λίπος [26]. Η αύξηση αυτή συσχετίστηκε με αυξημένο σωματικό βάρος και αυξημένο βάρος μεσεντέριου λίπους. Επιπλέον, τα επίπεδα του miR-143 συσχετίστηκαν με τα επίπεδα έκφρασης δεικτών διαφοροποίησης των λιποκυττάρων, όπως ο PPARγ και ο aP2, καθώς και με τα επίπεδα λεπτίνης του πλάσματος, μιας από τις σημαντικότερες λιποκυτταροκίνες που σχετίζονται με την ευαισθησία στην ινσουλίνη [26].

Τα ανωτέρω ευρήματα δείχνουν ότι το miR-143 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων και η καταστολή ή μείωση της έκφρασής του ενδεχομένως να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο για την αντιμετώπιση της παχυσαρκίας και των μεταβολικών νοσημάτων.

1.2.4. miR-146a

Ο ρόλος του miR-146a στη ρύθμιση των λιπιδίων έχει συνδεθεί με τη συσσώρευση της οξειδωμένης LDL (oxLDL) και τη φλεγμονώδη απόκριση στα μακροφάγα [27-28]. Έχει αποδειχθεί ότι η έκφραση του miR-146a στα μακροφάγα μειώνεται κάτω από συνθήκες διέγερσης από την οξειδωμένη LDL [27]. Επιπρόσθετα, το miR-146a προκαλεί σημαντική μείωση της ενδοκυτταρικής χοληστερόλης των LDL των μακροφάγων και μείωση της έκκρισης των ιντερλευκινών 6 και 8 [27]. Ο υποδοχέας τύπου Toll-4 (TLR4) αποτελεί γονίδιο-στόχο του miR-146a. Έτσι, το miR-146a αναστέλλει την ενεργοποίηση των εξαρτώμενων από τον TLR4 ενδοκυτταρικών μονοπατιών σηματοδότησης, τα οποία συμμετέχουν στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, στην πρόσληψη λιπιδίων από τα κύτταρα και στη φλεγμονώδη έκκριση κυτταροκινών [27]. Επιπλέον, το miR-146a ρυθμίζει την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών στα δενδριτικά κύτταρα, στοχεύοντας το γονίδιο CD40L στα διεγερθέντα από την oxLDL δενδριτικά κύτταρα [28].

Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι το miR-146a συμβάλλει στη ρύθμιση της συσσώρευσης της oxLDL και της φλεγμονώδους απόκρισης, ρυθμίζοντας αρνητικά τον υποδοχέα TLR4 και, ως εκ τούτου, αναστέλλοντας την ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών που εξαρτώνται από τον TLR4. Η υπερέκφραση του miR-146a ενδεχομένως να είναι χρήσιμη στην πρόληψη και τη θεραπεία της αθηροσκλήρωσης [27].

1.2.5. MiR-335

Σύγχρονα ερευνητικά δεδομένα υποστηρίζουν την πιθανότητα συμμετοχής του miR-335 στη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων και στη συσσώρευση ενδοκυτταρικών λιπιδίων [29]. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η έκφραση του miR-335 στο ήπαρ και στο λευκό λιπώδη ιστό (WAT) ήταν αυξημένη σε παχύσαρκα ποντίκια. Η αυξημένη έκφραση του miR-335 συσχετίστηκε με αυξημένο βάρος σώματος, ήπατος και WAT, καθώς και με αυξημένα επίπεδα ηπατικών τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης. Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης του miR-335 συσχετίστηκαν ισχυρά με τα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων δεικτών διαφοροποίησης των λιποκυττάρων, όπως ο PPAR γ , ο aP2 και ο FAS, σε λιποκύτταρα της σειράς 3T3-L1 [29].

Οι ερευνητές θεώρησαν ότι η αύξηση των επιπέδων του miR-335 στα παχύσαρκα ποντίκια είχε ισχυρή συσχέτιση με τις μεταβολικές διαταραχές που συνοδεύουν την παχυσαρκία, επισημαίνοντας ότι η αύξηση αυτή εμφανίστηκε ως απόκριση στον αυξημένο όγκο των συσσωρευθέντων λιπών [29]. Τα ευρήματα αυτά

παρείχαν την πρώτη ένδειξη ότι τα αυξημένα επίπεδα του miR-335 στο ήπαρ και τον WAT σε παχύσαρκα ποντίκια μπορεί να εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της παχυσαρκίας [29].

1.2.6. MiR-370

Το miR-370 ασκεί έμμεση επίδραση στο μεταβολισμό των λιπιδίων, αυξάνοντας την έκφραση του miR-122 και των γονιδίων-στόχων του [30]. Το hsa-miR-370 έχει άμεση ανασταλτική δράση στο γονίδιο CPT1A σε ηπατοκύτταρα Hep2G, επιδρώντας με αυτό τον τρόπο στη β-οξείδωση [30]. Επίσης, αποτελεί στόχο του miR-122, ενώ επιδρά άμεσα στο γονίδιο SREBF-1c [30].

Ακόμη, το miR-370 προκαλεί αναστολή τριών ενζύμων σε κύτταρα Hep2G in vitro: της O-ακυλοτρανσφεράσης 2 της διακυλογλυκερόλης (DGAT2), της συνθάσης των λιπαρών οξέων (FAS), και της καρβοξυλάσης 1 του ακετυλο-CoA (ACACA) [30]. Οι αλλαγές στα γονίδια FASN και ACACA φαίνεται ότι διαμεσολαβούνται από τις επιδράσεις του miR-370 στην SREBF και την DGAT2 [30]. Τέλος, έχει βρεθεί ότι το miR-370 επιδρά στην αύξηση των ηπατικών τριγλυκεριδίων και της χοληστερόλης σε ποντίκια [30].

1.2.7. miR-378/378*

Τα miR-378/378* βρίσκονται στο 1^ο ιντρόνιο του γονιδίου PGC-1β (Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1β) και εμπλέκονται στη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων και τη λιπογένεση [31, 32]. Υψηλά επίπεδα έκφρασης των miR-378/378* και του PGC-1β έχουν βρεθεί στο φαιό λιπώδη ιστό, στην καρδιά και στους σκελετικούς μύες [31]. Χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης έχουν ανιχνευθεί και σε άλλους ιστούς, όπως στο WAT [31]. Κατά τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων παρατηρείται επαγωγή του miR-378/378*, ενώ υπερέκφραση του miR-378/378* οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης της FAS και της de novo λιπογένεσης, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση τριγλυκεριδίων στα λιποκύτταρα [31].

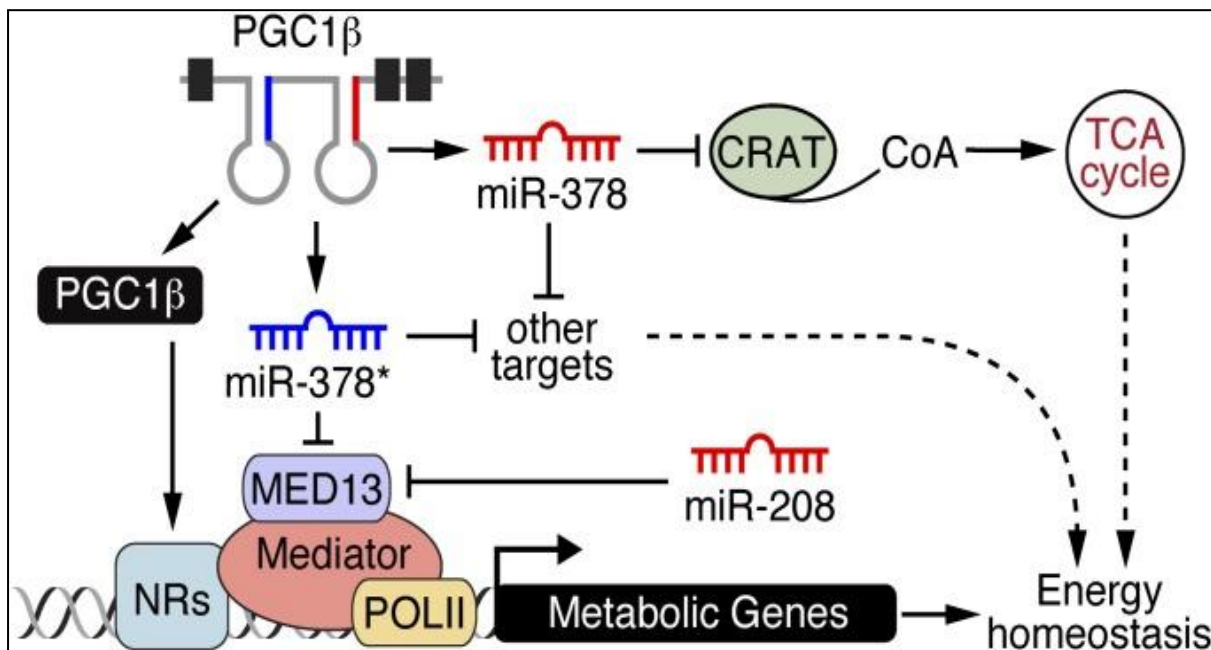
Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η καταστολή της έκφρασης των miR-378/378* μέσω ASO προκαλεί μείωση της σύνθεσης τριγλυκεριδίων και φωσφολιπιδίων [31]. Οι ερευνητές επισημαίνουν ότι δεν είναι ακόμη ξεκάθαρο εάν τα παραπάνω αποτελέσματα οφείλονται στη δράση του miR-378 ή του miR-378*, λόγω του ότι η διάσπαση του ενός από τους δύο κλώνους (miR-378 ή miR-378*) επηρεάζει την έκφραση και/ή τη σταθερότητα του άλλου [31]. Ωστόσο, εκτιμούν ότι καθένα από τα δυο miRNA συνεισφέρει ανεξάρτητα στο μεταβολισμό των λιπιδίων [31].

Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα παρουσιάζουν τα miR-378/378* ως «αναπόσπαστα» συστατικά ενός ρυθμιστικού κυκλώματος, το οποίο λειτουργεί κάτω από συνθήκες μεταβολικού στρες και στοχεύει στον έλεγχο της ενεργειακής ομοιόστασης και της ολικής οξειδωτικής ικανότητας των ιστών-στόχων της ινσουλίνης [32]. Σύμφωνα με τα ευρήματα της συγκεκριμένης έρευνας, ποντίκια από τα οποία απουσίαζαν τα miR-378/378* ήταν ανθεκτικά στην παχυσαρκία που επάγεται μέσω δίαιτας υψηλής σε λίπη, ενώ επιπροσθέτως παρουσίασαν αυξημένο μιτοχονδριακό μεταβολισμό λιπαρών οξέων και αυξημένη οξειδωτική ικανότητα στους ιστούς-στόχους της ινσουλίνης [32].

Μεταξύ των γονιδίων-στόχων των miR-378/378* συμπεριλαμβάνονται η ακετυλοτρανσφεράση της καρνιτίνης (carnitine O-acetyltransferase), γνωστό ένζυμο το οποίο συμμετέχει στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, και το συστατικό MED13 του συμπλέγματος διαμεσολάβησης (Mediator complex), το οποίο ελέγχει τη δραστηριότητα των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων (εικόνα 1.4) [32]. Η έκφραση των γονιδίων αυτών καταστέλλεται παρουσία των miR-378/378*, ενώ αυξάνεται απουσία αυτών, αποτέλεσμα το οποίο διαπιστώθηκε στο ήπαρ ποντικών [32].

Βάσει των ανωτέρω ευρημάτων, διαπιστώνουμε ότι τα miR-378/378* θα μπορούσαν να αποτελέσουν στόχους για τη θεραπεία της παχυσαρκίας και του μεταβολικού συνδρόμου, μέσω αναστολής ή μείωσης της έκφρασής τους.

Εκτός από τα παραπάνω miRNA, τα οποία αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης της παρούσας έρευνας, υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία και άλλων, που δρουν σε διάφορα μονοπάτια του μεταβολισμού των λιπιδίων, ενώ ο κατάλογος των «miRNA του μεταβολισμού» αυξάνεται συνεχώς. Στον πίνακα 1.1 φαίνονται συνοπτικά οι λειτουργίες των miRNA που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπιδίων και έχουν εδραιωθεί πειραματικά μέχρι σήμερα (συμπεριλαμβανομένων και αυτών που αναλύθηκαν παραπάνω).



Εικόνα 1.4: Σχηματική απεικόνιση των ρόλων των miR-378 και miR-378* στην ενεργειακή ομοιόσταση και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων. Ο PGC1β είναι ένας μεταγραφικός συνενεργοποιητής των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων (NRs), ο οποίος ρυθμίζει το μεταβολισμό μέσω του συμπλέγματος διαμεσολάβησης (Mediator complex) και της βασικής μεταγραφικής μηχανής. Ο MED13 είναι υπομονάδα του συμπλέγματος διαμεσολάβησης και αποτελεί στόχο του miR-378*, ενώ το γονίδιο CRAT (ακετυλοτρανσφεράση της καρνιτίνης) αποτελεί στόχο του miR-378. Η ακετυλοτρανσφεράση της καρνιτίνης είναι ένα μιτοχονδριακό ένζυμο που συμμετέχει στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων και στον οξειδωτικό μεταβολισμό. Έτσι, τα miR-378 και 378* αποτελούν αναπόσπαστα συστατικά ενός ρυθμιστικού κυκλώματος, το οποίο λειτουργεί κάτω από συνθήκες μεταβολικού στρες, με σκοπό να ελέγχει τη συνολική οξειδωτική ικανότητα των ιστών-στόχων της ινσουλίνης. Carrer M, Liu N, Grueter CE, Williams AH, Frisard MI, Hulver MW, Bassel-Duby R, Olson EN. *Control of mitochondrial metabolism and systemic energy homeostasis by microRNAs 378 and 378**. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012; 109(38):15330-15335. Αναπαράγεται με την ευγενική άδεια των συγγραφέων.

Πίνακας 1.1: Βασικές λειτουργίες των miRNA που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπιδίων και έχουν εδραιωθεί πειραματικά μέχρι σήμερα.

miRNA	Ρόλος στο μεταβολισμό των λιπιδίων	Βιβλιογραφικές αναφορές
miR-27a/b	1. Λιπογένεση 2. Ρύθμιση δραστηριότητας της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (LPL)	[13-16]
miR-29a	1. Ρύθμιση δραστηριότητας της LPL 2. Κυτταρική πρόσληψη λιπών	[14]
miR-33a/b miR-33a*/b*	1. Βιογένεση των HDL - Ρύθμιση χοληστερόλης στην κυκλοφορία 2. Ενδοκυτταρική μεταφορά χοληστερόλης 3. Εκροή χοληστερόλης από τα κύτταρα 4. Μεταβολισμός λιπαρών οξέων	[13,14, 17-22]
miR-103	1. Πιθανή συμμετοχή στη ρύθμιση της σύνθεσης του συνενζύμου A (CoA)	[14]
miR-107	1. Πιθανή συμμετοχή στη ρύθμιση της σύνθεσης του CoA	[14]
miR-122	1. Σύνθεση λιπαρών οξέων 2. Σύνθεση χοληστερόλης	[13,14, 17-20]
miR-143	1. Διαφοροποίηση λιποκυττάρων	[13, 23-26]
miR-144	1. Ρύθμιση επιπέδων χοληστερόλης HDL	[33]
miR-146a	1. Ρύθμιση συσσώρευσης οξειδωμένης LDL 2. Φλεγμονώδης απόκριση στα μακροφάγα	[27,28]
miR-168a	1. Απομάκρυνση χοληστερόλης LDL από τα κύτταρα	[14]
miR-302a	1. Σύνθεση λιπαρών οξέων	[14]
miR-335	1. Διαφοροποίηση λιποκυττάρων 2. Ρύθμιση συσσώρευσης λιπιδίων	[29]
miR-370	1. Ρύθμιση β-οξειδωσης λιπαρών οξέων 2. Βιοσύνθεση λιπαρών οξέων και τριγλυκεριδίων	[17,18,30]
miR-378/378*	1. Ρύθμιση λιπογένεσης 2. Βιοσύνθεση λιπαρών οξέων και τριγλυκεριδίων	[13,14,31,32]
miR-613	1. Σύνθεση λιπαρών οξέων	[14]
miR-758	1. Εκροή χοληστερόλης από τα κύτταρα 2. Έναρξη σχηματισμού HDL-c	[18,20]

1.3. Η σωματική άσκηση μεταβάλλει την έκφραση των miRNA

Η μελέτη της απόκρισης των ζώων στη σωματική άσκηση έχει οδηγήσει σε μια τεράστια ποικιλία ευρημάτων, που υποστηρίζουν ότι η φυσιολογική προσαρμογή στην άσκηση συνοδεύεται από μεταβολές στην έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων [9]. Ωστόσο, η περιπλοκότητα των γονιδιακών αλληλεπιδράσεων περιορίζει την ξεκάθαρη αναγνώριση αυτών των γονιδίων, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει τη μεταβλητότητα των αποκρίσεων στην άσκηση [9]. Επιπλέον, η γονιδιακή έκφραση αλλάζει ανάλογα με το ερέθισμα που δέχεται το σώμα, κατεύθυνση στην οποία η μελέτη των miRNA φαίνεται να συμβάλλει σημαντικά [9].

Η επίδραση της άσκησης στην έκφραση των miRNA αποτελεί ένα καινούργιο και ιδιαίτερα ενδιαφέρον ερευνητικό πεδίο, το οποίο εξελίσσεται ταχύτατα τα τελευταία δύο χρόνια. Τα επίπεδα των miRNA έχουν μελετηθεί τόσο σε ιστούς και όργανα (π.χ. σκελετικοί μύες, καρδιά) όσο και σε βιολογικά υγρά (π.χ. αίμα), μετά από διαφορετικά είδη άσκησης. Στην παρούσα ενότητα θα αναφερθούν συνοπτικά τα ερευνητικά δεδομένα που έχουν δημοσιευτεί μέχρι σήμερα σχετικά με το θέμα αυτό, με ιδιαίτερη έμφαση στα ευρήματα που αφορούν σε βιολογικά υγρά.

1.3.1. Η επίδραση της άσκησης στην έκφραση των miRNA σε ιστούς και όργανα

Ο σκελετικός μυς είναι ένα όργανο με υψηλή πλαστικότητα, ικανό να τροποποιεί το φαινότυπό του αποκρινόμενο στη μηχανική υπερφόρτωση [9]. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι τόσο η αερόβια άσκηση όσο και η άσκηση με αντιστάσεις επιφέρουν αλλαγές στο προφίλ συγκεκριμένων miRNA στους σκελετικούς μύες [9].

Στους σκελετικούς μύες εκφράζονται πολλά miRNA, εκ των οποίων τα miR-1, 133a, 133b και 206 αποτελούν το 25% του συνόλου, γι' αυτό και συχνά αναφέρονται ως myomiRs [34]. Έχει βρεθεί ότι, σε υγιή άτομα, τα τέσσερα αυτά miRNA μειώνονται σημαντικά μετά από 12 εβδομάδες αερόβια προπόνησης, γεγονός που αποδεικνύει την ικανότητα των miRNA να προσαρμόζονται γρήγορα σε αλλαγές της σωματικής δραστηριότητας [35]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα μειωμένα αυτά επίπεδα έκφρασης επανέρχονται στις αρχικές τους τιμές έπειτα από 14 ημέρες διακοπής της προπόνησης [35]. Επιπλέον, κατά την αξιολόγηση της απόκρισής τους σε μία συνεδρία άσκησης (οξεία άσκηση), διαπιστώθηκε αύξηση της έκφρασης του miR-1 και του miR-133a μόνο πριν την περίοδο προπόνησης [35].

Όσον αφορά στην άσκηση με αντιστάσεις, η προκαλούμενη από αυτήν αύξηση της μυϊκής μάζας παρουσιάζει εξαιρετικά υψηλή μεταβλητότητα μεταξύ των ατόμων [9].

Η μεταβλητότητα αυτή συνδέεται με μεταβολές στην έκφραση των miRNA [9]. Σε μια έρευνα κατά την οποία πραγματοποιήθηκε ανάλυση βιοψιών του έξω πλατέος μυός (*vastus lateralis*) σε 56 άτομα που βρίσκονταν σε πρόγραμμα προπόνησης με αντιστάσεις για 12 εβδομάδες, διαπιστώθηκε ότι η έκφραση του miR-378 μειώθηκε και του miR-478 αυξήθηκε [34]. Και οι δυο αυτές μεταβολές εμφανίστηκαν μόνο στους συμμετέχοντες που παρουσίασαν χαμηλή απόκριση στην προπόνηση [34]. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα στη μεταβλητότητα της έκφρασης του miR-378 και την αύξηση της άλιπης μάζας σώματος [34]. Όσον αφορά στα *myomiRs*, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης δεν έδειξαν μεταβολές στην έκφραση των miR-1 και miR-133 μετά από την προπόνηση [34].

Σε μια πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη, όπου διερευνήθηκε η επίδραση της αερόβιας προπόνησης 10 εβδομάδων στην έκφραση των miRNA που εμπλέκονται στην αιμάτωση, βρέθηκαν μεταβολές στα miR-16 και 21 [36]. Πιο αναλυτικά, η αερόβια προπόνηση μείωσε τα επίπεδα των miR-16 και miR-21 στους σκελετικούς μύες υπερτασικών επιμύων, με αποτέλεσμα την αύξηση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) και της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 [36]. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η αερόβια προπόνηση προάγει την περιφερειακή επαναγγειοποίηση σε καταστάσεις υπέρτασης, δράση η οποία επιτυγχάνεται μέσω της ρύθμισης των miRNA, προτείνοντας έναν πιθανό μηχανισμό ο οποίος θα μπορούσε να εφαρμοστεί στη θεραπεία των αγγειακών νοσημάτων [36].

Εκτός από τις μελέτες που ασχολήθηκαν με τα miRNA των σκελετικών μυών, ερευνητικά δεδομένα έχουν δημοσιευτεί σχετικά με τα miRNA της καρδιάς και τη μεταβολή της έκφρασής τους μετά από διαφορετικά πρωτόκολλα άσκησης [37-39]. Βέβαια, γίνεται κατανοητό ότι τέτοιου είδους μελέτες μπορούν να διεξαχθούν μόνο σε πειραματόζωα και για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται συνήθως επίμυες. Ο Fernandes και οι συνεργάτες του μελέτησαν τα συστήματα ρενίνης-αγγειοτενσίνης στην καρδιά επιμύων οι οποίοι προηγουμένως ακολούθησαν προπόνηση κολύμβησης [37]. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η προπόνηση προκάλεσε αύξηση των επιπέδων των miR-27a και 27b, τα οποία ρυθμίζουν το γονίδιο του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (ACE), και μείωση στα επίπεδα του miR-143, το οποίο στοχεύει το γονίδιο του ενζύμου ACE2 στην καρδιά [37].

Σε παρόμοια έρευνα διαπιστώθηκε μείωση της έκφρασης των miR-1, 133a και 133b, η οποία σχετίζεται με την προκαλούμενη από την αερόβια προπόνηση καρδιακή υπερτροφία [38]. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης των miR-29a και 29c, η οποία συσχετίστηκε με σημαντική μείωση της έκφρασης των γονιδίων του κολλαγόνου

I και III (COLIAI και COLIIIAI) και, κατ' επέκταση, με τη βελτίωση της κοιλιακής ελαστικότητας της καρδιάς [38]. Τέλος, σύμφωνα με πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα, η αερόβια προπόνηση προωθεί την αύξηση της έκφρασης του miR-126 στην καρδιά, αύξηση η οποία σχετίζεται με την καρδιακή αγγειογένεση που επάγεται από την άσκηση [39]. Η δράση του miR-126 στην αγγειογένεση επιτυγχάνεται μέσω της έμμεσης ρύθμισης του μονοπατιού του VEGF και της άμεσης ρύθμισης των γονιδίων-στόχων του, με τελικό αποτέλεσμα την ενίσχυση των μονοπατιών της αγγειογένεσης [39].

Τέλος, εντυπωσιακό είναι το εύρημα ότι η αερόβια άσκηση (τόσο η χαμηλής όσο και η υψηλής έντασης), προκάλεσε σημαντική αύξηση της έκφρασης του miR-124, το οποίο εμπλέκεται στη διαφοροποίηση των νευρώνων στον ιππόκαμπο του εγκεφάλου αρσενικών επιμύων [40].

1.3.2. Η επίδραση της άσκησης στην έκφραση των miRNA που περιέχονται σε βιολογικά υγρά

Το βιολογικό υγρό που έχει μελετηθεί στις περισσότερες έρευνες έκφρασης των miRNA είναι το αίμα (πλάσμα και λευκοκύτταρα) [41-46]. Τα πρώτα ερευνητικά δεδομένα δημοσιεύτηκαν από τον Radom-Aizik και την ομάδα του και αφορούσαν στην επίδραση της οξείας, σύντομης, αερόβιας άσκησης (δέκα δίλεπτες συνεδρίες σε κυκλοεργόμετρο) στη γονιδιακή έκφραση των ουδετερόφιλων της κυκλοφορίας, σε δείγμα 11 ανδρών [41]. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η άσκηση τροποποίησε σημαντικά την έκφραση 38 συνολικά miRNA, μειώνοντας την έκφραση 20 και αύξησε την έκφραση 18 [41]. Τα μεταβληθέντα miRNA βρέθηκε ότι στοχεύουν αρκετές χιλιάδες γονίδια, τα οποία επηρεάζουν διάφορες διεργασίες, συμπεριλαμβανομένων της φλεγμονής, της σηματοδότησης της ινσουλίνης, της σηματοδότησης TGF-β και MAPK, του μεταβολισμού των λιπιδίων και του καρκίνου [41].

Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη της ίδιας ερευνητικής ομάδας, εξετάστηκε η επίδραση σύντομων συνεδριών έντονης άσκησης στην έκφραση των miRNA, σε μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMC) 12 νέων ανδρών [42]. Διαπιστώθηκε ότι η άσκηση προκάλεσε μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης 34 miRNA, πολλά από τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις [42]. Πιο αναλυτικά, η μικρής διάρκειας, έντονη άσκηση μείωσε την έκφραση του miR-125b και αύξησε την έκφραση του miR-132 [42]. Οι μεταβολές αυτές σχετίζονται με 12 συγκεκριμένα μονοπάτια σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένων των TGF-β και MAPK [42]. Επιπλέον, οι ερευνητές σύγκριναν τις μεταβολές των miRNA στα PBMC με εκείνες που παρατηρήθηκαν στα ουδετερόφιλα [41] και διαπίστωσαν ότι 9 miRNA

επηρεάστηκαν και στις δύο περιπτώσεις, αλλά μόνο 6 μεταβλήθηκαν προς την ίδια κατεύθυνση [42]. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η άσκηση επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο την έκφραση των miRNA σε διαφορετικούς τύπους λευκοκυττάρων του αίματος [42].

Σε μια ακόμη μελέτη από την ανωτέρω ερευνητική ομάδα, βρέθηκε ότι η οξεία άσκηση επιφέρει αλλαγές στην έκφραση των miRNA των κυττάρων φυσικών φονέων (natural killers) του ανοσοποιητικού συστήματος [43]. Οι φυσικοί φονείς είναι κύτταρα του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος, ο αριθμός των οποίων αυξάνεται έως και πέντε φορές στην κυκλοφορία μετά από σύντομη σωματική άσκηση [43]. Το πρωτόκολλο της άσκησης που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν 10 δίλεπτες συνεδρίες σε κυκλοεργόμετρο, με διάλειμμα ενός λεπτού μεταξύ των συνεδριών. Πριν και αμέσως μετά τη διεξαγωγή της άσκησης, ελήφθησαν δείγματα αίματος από τους 13 συμμετέχοντες και ακολούθησε απομόνωση των κυττάρων φυσικών φονέων. Διαπιστώθηκε ότι η άσκηση επηρέασε σημαντικά την έκφραση 23 miRNA και 986 γονιδίων [43]. Επιπλέον, βρέθηκαν μονοπάτια που συνδέουν αυτά τα γονίδια και τα miRNA. Τα μονοπάτια αυτά σχετίζονται κυρίως με διάφορους τύπους καρκίνου και με την κυτταρική επικοινωνία [43]. Τα ανωτέρω δεδομένα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η άσκηση επηρεάζει το πρότυπο έκφρασης των miRNA και διαφόρων γονιδίων στον πληθυσμό των κυττάρων φυσικών φονέων και υποδεικνύουν μηχανισμούς μέσω των οποίων η σωματική άσκηση θα μπορούσε να βελτιώσει την υγεία επιδρώντας στο έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα.

Ο Baggish και οι συνεργάτες του μελέτησαν την επίδραση της οξείας, εξαντλητικής άσκησης και της προπόνησης κωπηλασίας στην έκφραση miRNA που εμπλέκονται στην αγγειογένεση (miR-20a, miR-210, miR-221, miR-222, miR-328), τη φλεγμονή (miR-21, miR-146a), τη συστατικότητα του σκελετικού και του καρδιακού μυός (miR-21, miR-133a) και την προσαρμογή στην υποξία και την ισχαιμία (miR-21, miR-146a, miR-210), σε αθλητές κωπηλασίας [44]. Ως βιολογικό υλικό χρησιμοποιήθηκε το πλάσμα του αίματος, δεδομένου ότι στόχος των ερευνητών ήταν η μελέτη των miRNA της κυκλοφορίας (c-miRNA). Τα αποτελέσματα έδειξαν 4 διαφορετικά μοτίβα απόκρισης των c-miRNA στην άσκηση: (1) c-miRNA των οποίων η έκφραση αυξήθηκε μετά από την οξεία άσκηση τόσο πριν όσο και μετά την προπόνηση (miR-146a και miR-222), (2) c-miRNA που αποκρίθηκαν στην οξεία άσκηση πριν αλλά όχι μετά την προπόνηση (miR-21 και miR-221), (3) c-miRNA που αποκρίθηκαν μόνο στο πρόγραμμα προπόνησης (miR-20a) και (4) μη αποκρινόμενα c-miRNA (miR-133a, miR-210, miR-328) [44]. Γραμμικές συσχετίσεις παρατηρήθηκαν μεταξύ των μέγιστων

επιπέδων του miR-146a μετά την άσκηση και της μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου (VO_{2max}), καθώς και μεταξύ των μεταβολών στα επίπεδα ηρεμίας του miR-20a και των μεταβολών της VO_{2max} με την προπόνηση [44]. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι τα c-miRNA θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες της άσκησης, ενώ φαίνεται ότι διαδραματίζουν κάποιο ρόλο ως φυσιολογικοί μεσολαβητές της καρδιαγγειακής προσαρμογής που επάγεται από την άσκηση.

Επιπλέον, ερευνητικά δεδομένα έχουν δείξει ότι η έκφραση των miR-126 και miR-133 στην κυκλοφορία μεταβάλλεται μετά από διαφορετικά είδη άσκησης αντοχής σε υγιείς ενήλικες. Το εύρημα αυτό προέκυψε ως αποτέλεσμα μελέτης η οποία στόχευε να διερευνήσει τη συγκέντρωση των ανωτέρω miRNA σε σχέση με την καταστροφή των ενδοθηλιακών κυττάρων και τη μυϊκή βλάβη [45]. Τα είδη άσκησης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: (1) δοκιμασία μέγιστης εξαντλητικής προσπάθειας, (2) ποδηλασία διάρκειας 4 ωρών, (3) τρέξιμο σε μαραθώνιο, και (4) άσκηση με αντιστάσεις. Οι δύο πρώτες δοκιμασίες προκάλεσαν σημαντική αύξηση του miR-126, ενώ η συγκέντρωση του miR-133 παρέμεινε αμετάβλητη. Μετά το τέλος του μαραθωνίου διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση και στα δύο μελετώμενα miRNA, ενώ η άσκηση με αντιστάσεις προκάλεσε αύξηση του miR-133, αφήνοντας ανεπηρέαστη τη συγκέντρωση του miR-126 [45]. Η αύξηση του miR-126 συνδέθηκε με την καταστροφή του στρώματος των ενδοθηλιακών κυττάρων μετά την αερόβια άσκηση (πρωτόκολλα 1-3), ενώ η άσκηση με αντιστάσεις (πρωτόκολλο 4) δεν είχε καμία επίδραση στα ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά οδήγησε σε καταστροφή μυϊκών κυττάρων, όπως αποδείχτηκε από τα αυξημένα επίπεδα του miR-133 στο πλάσμα, το οποίο αποτελεί δείκτη μυϊκής καταστροφής [45].

Τέλος, σε μια παρόμοια έρευνα [46], όπου εξετάστηκε η επίδραση της οξείας (60 min ποδηλασία στο 70% της VO_{2max}) και χρόνιας (4 εβδομάδες ποδηλασία, 3 φορές την εβδομάδα) αερόβιας άσκησης, διαπιστώθηκε ότι το miR-486 του ορού μειώθηκε σημαντικά και στις δυο μορφές άσκησης, σηματοδοτώντας μεταβολικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της άσκησης, αλλά και προσαρμογές που οφείλονται στην προπόνηση. Τα miRNA που μελετήθηκαν (miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-208b, miR-486 και miR-499) εκφράζονται κυρίως στα μυϊκά κύτταρα [34, 46]. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι έχουν τη δυνατότητα να ρυθμίζουν τη λειτουργία και άλλων ιστών, μετά από έκκρισή τους στην κυκλοφορία του αίματος [46]. Έτσι, οι ερευνητές θέλησαν να μελετήσουν τα miRNA των μυών στην κυκλοφορία, προσδιορίζοντας τη συγκέντρωσή τους στον ορό του αίματος νέων ανδρών πριν και μετά την άσκηση [46]. Διαπιστώθηκε ότι η συγκέντρωση όλων των προαναφερθέντων miRNA, εκτός από το miR-486, ήταν πολύ

χαμηλή στο πλάσμα, επομένως η έκκρισή τους από τα μυϊκά κύτταρα στην κυκλοφορία είναι επίσης χαμηλή [46].

Συμπερασματικά, σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, η σωματική άσκηση μεταβάλλει την έκφραση πληθώρας miRNA, τα οποία εμπλέκονται σε διάφορες φυσιολογικές διεργασίες, μερικές από τις οποίες είναι η προσαρμογή του οργανισμού στην προπόνηση, η αγγειογένεση και η καρδιακή υπερτροφία, η διαφοροποίηση των νευρώνων και η φλεγμονή. Έτσι, γίνεται πλέον κατανοητό ότι πολλά miRNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες της άσκησης, δεδομένου ότι τα επίπεδά τους έχουν συσχετιστεί με πολλές αποκρίσεις του οργανισμού στην άσκηση (π.χ. καρδιαγγειακή προσαρμογή, βελτίωση ανοσοποιητικού συστήματος, καταστροφή ενδοθηλιακών και μυϊκών κυττάρων). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα επίπεδα κάποιων miRNA έχουν συσχετιστεί με την VO_{2max} [44, 47] και επομένως θα μπορούσαν μελλοντικά να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες της φυσικής κατάστασης.

1.4. Η αφθονία των miRNA στα βιολογικά υγρά

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει την παρουσία σε εξωκυτάρια υγρά, όπως πλάσμα, ορός, σάλιο και ούρα, ορισμένων miRNA τα οποία προηγουμένως είχαν εντοπιστεί σε κύτταρα και ιστούς [48-53]. Η ταυτότητα και τα επίπεδα των «εξωκυτταρικών» miRNA παρουσιάζουν μεταβολές οι οποίες συσχετίζονται με νοσήματα ή βλάβες του οργανισμού [53]. Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει ότι τα miRNA που εντοπίζονται στα διάφορα εξωκυτταρικά υγρά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες μέσω των οποίων θα ήταν δυνατή η αξιολόγηση πιθανών παθοφυσιολογικών καταστάσεων του σώματος [53].

Το φάσμα των miRNA σε 12 εξωκυτάρια υγρά μελετήθηκε σε μια πρόσφατη έρευνα, όπου προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του ολικού RNA και τα επιμέρους miRNA [53]. Ο μεγαλύτερος αριθμός miRNA βρέθηκε στο σάλιο, στο μητρικό γάλα και στο σπερματικό υγρό (πίνακας 1.2), ενώ το πλάσμα και το σάλιο διαπιστώθηκε ότι έχουν το μεγαλύτερο αριθμό μοναδικών miRNA. Αξιοσημείωτο είναι το εύρημα ότι το πλάσμα και το σάλιο έχουν μεγάλο αριθμό κοινών miRNA, το οποίο ενδεχομένως είναι αποτέλεσμα ανταλλαγής μεταξύ των δυο υγρών [53].

Πίνακας 1.2: Συγκέντρωση RNA και αριθμός miRNA σε 12 διαφορετικά βιολογικά υγρά του ανθρώπου. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K. *The microRNA spectrum in 12 body fluids*. Clin Chem. 2010;56(11):1733-1741.

Βιολογικό υγρό	Ολικό RNA, μg/L	Αριθμός ανιχνευθέντων miRNA
Αμνιακό υγρό	570	359
Μητρικό γάλα	47240	429
Βρογχικό έκπλυμα	1128	260
Εγκεφαλονωτιαίο υγρό	111	212
Πρωτόγαλα	585	386
Περιτοναϊκό υγρό	775	397
Πλάσμα	308	349
Πλευριτικό υγρό	470	210
Σάλιο	1945	458
Σπερματικό υγρό	17770	436
Δάκρυα	564	320
Ούρα	94	204

1.5. Σκοπός της έρευνας

Όπως προαναφέρθηκε στην ενότητα 1.3, αρκετές είναι οι μελέτες που διερεύνησαν την απόκριση των miRNA στην άσκηση, χρησιμοποιώντας ως βιολογικό δείγμα ιστούς και συστατικά του αίματος. Ωστόσο, μέχρι σήμερα δεν έχουν δημοσιευτεί ερευνητικά δεδομένα που να αφορούν σε μεταβολές της συγκέντρωσης των miRNA σε άλλα εξωκυτταρικά υγρά ως απόκριση στη σωματική άσκηση. Έτσι, συνδυάζοντας το ενδιαφέρον μας για την επίδραση της άσκησης στο μεταβολισμό των λιπιδίων, τον αναδυόμενο ρόλο των miRNA στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (συμπεριλαμβανομένης της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων), την αφθονία των miRNA που έχουν ανιχνευθεί στο ανθρώπινο σάλιο [53], τη δυνατότητα εύκολης, μη παρεμβατικής δειγματοληψίας ανθρώπινου σάλιου και την έλλειψη μελετών που αφορούν στην επίδραση της άσκησης στην έκφραση των

miRNA του ανθρώπινου σάλιου, προχωρήσαμε στη διεξαγωγή της συγκεκριμένης έρευνας, με σκοπό να διερευνήσουμε την επίδραση οξείας άσκησης εναλλασσόμενης έντασης στην έκφραση 8 miRNA που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων στο ανθρώπινο σάλιο.

Τα miRNA που επιλέχθηκαν είναι τα εξής: hsa-miR-27a, hsa-miR-27b, hsa-miR-33a, hsa-miR-143, hsa-miR-146a, hsa-miR-335, hsa-miR-370 και hsa-miR-378a (ο ρόλος τους στο μεταβολισμό των λιπιδίων αναλύθηκε στην ενότητα 1.2). Η παρουσία των συγκεκριμένων miRNA στο ανθρώπινο σάλιο επιβεβαιώθηκε από προηγούμενα ερευνητικά δεδομένα [53].

Δεδομένου ότι το σάλιο έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιολογικό υλικό εναλλακτικό του ορού στις αθλητικές επιστήμες [54] και λαμβάνοντας υπόψη την παρατήρηση ότι το πλάσμα και το σάλιο έχουν κοινά miRNA, τα οποία ενδεχομένως ανταλλάσσουν [53], υποθέσαμε ότι οι πιθανές μεταβολές της έκφρασης των miRNA του σάλιου μετά την παρέμβαση άσκησης ενδεχομένως αντικατοπτρίζουν αυτές του αίματος και, κατ' επέκταση, των ιστών στους οποίους δρουν τα μελετώμενα miRNA.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΜΕΘΟΔΟΣ

2.1. Σχεδιασμός της έρευνας

Στην παρούσα μελέτη, οι εθελοντές συμμετείχαν σε προγραμματισμένη ομαδική άσκηση εναλλασσόμενης έντασης σε στατικό ποδήλατο (spinning). Πριν την έναρξη και αμέσως μετά τη λήξη της συνεδρίας άσκησης, ελήφθησαν δείγματα σάλιου από κάθε συμμετέχοντα, με σκοπό τη μετέπειτα ανάλυσή τους στο εργαστήριο (μελέτη παρέμβασης – εργαστηριακή). Η συγκεκριμένη συνεδρία άσκησης αποτελούσε μέρος της καθημερινής φυσικής δραστηριότητας των συμμετεχόντων, οι οποίοι ήταν σε πολύ καλή φυσική κατάσταση, αλλά όχι επαγγελματίες αθλητές. Η δειγματοληψία διεξήχθη κατά τους μήνες Ιούνιο και Ιούλιο και έλαβε χώρα σε δύο γυμναστήρια.

Μετά τη λήψη των δειγμάτων σάλιου, ακολούθησε η αναλυτική διαδικασία μέτρησης των 8 miRNA που παρουσιάστηκαν στην εισαγωγή και του miR-191 ως γονιδίου αναφοράς. Η διαδικασία περιελάμβανε τρία στάδια: την απομόνωση RNA, την ανάστροφη μεταγραφή για την παρασκευή cDNA και την ενίσχυση των cDNA με τη μέθοδο της ποσοτικής (ή πραγματικού χρόνου) αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Οι αναλύσεις ολοκληρώθηκαν περίπου σε 6 μήνες, από το μήνα Σεπτέμβριο μέχρι τον επόμενο Φεβρουάριο.

2.2. Δείγμα της έρευνας

Το δείγμα της έρευνάς μας αποτέλεσαν 22 άνδρες, εκ των οποίων οι 3 αποκλείστηκαν μετά το πρώτο στάδιο της αναλυτικής διαδικασίας, λόγω πλήρους απουσίας RNA από τα δείγματά τους. Οι συμμετέχοντες ήταν μη επαγγελματίες αθλητές, οι οποίοι ασκούσαν καθημερινά και δεν λάμβαναν φάρμακα ή συμπληρώματα διατροφής. Ανταποκρίθηκαν θετικά σε προφορική πρόσκληση που τους απευθύναμε κατά την επίσκεψή τους στο γυμναστήριο κι ενημερώθηκαν προφορικά και εγγράφως για την έρευνα, υπογράφοντας στη συνέχεια το σχετικό έντυπο συγκατάθεσης. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές του Κώδικα Δεοντολογίας Ερευνών του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

2.3. Άσκηση

Οι εθελοντές συμμετείχαν σε μια συνεδρία ομαδικής άσκησης εναλλασσόμενης έντασης γνωστής ως *sprinting*, η οποία διεξαγόταν απόγευμα ή βράδυ, μεταξύ των ωρών 18:00 – 22:00. Οι συμμετέχοντες δεν είχαν καταναλώσει κάποιο γεύμα κατά την τελευταία ώρα πριν την άσκηση και δεν είχαν ασκηθεί προηγουμένως την ημέρα της δειγματοληψίας, ενώ κατά τη διάρκεια της άσκησης κατανάλωναν μόνο νερό. Η συνολική της διάρκεια ήταν 50 περίπου λεπτά και περιελάμβανε εναλλαγές ασκήσεων διαφορετικής διάρκειας και έντασης επάνω σε στατικό ποδήλατο. Οι συμμετέχοντες καθοδηγούνταν από τον εκάστοτε προπονητή της συνεδρίας, ο οποίος ήταν επίσης ενήμερος για τη διεξαγωγή της έρευνας. Ένα τυπικό πρωτόκολλο άσκησης ήταν το παρακάτω:

1. Προθέρμανση για 1-2 λεπτά.
2. Σταδιακή αύξηση της έντασης για τα επόμενα 15 λεπτά.
3. Διάλειμμα διάρκειας 1,5 λεπτού.
4. Σταδιακή αύξηση της έντασης για ακόμη 15 λεπτά.
5. Διάλειμμα διάρκειας 1 λεπτού.
6. Σταδιακή αύξηση της έντασης για τα υπόλοιπα 15-20 λεπτά, μέχρι το τέλος του προγράμματος.

Λόγω του ότι δεν ήταν εφικτό να γίνει μέτρηση της πρόσληψης οξυγόνου κατά την άσκηση ούτε να διατεθούν καρδιοσυχνόμετρα παρά σε ελάχιστους συμμετέχοντες, η ένταση της άσκησης εκτιμήθηκε με τη χρήση της κλίμακας εκλαμβανόμενης κόπωσης του Borg (*Rate of Perceived Exertion Scale*). Η κλίμακα αυτή αποτελεί έναν τρόπο εκτίμησης της έντασης της σωματικής δραστηριότητας. Βασίζεται στο πώς εκλαμβάνει το άτομο μεταβολές στη λειτουργία του οργανισμού του κατά τη διάρκεια της σωματικής άσκησης, όπως τον αυξημένο καρδιακό ρυθμό, τον αυξημένο ρυθμό αναπνοής, την αυξημένη εφίδρωση και τη μυϊκή κόπωση. Παρά το ότι η κλίμακα αυτή αποτελεί υποκειμενικό μέτρο, η εκλαμβανόμενη κόπωση ενός ατόμου μπορεί να παρέχει μια αρκετά καλή εκτίμηση του πραγματικού καρδιακού ρυθμού κατά τη διάρκεια της σωματικής δραστηριότητας (Borg, 1998). Η άποψη αυτή έχει τεκμηριωθεί από αρκετές μελέτες [55-59], ακόμη και σε περιπτώσεις όπου εξετάζεται η ένταση ασκήσεων με αντιστάσεις [60].

Η κλίμακα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα έρευνα ήταν η τροποποιημένη (από τον ίδιο τον Borg) εκδοχή της αρχικής κλίμακας και εκτείνεται μεταξύ των αριθμών 0 και 10, έναντι των αριθμών 6 έως 20 της κλασικής. Ο αριθμός 0 αντιστοιχεί στην

ηρεμία και ο αριθμός 3 σε μέτριας έντασης άσκηση, ενώ οι αριθμοί από 4 κι επάνω περιγράφουν άσκηση υψηλής έντασης, μέχρι και το 10, το οποίο αντιστοιχεί στη μέγιστη προσπάθεια. Μετά τη λήξη της άσκησης, και αφού γινόταν η λήψη του δείγματος σάλιου, κάθε συμμετέχων δήλωνε το βαθμό εκλαμβανόμενης κόπωσης, έχοντας μπροστά του μια έγχρωμη εκδοχή της δεκαβάθμιας κλίμακας του Borg (Παράρτημα 1).

Επιπλέον έγινε προσδιορισμός της Μέγιστης Πρόσληψης Οξυγόνου των συμμετεχόντων, μέσω μιας μέγιστης δοκιμασίας που πραγματοποιήθηκε σε κυκλοεργόμετρο.

2.4. Δειγματοληψία

Η διαδικασία της δειγματοληψίας πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα παρακάτω βήματα:

1. Πριν την έναρξη της προγραμματισμένης άσκησης, δόθηκε σε κάθε συμμετέχοντα ένας σωλήνας Falcon χωρητικότητας 50 ml και του ζητήθηκε να δώσει μια μικρή ποσότητα σάλιου (περίπου 1 ml ως δείγμα ηρεμίας).
2. Αμέσως μετά, 400 μl από κάθε δείγμα ηρεμίας μεταφέρθηκαν σε φιαλίδιο erpendorf χωρητικότητας 2 ml, το οποίο περιείχε 400 μl από το αντιδραστήριο 2X Denaturing Solution μετά την προσθήκη 375 μl 2-μερκαπτοαιθανόλης σε 25 ml του. Το αντιδραστήριο αυτό είναι μέρος του συνόλου αντιδραστηρίων (kit) mirVana™ PARIS™ της εταιρείας Ambion (Foster City, CA), το οποίο χρησιμοποιήθηκε και στα επόμενα πειραματικά στάδια για την απομόνωση του RNA. Η γρήγορη ανάμειξη του σάλιου με το συγκεκριμένο αντιδραστήριο εξασφάλισε τη σταθερότητα του περιεχόμενου RNA, απενεργοποιώντας αποτελεσματικά τις ριβονουκλεάσες, ένζυμα που καταλύουν τη διάσπαση του RNA.
3. Τα φιαλίδια διατηρήθηκαν σε πάγο μέχρι να μεταφερθούν στο εργαστήριο.
4. Μετά την προαναφερθείσα άσκηση και σε διάστημα 2-5 λεπτών από το τέλος της, ακολούθησε η δεύτερη δειγματοληψία, με επανάληψη των βημάτων 1 και 2.
5. Μετά το πέρας της δειγματοληψίας, τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο και αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι να αναλυθούν.

2.5. Παρασκευή RNA

2.5.1. Απομόνωση RNA

Η απομόνωση RNA από τα δείγματα σάλιου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προαναφερθέντος kit mirVana™ PARIS™. Το συγκεκριμένο kit επιτρέπει την απομόνωση ολικού RNA εμπλουτισμένου με miRNA και είναι κατάλληλο για υγρά βιολογικά δείγματα. Παρόμοια kit έχουν χρησιμοποιηθεί από διάφορες ερευνητικές ομάδες με αντικείμενο ενδιαφέροντος τα miRNA [44, 47, 51].

Το πρώτο βήμα στη διαδικασία της απομόνωσης ήταν η προσθήκη 800 μl μείγματος όξινης φαινόλης – χλωροφορμίου στα αναμειγμένα με 2X Denaturing Solution δείγματα σάλιου. Η προσθήκη του μείγματος αυτού οδηγεί στο διαχωρισμό οργανικής και υδατικής φάσης.

Μετά από φυγοκέντρηση 15 λεπτών στα 28,850 x g, ακολούθησε η προσεκτική συλλογή της επάνω, υδατικής φάσης κάθε δείγματος (στην οποία βρίσκεται το RNA) και η μεταφορά της σε νέο σωλήνα φυγοκέντρησης, όπου προστέθηκε ποσότητα αιθανόλης (100%) ίση με τον όγκο της εκάστοτε υδατικής φάσης επί 1,25. Στη συνέχεια, τα μείγματα που προέκυψαν πέρασαν από ειδικά φίλτρα, τα οποία συμπεριλαμβάνονταν στο kit απομόνωσης. Τα φίλτρα αυτά (filter cartridges) είναι ειδικά κατασκευασμένα ώστε να συγκρατούν το RNA. Πιο αναλυτικά, μετά από φυγοκέντρηση για 30 s στα 10,000 x g, πραγματοποιήθηκαν 3 διαδοχικές πλύσεις (με ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις), χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια Wash Solution 1 για την πρώτη πλύση (700 μl) και Wash Solution 2/3 για τις δύο επόμενες (2 x 500 μl).

Τέλος, χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Elution Solution, έγινε η παραλαβή του RNA, το οποίο μέχρι και τα προηγούμενα στάδια βρίσκονταν «εγκλωβισμένο» στα φίλτρα. Προηγήθηκε θέρμανση του αντιδραστήριου στους 95 °C και άμεση εφαρμογή ποσότητας 100 μl σε κάθε φίλτρο. Μετά από φυγοκέντρηση 30 s στα 10,000 x g, συλλέχθηκε το αντιδραστήριο έκλουσης μαζί με το RNA που περιέχονταν στα φίλτρα. Τα δείγματα RNA διατηρήθηκαν στους -80 °C.

2.5.2. Έλεγχος συγκέντρωσης/ποιότητας RNA

Αμέσως μετά την ολοκλήρωση της απομόνωσης RNA, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της συγκέντρωσής του χρησιμοποιώντας ειδικό νανοφωτόμετρο (Nanophotometer V2.3.0). Η συσκευή αυτή επιτρέπει τον προσδιορισμό συγκεντρώσεων νουκλεϊκών οξέων ή πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας ελάχιστη ποσότητα υλικού (3-4 μl). Για κάθε δείγμα έγιναν τρεις μετρήσεις με την τοποθέτηση 4 μl

παρασκευάσματος αραιωμένου 5 φορές στο όργανο και την ανάγνωση της αντίστοιχης τιμής συγκέντρωσης. Από τις τρεις μετρήσεις υπολογίστηκε ο μέσος όρος.

Παράλληλα, προσδιορίστηκε η απορρόφηση φωτός από τα δείγματά μας στα 260 και 280 nm (A_{260} και A_{280} αντίστοιχα). Ο λόγος A_{260}/A_{280} υπολογίστηκε για κάθε δείγμα (μέση τιμή των τριών μετρήσεων) και η τιμή του χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της ποιότητας του RNA που απομονώθηκε. Είναι γενικά αποδεκτό ότι λόγοι A_{260}/A_{280} που κυμαίνονται μεταξύ των τιμών 1,8 και 2,1 δηλώνουν ότι το RNA είναι «καθαρό», δηλαδή δεν περιέχει σημαντικές ποσότητες DNA ή πρωτεϊνών που το καθιστούν ακατάλληλο για χρησιμοποίησή στα επόμενα πειραματικά στάδια. Βέβαια, στην περίπτωση της qPCR, η Applied Biosystems επισημαίνει ότι ακόμη και δείγματα που έχουν λόγο A_{260}/A_{280} εκτός των αναφερόμενων αριθμητικών ορίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ασφάλεια.

Στο στάδιο αυτό, έγινε ο αποκλεισμός τριών συμμετεχόντων, στα δείγματα των οποίων διαπιστώθηκε πλήρης απουσία RNA. Έτσι, στα επόμενα πειραματικά στάδια, χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα των υπόλοιπων 19 συμμετεχόντων.

2.5.3. Αραίωση δειγμάτων

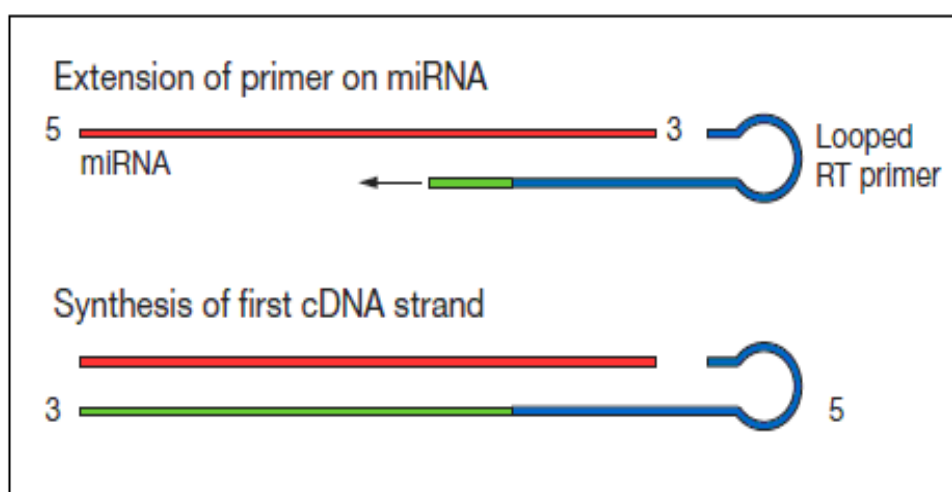
Προκειμένου να διεξαχθεί η ανάστροφη μεταγραφή, απαιτείται η χρησιμοποίηση συγκεκριμένης ποσότητας RNA. Μικρότερη ή μεγαλύτερη ποσότητα RNA μπορεί να οδηγήσει σε αποτυχία της διαδικασίας και επομένως στην αποτυχία παρασκευής cDNA.

Έτσι, σύμφωνα με τις συστάσεις της εταιρείας Applied Biosystems, πραγματοποιήθηκε αραίωση όλων των δειγμάτων με το Elution Solution, δεδομένου ότι η συγκέντρωση του RNA ήταν κατά πολύ υψηλότερη από την απαιτούμενη. Η τελική συγκέντρωση του RNA σε όλα τα δείγματα ήταν 2 ng/μl, έτσι ώστε να περιέχονται 10 ng σε 5 μl δείγματος, σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου ανάστροφης μεταγραφής.

2.6. Ανάστροφη μεταγραφή (παρασκευή cDNA)

Η ανάστροφη μεταγραφή πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του ειδικού kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription της εταιρείας Applied Biosystems (Foster City, CA). Το βήμα αυτό παρουσιάζει μια ιδιαιτερότητα σε σχέση με την κλασική διαδικασία ανάστροφης μεταγραφής, η οποία ιδιαιτερότητα έγκειται στη χρησιμοποίηση ειδικών εκκινητών (small RNA-specific RT primers) για καθένα από τα μελετώμενα miRNA (σε αντίθεση με τους γενικούς εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην κλασική διαδικασία). Οι ειδικοί εκκινητές της ανάστροφης μεταγραφής αποτελούν τμήματα ολοκληρωμένων

assays της Applied Biosystems (TaqMan® Small RNA Assays) στα οποία συμπεριλαμβάνονται και οι ειδικοί εκκινητές που απαιτούνται για το βήμα της ενίσχυσης με qPCR (ενότητα 2.7). Κάθε εκκινητής της ανάστροφης μεταγραφής σχηματίζει ένα βρόχο, ο οποίος βοηθάει στην πρόσδεση και επιμήκυνσή του επάνω στο εκάστοτε μόριο miRNA, διευκολύνοντας έτσι τη σύνθεση της συμπληρωματικής προς το miRNA αλυσίδας DNA (cDNA) (εικόνα 2.1). Τελικό αποτέλεσμα του βήματος αυτού ήταν η παρασκευή 342 διαφορετικών cDNA (38 δείγματα [19 πριν, 19 μετά την άσκηση] x 9 miRNA).



Εικόνα 2.1: Ανάστροφη μεταγραφή. Ο εξειδικευμένος για κάθε μόριο miRNA εκκινητής (μπλε σχήμα), ο οποίος σχηματίζει βρόχο (looped RT primer), προσδένεται μέσω ειδικής αλληλουχίας στο miRNA (κόκκινο σχήμα), επιμηκώνεται και ξεκινάει τη σύνθεση της συμπληρωματικής προς αυτό (το miRNA) αλυσίδας DNA (cDNA – πράσινο σχήμα). *TaqMan® Small RNA Assays protocol, Appendix C: Chemistry Overview, Applied Biosystems*. Αναπαράγεται με την ευγενική άδεια της εταιρείας.

Το πρώτο βήμα της διαδικασίας ήταν η παρασκευή του ειδικού μείγματος ανάστροφης μεταγραφής (RT reaction master mix), το οποίο περιείχε όλα τα απαραίτητα συστατικά για την έναρξη και ολοκλήρωση των αντιδράσεων, εκτός από τον εκκινητή και το RNA. Τα αντιδραστήρια που προστέθηκαν στο μείγμα και οι αντίστοιχες αναλογίες τους παρουσιάζονται στον πίνακα 2.1. Στη συνέχεια, 70 μl μείγματος αναμειγνύονταν με 50 μl RNA κάθε δείγματος. Από το μείγμα αυτό, μεταφέρονταν 12 μl σε σωληνάρια πολυπροπυλενίου χωρητικότητας 0,2 ml, στα οποία προσθέταμε 3 μl από τον εξειδικευμένο εκκινητή του αντίστοιχου TaqMan® Small RNA Assay (φτάνοντας τον όγκο των 15 μl, που ήταν και ο τελικός όγκος της αντίδρασης). Δεδομένου ότι για

κάθε δείγμα παρασκευάστηκαν 9 διαφορετικά cDNA (ένα για κάθε miRNA), χρησιμοποιήθηκαν 9 διαφορετικά TaqMan® Small RNA Assays και, κατ' επέκταση, 9 διαφορετικοί εκκινητές.

Τα δείγματα πλέον ήταν έτοιμα να τοποθετηθούν στο μηχάνημα του θερμικού κυκλοποιητή, το οποίο ρυθμίστηκε να εκτελέσει συγκεκριμένο πρόγραμμα αλλαγής θερμοκρασιών, έτσι ώστε να παρασκευαστούν τα cDNA. Οι παράμετροι του προγράμματος και η διάρκειά του φαίνονται στον πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.1: Τα αντιδραστήρια του TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription kit και οι αναλογίες που προτείνονται από τον κατασκευαστή για την παρασκευή του ειδικού μείγματος ανάστροφης μεταγραφής. Η ποσότητα του μείγματος που απαιτείται για κάθε αντίδραση είναι 7 μ l, ενώ ο τελικός όγκος κάθε αντίδρασης είναι 15 μ l.

Συστατικό	Όγκος Master mix ανά αντίδραση (μ l)
100mM dNTPs (με dTTP)	0,15
MultiScribe™ Ανάστροφη Μεταγραφάση, 50 U/ μ l	1,00
10X Ρυθμιστικό Διάλυμα Ανάστροφης Μεταγραφής	1,50
Αναστολέας ριβονουκλεασών, 20 U/ μ l	0,19
Νερό ελεύθερο νουκλεασών	4,16
Συνολικός όγκος	7,00

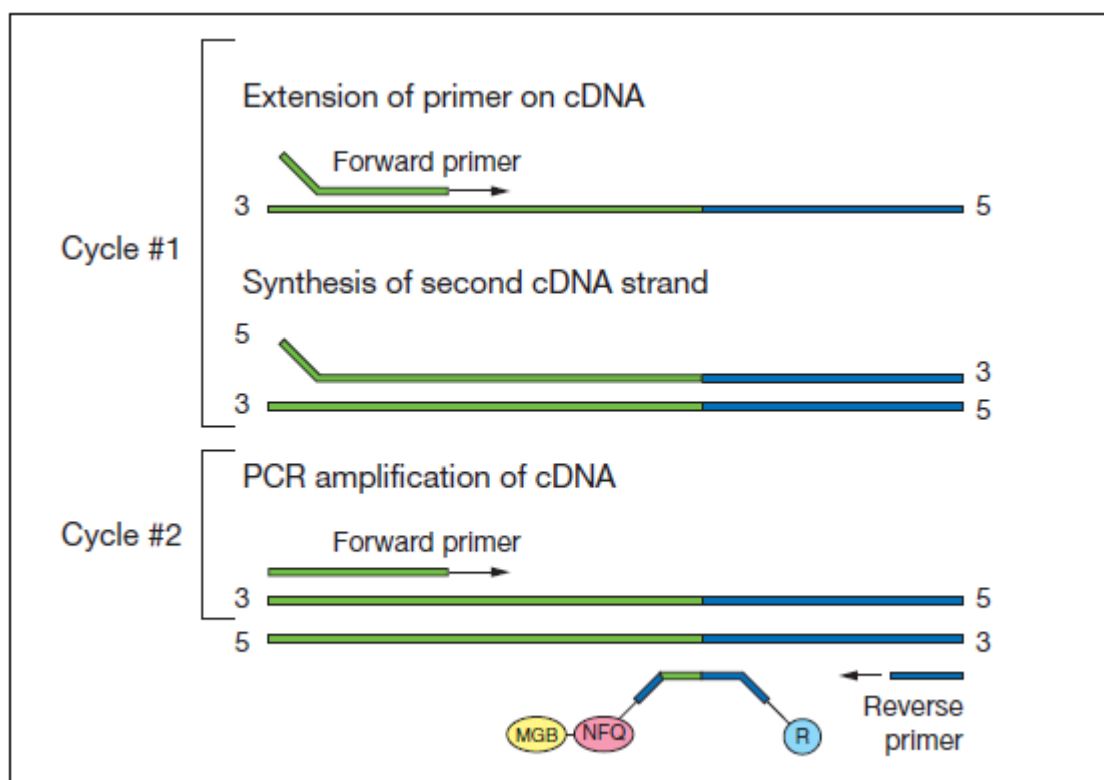
Πίνακας 2.2: Διαδοχικά στάδια αλλαγής θερμοκρασίας κατά την αντίδραση ανάστροφης μεταγραφής.

Step	Χρόνος	Θερμοκρασία
Hold	30 λεπτά	16°C
Hold	30 λεπτά	42°C
Hold	5 λεπτά	85°C
Hold	∞	4°C

2.7. Ενίσχυση των cDNA με qPCR

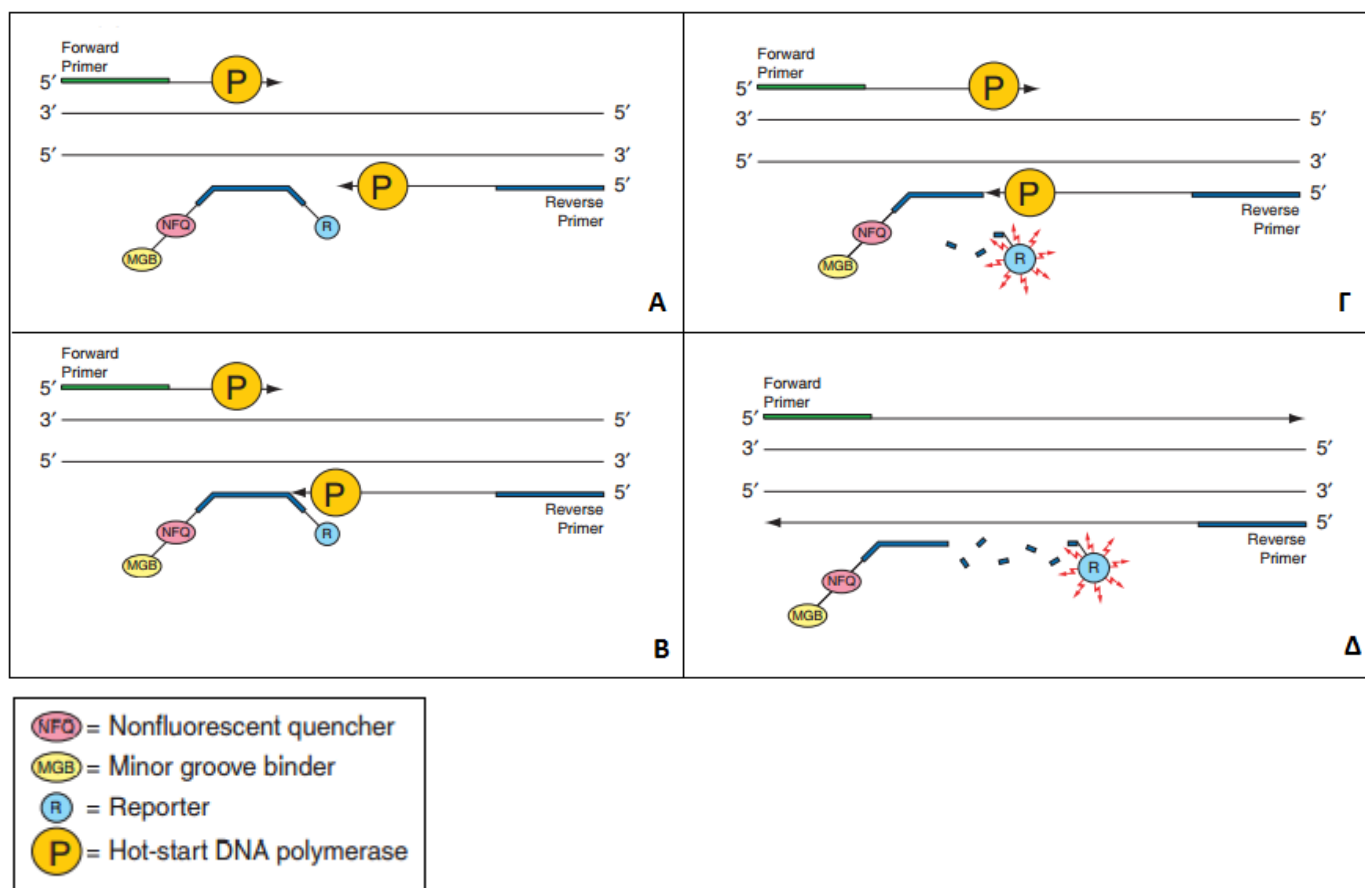
Όπως προαναφέρθηκε, στο βήμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι ειδικοί εκκινητές των TaqMan® Small RNA Assays της εταιρείας Applied Biosystems. Συγκεκριμένα, το χρησιμοποιούμενο μείγμα περιείχε: έναν εξειδικευμένο για κάθε miRNA εμπρόσθιο εκκινητή (small RNA-specific forward PCR primer), έναν εξειδικευμένο ανάστροφο εκκινητή (specific reverse PCR primer) και ένα εξειδικευμένο για κάθε miRNA MGB probe (small RNA-specific TaqMan® MGB probe).

Κατά τον πρώτο κύκλο της qPCR γίνεται η σύνθεση του δεύτερου κλώνου cDNA (συμπληρωματικού εκείνου που παρασκευάστηκε με τη διαδικασία της ανάστροφης μεταγραφής) με τη βοήθεια του εμπρόσθιου εκκινητή, ενώ στο δεύτερο κύκλο ξεκινάει η ενίσχυση των δύο κλώνων cDNA με τη συμμετοχή, πλέον, και του ανάστροφου εκκινητή (εικόνα 2.2). Παράλληλα με τη διαδικασία της ενίσχυσης, λαμβάνει χώρα και μια δεύτερη διαδικασία, στην οποία εμπλέκεται το small RNA-specific TaqMan® MGB probe. Ουσιαστικά, η διαδικασία αυτή διαφοροποιεί την qPCR από την απλή PCR και μέσω αυτής καθίσταται δυνατή η ποσοτικοποίηση των μελετώμενων γονιδίων.



Εικόνα 2.2: Έναρξη της ενίσχυσης με qPCR. 1^{ος} Κύκλος: Σύνθεση του κλώνου cDNA που είναι συμπληρωματικός προς αυτόν που παρασκευάστηκε με τη διαδικασία της ανάστροφης μεταγραφής. 2^{ος} Κύκλος: Ενίσχυση των κλώνων cDNA. *TaqMan® Small RNA Assays protocol, Appendix C: Chemistry Overview, Applied Biosystems*. Αναπαράγεται με την ευγενική άδεια της εταιρείας.

Πιο αναλυτικά, το small RNA-specific TaqMan® MGB probe περιλαμβάνει: μια χρωστική αναφοράς (FAMTM dye) στο 5' άκρο του, έναν minor groove binder (MGB, ο οποίος αυξάνει τη θερμοκρασία τήξης χωρίς να αυξάνει το μήκος του probe) στο 3' άκρο του και μια μη φθορίζουσα χρωστική (NFQ) επίσης στο 3' άκρο του. Κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης, το probe προσδένεται ειδικά σε μια συμπληρωματική αλληλουχία μεταξύ του εμπρόσθιου και του ανάστροφου εκκινητή (εικόνα 2.3.A). Όταν το probe είναι «άθικτο», η εγγύτητα της χρωστικής αναφοράς (R) με τη μη φθορίζουσα χρωστική (NFQ) έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή του φθορισμού της πρώτης, κυρίως λόγω ενεργειακής μεταφοράς τύπου Förster (εικόνα 2.3.A,B). Η DNA πολυμεράση δρα μόνο στα probes που υβριδίζονται με το προς ενίσχυση cDNA. Η δράση της πολυμεράσης οδηγεί σε αποχωρισμό της χρωστικής αναφοράς από τη μη φθορίζουσα χρωστική και ο αποχωρισμός αυτός οδηγεί σε αυξημένο φθορισμό της χρωστικής αναφοράς (εικόνα 2.3.Γ). Η αύξηση του σήματος φθορισμού εμφανίζεται μόνο σε περίπτωση που το cDNA-στόχος είναι συμπληρωματικό με το probe, οπότε το probe ενισχύεται κατά τη διάρκεια των διαδοχικών κύκλων της PCR. Έτσι, είναι αδύνατο να ανιχνευθεί οποιαδήποτε μη ειδική ενίσχυση. Ο πολυμερισμός των αλυσίδων cDNA συνεχίζεται, αλλά επειδή το 3' άκρο του probe είναι «μπλοκαρισμένο», η επιμήκυνσή του (του probe) κατά τη διάρκεια της PCR είναι αδύνατη (εικόνα 2.3.Δ).



Εικόνα 2.3: Χημεία της τεχνικής qPCR. Α: Πολυμερισμός. Β: Μετατόπιση probe. Γ: Δράση DNA πολυμεράσης – αύξηση σήματος φθορισμού. Δ: Ολοκλήρωση πολυμερισμού. Για λεπτομέρειες βλέπε ενότητα 2.7. *TaqMan® Small RNA Assays protocol, Appendix C: Chemistry Overview, Applied Biosystems*. Αναπαράγεται με την ευγενική άδεια της εταιρείας.

Όσον αφορά στην πειραματική διαδικασία, το πρώτο βήμα ήταν η παρασκευή του ειδικού μείγματος της qPCR, αναμειγνύοντας τους ειδικούς primers TaqMan® Small RNA Assays (20X), το cDNA του αντίστοιχου δείγματος, το ειδικό αντιδραστήριο TaqMan® Universal PCRMaster Mix II (2X), το UNG και νερό απαλλαγμένο από νουκλεάσες (nuclease-free water), σύμφωνα με τις αναλογίες του πίνακα 2.3. Για κάθε δείγμα παρασκευάστηκε ποσότητα μείγματος για τρεις αντιδράσεις των 20 μl (προσθέτοντας 20% επιπλέον όγκο από το κάθε συστατικό για αντιστάθμιση πιθανών απωλειών κατά τη μετάγγιση).

Στη συνέχεια, μετά από καλή ανάμειξη και σύντομη φυγοκέντρηση, πραγματοποιήθηκε μεταφορά 20 μl του κάθε μείγματος (επί τρεις φορές) στα βοθρία πλακιδίων MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plates, 0.1 mL της Applied Biosystems. Η ανάλυση των δειγμάτων «εις τριπλούν» προτείνεται από την ίδια την εταιρεία και έχει σκοπό να αυξήσει την ακρίβεια των αποτελεσμάτων.

Τέλος, μετά την προσεκτική τοποθέτηση όλων των δειγμάτων, τα πλακίδια καλύφθηκαν με ειδικό υλικό (MicroAmp® Optical Adhesive Film της Applied Biosystems) και τοποθετήθηκαν στη συσκευή 7500 Fast Real-Time PCR System της Applied Biosystems. Η συσκευή είναι συνδεδεμένη με υπολογιστή, στον οποίο υπάρχει εγκατεστημένο ειδικό λογισμικό. Μέσω του λογισμικού αυτού ρυθμίζονται όλες οι παράμετροι της ανάλυσης, όπως θερμοκρασία και διάρκεια κάθε σταδίου, όπως φαίνονται στον πίνακα 2.4. Η συνολική διάρκεια του προγράμματος ήταν 88 λεπτά.

Πίνακας 2.3: Συστατικά του μείγματος της qPCR και οι αναλογίες τους σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. *Στις τιμές των τριών επαναλήψεων συμπεριλαμβάνεται 20% επιπλέον όγκος για την αντιστάθμιση πιθανών απωλειών όγκου κατά τη μετάγγιση.

Συστατικό	Όγκος ανά αντίδραση (μl)	
	Μονή αντίδραση	Τρεις επαναλήψεις*
TaqMan® Small RNA Assay (20X)	1,00	3,60
Προϊόν ανάστροφης μεταγραφής (cDNA)	1,33	4,80
TaqMan® Universal PCRMaster Mix II (2X), no UNG	10,00	36,00
Νερό ελεύθερο νουκλεασών	7,67	27,61
Συνολικός όγκος	20,00	72,01

Πίνακας 2.4: Θερμοκρασία - διάρκεια των σταδίων της qPCR.

Βήμα	Ενεργοποίηση Ενζύμου	PCR	
	HOLD	Κύκλος (40 κύκλοι)	
		Αποδιάταξη	Υβριδισμός/Επιμήκυνση
Θερμοκρασία	95°C	95°C	60°C
Χρόνος	10 min	15 s	60 s

Μετά το τέλος της ενίσχυσης των cDNA, το λογισμικό συγκέντρωνε τις τιμές Ct, από τις οποίες γινόταν ο υπολογισμός της μέσης τιμής των τριών τιμών Ct του κάθε δείγματος. Η τιμή Ct (Cycle threshold) αντιστοιχεί στον αριθμό του κύκλου κατά τον οποίο παρατηρείται εκθετική αύξηση του σήματος φθορισμού του probe και είναι αντιστρόφως ανάλογη της αφθονίας του εκάστοτε γονιδίου-στόχου (στην προκειμένη περίπτωση, των μελετώμενων miRNA).

2.8. Στατιστική Ανάλυση - Υπολογισμοί

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS® 18.0. Για την εξέταση της κανονικότητας της κατανομής των μεταβλητών, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Shapiro-Wilk. Η δοκιμασία αυτή εφαρμόστηκε αρχικά στη μεταβλητή Ct για κάθε miRNA, για τις συνθήκες ηρεμίας και άσκησης κι έδειξε ότι για τα miR-27b, miR-370 και miR-378a η μεταβλητή Ct σε συνθήκες ηρεμίας ακολουθεί κανονική κατανομή, ενώ σε όλες τις υπόλοιπες περιπτώσεις τα αποτελέσματα έδειξαν μη κανονική κατανομή.

Για την αξιολόγηση της επίδρασης της άσκησης στην έκφραση των μελετώμενων miRNA, χρησιμοποιήθηκε παραμετρική (Student's *t* test) ή μη παραμετρική δοκιμασία (Wilcoxon's test), ανάλογα με τα αποτελέσματα της δοκιμασίας Shapiro-Wilk. Σε όλες τις δοκιμασίες που εφαρμόστηκαν, ως στάθμη σημαντικότητας ορίστηκε η τιμή 0,05.

Αρχικά, οι παραπάνω διαδικασίες εφαρμόστηκαν στις μεταβλητές «Mean Ct», δηλαδή στις μέσες τιμές των τριών Ct κάθε δείγματος. Έπειτα, υπολογίστηκαν οι μεταβλητές ΔCt ως η διαφορά του Ct κάθε μελετώμενου miRNA από το Ct του miRNA αναφοράς. Ακολούθησε ο υπολογισμός των τιμών $2^{-\Delta Ct}$, οι οποίες δείχνουν τη σχετική συγκέντρωση κάθε μελετώμενου miRNA (δηλαδή πόσες φορές μικρότερη ή μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωσή του από τη συγκέντρωση του miRNA αναφοράς).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι κατά την επεξεργασία των δεδομένων εμφανίστηκαν περιπτώσεις στις οποίες οι τρεις τιμές των Ct διέφεραν αρκετά μεταξύ τους, οπότε κρίθηκε αναγκαίο να εφαρμοστεί κάποιο κριτήριο αποκλεισμού μίας τουλάχιστον τιμής. Έτσι, εάν η απόσταση της μικρότερης τιμής Ct από τη μεσαία, ήταν μεγαλύτερη ή ίση του διπλάσιου της απόστασης μεταξύ της μεσαίας και της μεγαλύτερης τιμής, η μικρότερη τιμή απορρίπτονταν. Με ανάλογο τρόπο, απορρίπτονταν και μία ακραία μεγάλη τιμή. Για παράδειγμα, εάν A, B, Γ ήταν οι τρεις τιμές Ct σε αύξουσα σειρά, η τιμή A απορρίπτονταν εάν $(B-A) \geq 2 (Γ-B)$. Αντίστοιχα, εάν $(Γ-B) \geq 2 (B-A)$, απορρίπτονταν οι τιμή Γ.

Τέλος, υπολογίστηκαν οι μεταβλητές $\Delta\Delta Ct$ και $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Οι τιμές $\Delta\Delta Ct$ προκύπτουν με αφαίρεση της τιμής ΔCt κάθε μελετώμενου miRNA σε κατάσταση ηρεμίας (πριν την άσκηση) από την αντίστοιχη τιμή ΔCt μετά την άσκηση. Έτσι προκύπτει μία τιμή $\Delta\Delta Ct$ για κάθε miRNA η οποία τελικά συγκρίνεται με το 0 προκειμένου να προσδιορίσουμε τη σημαντικότητα της αλλαγής στην έκφραση κάθε miRNA. Οι τιμές $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (fold change) δείχνουν τη μεταβολή (πόσες φορές αυξήθηκε ή μειώθηκε) στη συγκέντρωση κάθε miRNA μετά την παρέμβαση άσκησης, συγκρινόμενη με τη αντίστοιχη τιμή της πριν την

παρέμβαση. Αντίστοιχα, η σημαντικότητα της αλλαγής στην έκφραση κάθε miRNA προσδιορίστηκε μετά από σύγκριση των τιμών $2^{-\Delta\Delta Ct}$ με την τιμή 1.

2.9. Βιοηθική

Η παρούσα ερευνητική μελέτη διεξήχθη σύμφωνα με τον «Κώδικα Δεοντολογίας Ερευνών» του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Πριν από την έναρξη της πρώτης δειγματοληψίας, οι συμμετέχοντες διάβασαν και υπέγραψαν ένα έντυπο συγκατάθεσης στο οποίο υπήρχαν πληροφορίες σχετικά με το αντικείμενο της έρευνας, τη μέθοδο, την προστασία προσωπικών δεδομένων, τα προσδοκώμενα οφέλη και τους πιθανούς κινδύνους (Παράρτημα 2).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Ανθρωπομετρικά – δημογραφικά χαρακτηριστικά συμμετεχόντων

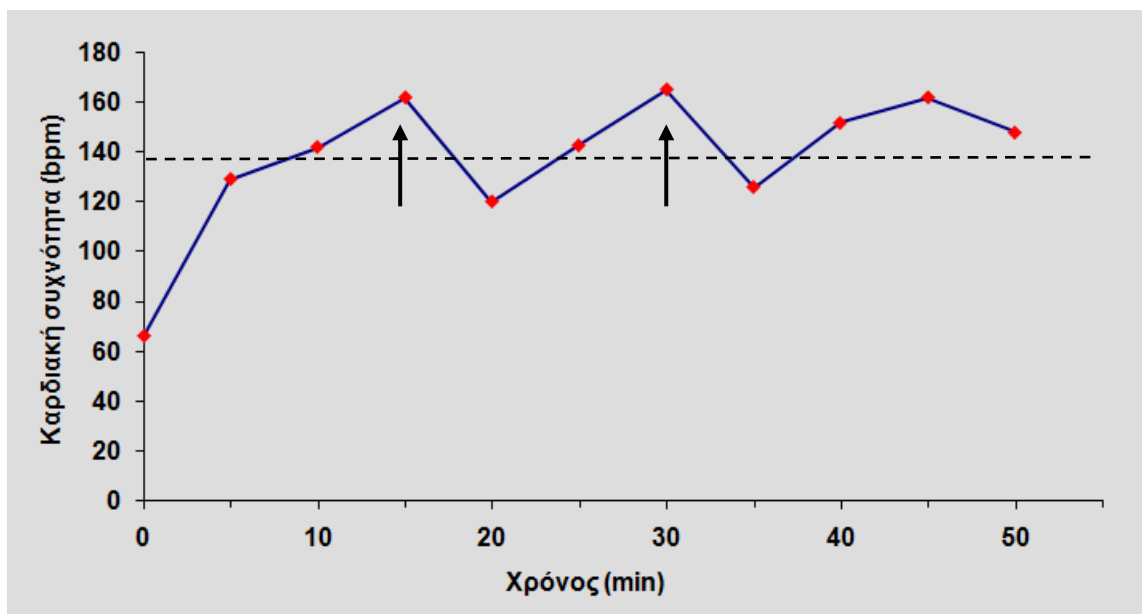
Όπως προαναφέρθηκε, μετά το στάδιο της απομόνωσης του RNA από τα δείγματά μας, αποκλείστηκαν τρεις εθελοντές. Έτσι, ο τελικός αριθμός των συμμετεχόντων ήταν 19. Τα ανθρωπομετρικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά του δείγματος παρουσιάζονται στον πίνακα 3.1. Η μέση τιμή των βαθμίδων της κλίμακας εκλαμβανόμενης κόπωσης του Borg που δηλώθηκαν από τους συμμετέχοντες ήταν $5,8 \pm 0,4$.

Πίνακας 3.1: Ανθρωπομετρικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα.

Παράμετροι	Τιμές
Ηλικία (έτη)	$31,63 \pm 1,62$
Ύψος (m)	$1,8 \pm 0,02$
Μάζα σώματος (kg)	$80,74 \pm 2,34$
Δείκτης μάζας σώματος (kg/m^2)	$24,96 \pm 0,56$
VO_2max ($\text{ml}/\text{kg}/\text{min}$)	$40,91 \pm 4,66$

3.2. Ένταση της άσκησης

Στην εικόνα 3.1 φαίνεται η καρδιοσυχνότητα ενός από τους συμμετέχοντες κατά τη διάρκεια του 50λεπτου προγράμματος άσκησης, όπως αυτή μετρήθηκε με τη χρήση καρδιοσυχνόμετρου Polar.



Εικόνα 3.1: Καρδιακή συχνότητα ενός από τους συμμετέχοντες κατά τη διάρκεια του προγράμματος άσκησης. Τα μαύρα βέλη αντιστοιχούν στα διαλείμματα χρονικής διάρκειας 1,5 λεπτού (πρώτο βέλος) και ενός λεπτού (δεύτερο βέλος). Η στικτή γραμμή αντιστοιχεί στη μέση καρδιακή συχνότητα κατά τη διάρκεια της άσκησης (73,24% της μέγιστης).

3.3. Συγκεντρώσεις RNA

Τα αναλυτικά αποτελέσματα των μετρήσεων των συγκεντρώσεων RNA στα δείγματα των συμμετεχόντων, παρουσιάζονται στον πίνακα 3.2. Η μέση τιμή των συγκεντρώσεων ήταν 0,03 μg/μl, ενώ η μέση τιμή των λόγων A_{260}/A_{280} 1,78.

Πίνακας 3.2: Συγκεντρώσεις RNA (στήλες 2-4) και λόγοι A_{260}/A_{280} (στήλες 5-7) στα 38 τελικά δείγματα. Οι μονοί αριθμοί αντιστοιχούν στα δείγματα ηρεμίας, ενώ οι ζυγοί στα δείγματα μετά την άσκηση. Οι αριθμοί των δειγμάτων που λείπουν από την πρώτη στήλη (7-8, 11-14) αντιστοιχούν στα δείγματα των συμμετεχόντων που απορρίφθηκαν από τη μελέτη λόγω απουσίας RNA. Ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων RNA και του λόγου A_{260}/A_{280} φαίνονται στην τελευταία γραμμή του πίνακα (έντονη γραφή).

Αρ. Δείγματος	Μέτρηση 1(μg/μl)	Μέτρηση 2(μg/μl)	Μέτρηση 3(μg/μl)	A260(1)/A280(1)	A260(2)/A280(2)	A260(3)/A280(3)	Μ.Ο Μετρήσεων 1,2,3 (μg/μl)	Μ.Ο A260/A280 (1,2,3)
1	0,022	0,015	0,015	1,833	1,727	1,767	0,017	1,80
2	0,006	0,007	0,014	1,55		1,917	0,009	1,73
3	0,038	0,036	0,034	1,9	1,926	1,76	0,036	1,83
4	0,027	0,014	0,014	1,539	1,944	2,061	0,018	1,80
5	0,012	0,018	0,012	1,848	1,286	1,933	0,014	1,89
6	0,025	0,017	0,01	1,482	1,288	1,714	0,017	1,60
9	0,055	0,055	0,056	2,037	2,029	2,051	0,055	2,04
10	0,04	0,038	0,037	1,895	1,901	1,591	0,038	1,74
15	0,045	0,049	0,048	1,712	1,892	1,883	0,047	1,80
16	0,006	0,006	0,006	2,286	2,286	2,143	0,006	2,21
17	0,086	0,085	0,085	1,946	1,954	1,959	0,085	1,95
18	0,09	0,06	0,061	1,841	1,987	1,987	0,070	1,91
19	0,099	0,009	0,026	1,988	1,593	1,424	0,045	1,71
20	0,064	0,068	0,068	1,839	1,888	1,883	0,067	1,86
21	0,008	0,022	0,007	1,481	2	1,609	0,012	1,55
22	0,003	0,018	0,017	1,6	1,82	1,812	0,013	1,71
23	0,016	0,016	0,007	1,773	1,778	1,789	0,013	1,78
24	0,026	0,029	0,008	1,737	1,682	1,6	0,021	1,67
25	0,038	0,008	0,008	1,641	1,708	1,577	0,018	1,61
26	0,069	0,056	0,066	1,864	1,853	1,886	0,064	1,88
27	0,059	0,024	0,043	1,771	1,862	1,929	0,042	1,85
28	0,062		0,062	1,692	2,143	1,702	0,062	1,70
29	0,037	0,034	0,035	1,889	1,943	1,956	0,035	1,92
30	0,05	0,049	0,05	1,908	1,93	1,922	0,050	1,92
31	0,031	0,031	0,031	1,539	1,545	1,545	0,031	1,54
32	0,022	0,021	0,029	1,416	1,39	1,57	0,024	1,49
33	0,044	0,044	0,044	1,719	1,713	1,724	0,044	1,72
34	0,043	0,042	0,042	1,845	1,858	1,892	0,042	1,87
35	0,021	0,019	0,019	1,839	1,843	1,863	0,020	1,85
36	0,007	0,007	0,007	1,895	1,85	1,895	0,007	1,90
37	0,034	0,033	0,033	1,828	1,864	1,835	0,033	1,83
38	0,034	0,028	0,026	1,667	1,785	1,795	0,029	1,73
39	0,019	0,019	0,019	1,88	1,882	1,902	0,019	1,89
40	0,01	0,01	0,01	1,857	1,821	1,889	0,010	1,87
41	0,008	0,007	0,008	1,727	1,609	1,625	0,008	1,68
42	0,021	0,019	0,019	1,746	1,778	1,792	0,020	1,77
43	0,008	0,008	0,008	1,6	1,64	1,538	0,008	1,57
44	0,011	0,011	0,012	1,6	1,571	1,595	0,011	1,60
Μέση τιμή	0,03	0,03	0,03	1,77	1,80	1,80	0,03	1,78

3.4. Δοκιμασία Wilcoxon στις τιμές Ct

Στους πίνακες 3.3 και 3.4 παρουσιάζονται οι τιμές των Ct για κάθε miRNA πριν και μετά την άσκηση. Κάθε τιμή είναι αποτέλεσμα του μέσου όρου των τριών μετρήσεων, όπως αυτές προέκυψαν από την qPCR.

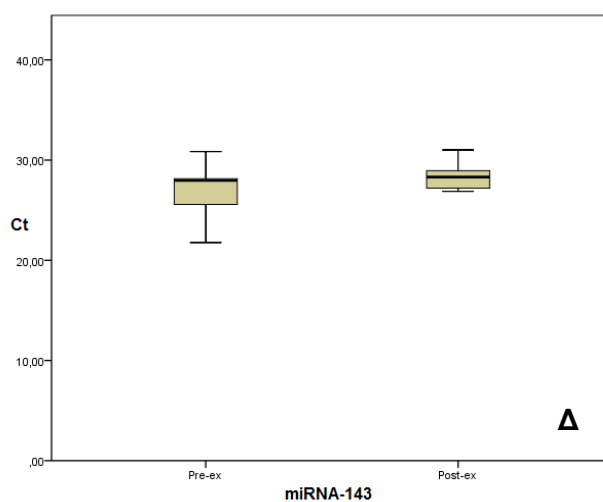
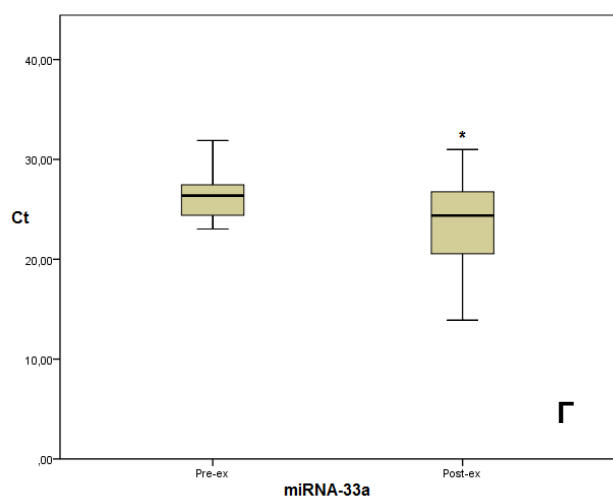
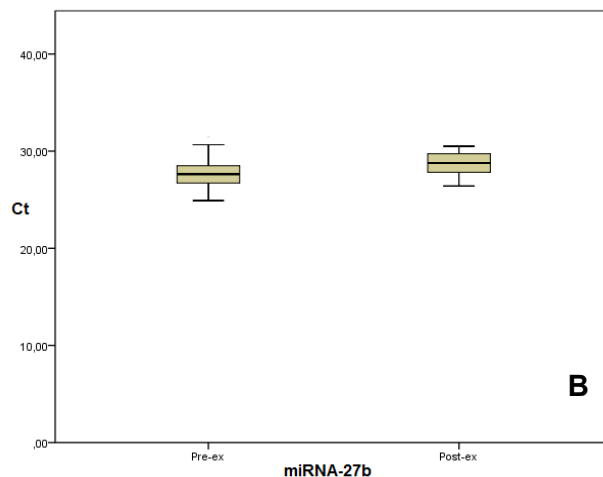
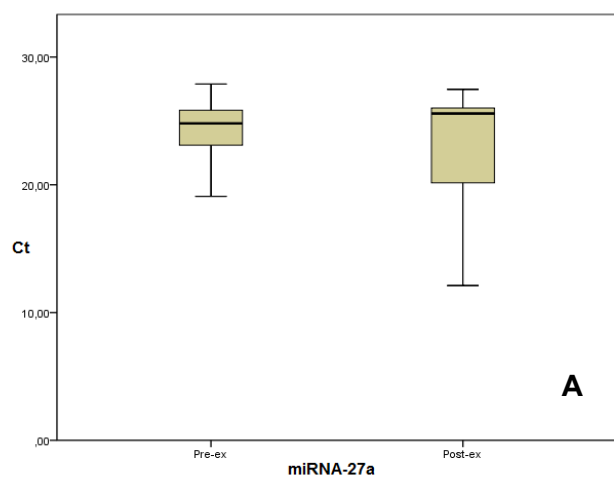
Πίνακας 3.3: Τιμές Ct για τα miRNA 1-5 πριν και μετά την άσκηση. Κάθε τιμή Ct αντιστοιχεί στο μέσο όρο των τριών μετρήσεων που έγιναν με τη μέθοδο της qPCR. Η αρίθμηση των δειγμάτων γίνεται με τους μονούς αριθμούς των δειγμάτων ηρεμίας (οι ζυγοί αντιστοιχούν στα δείγματα άσκησης και παραλείπονται). Οι μέσες τιμές των Ct ηρεμίας και άσκησης αποδίδονται με μαύρο και κόκκινο χρώμα αντίστοιχα (τελευταία γραμμή). Σημειώνεται ότι η μεταβλητή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης του εκάστοτε miRNA.

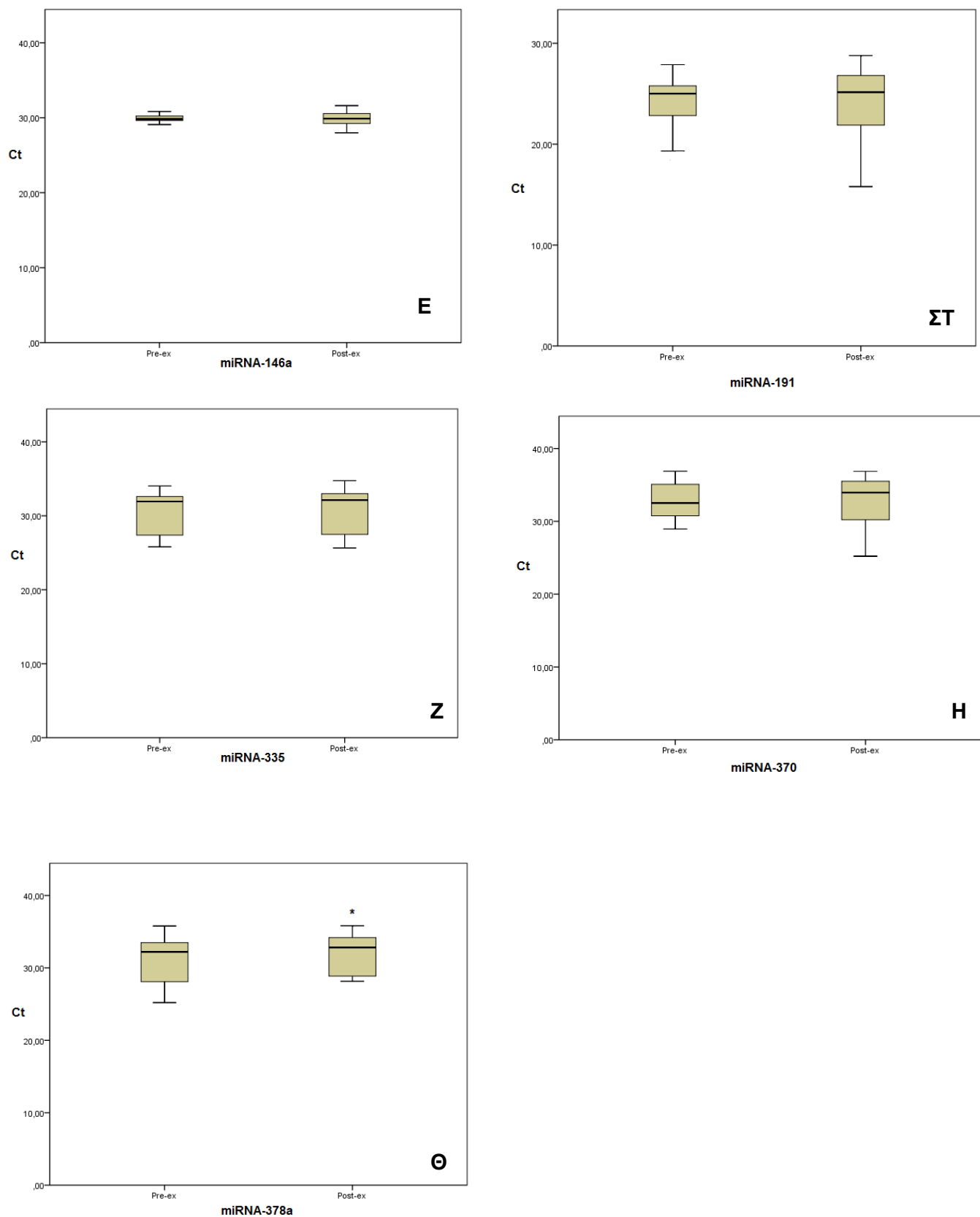
Αρ. Δείγματος	hsa-miR-27a-3p		hsa-miR-27b-3p		hsa-miR-33a-5p		hsa-miR-143-3p		hsa-miR-146a-5p	
	Ηρεμία	Άσκηση	Ηρεμία	Άσκηση	Ηρεμία	Άσκηση	Ηρεμία	Άσκηση	Ηρεμία	Άσκηση
1	24,8	25,728	22,537	23,031	28,991	25,165	22,31	22,211	29,613	30,627
3	25,138	26,839	27,467	28,902	28,354	23,664	27,955	28,89	30,454	30,487
5	25,836	24,464	25,891	9,602	24,97	24,612	28,492	27,949	29,64	29,706
9	17,025	10,012	26,934	28,324	18,507	27,905	27,952	29,06	30,846	29,721
15	25,858	25,9	27,929	29,58	24,53	22,386	27,966	28,504	30,214	29,882
17	25,934	26,007	30,662	29,19	25,475	24,153	27,917	29,368	29,925	30,229
19	25,56	25,833	27,62	28,776	26,801	18,719	27,959	28,303	29,145	30,974
21	18,35	19,331	36,046	26,414	24,271	15,352	29,863	29	28,856	29,475
23	27,89	26,28	31,887	30,506	27,147	24,975	21,769	9,048	30,835	29,662
25	23,87	27,471	28,791	33,494	24,691	23,499	23,497	27,175	27,986	30,784
27	24,81	25,581	27,975	28,719	31,893	6,414	28,944	27,798	29,765	31,007
29	23,097	22,178	28,627	27,886	15,696	26,909	30,854	30,911	31,608	31,787
31	20,41	14,953	26,501	30,197	23,026	30,991	27,945	31,014	29,917	30,464
33			23,998	15,363	27,923	27,312	25,68	26,885	29,661	29,093
35	23,816	26,147	24,906	36,477	26,572	13,897	26,956	27,233	23,929	24,299
37	24,572	25,117	27,768	28,908	27,755	26,603	24,583	24,474	29,187	29,766
39	26,315	20,153	28,379	28,628	26,78	26,932	25,478	27,924	29,856	29,192
41	19,096	12,109	27,635	27,77	26,374	24,375	28,312	28,546	29,27	29,89
43	24,836	25,584	27,23	29,894	16,992	7,828	27,853	28,808	29,834	30,479
Μέση τιμή	23,734	22,760	27,831	27,456	25,092	22,194	26,962	27,005	29,502	29,870

Πίνακας 3.4: Τιμές Ct για τα miRNA 6-9 πριν και μετά την άσκηση. Κάθε τιμή Ct αντιστοιχεί στο μέσο όρο των τριών μετρήσεων που έγιναν με τη μέθοδο της qPCR. Η αρίθμηση των δειγμάτων γίνεται με τους μονούς αριθμούς των δειγμάτων ηρεμίας (οι ζυγοί αντιστοιχούν στα δείγματα άσκησης και παραλείπονται). Οι μέσες τιμές των Ct ηρεμίας και άσκησης αποδίδονται με μαύρο και κόκκινο χρώμα αντίστοιχα (τελευταία γραμμή).

Αρ. Δείγματος	hsa-miR-191		hsa-miR-335-5p		hsa-miR-370		hsa-miR-378a-5p	
	Ηρεμία	Άσκηση	Ηρεμία	Άσκηση	Ηρεμία	Άσκηση	Ηρεμία	Άσκηση
1	24,163	24,865	27,702	25,942	32,517	35,553	33,818	34,496
3	25,645	26,997	32,739	33,051	31,342	35,258	33,819	35,232
5	27,144	26,566	32,926	32,442	36,882	33,043	27,21	28,844
9	25,067	25,432	31,942	32,05	34,097	35,748	33,166	33,877
15	25,874	27,53	26,61	26,979	34,198	36,864	33,79	34,847
17	24,884	26,385	31,902	33,597	29,774	29,197	27,49	29,061
19	24,952	26,605	31,935	33,385	34,53	36,871	32,387	34,67
21	25,721	24,772	34,026	32,101	35,72	34,934	32,834	32,873
23	25,31	24,39	26,623	25,646	33,169	33,95	33,829	33,728
25	13,572	18,742	29,969	32,835	32,327	35,597	25,207	28,141
27	21,881	15,798	26,36	27,519	31,285	31,223	27,767	7,59
29	27,881	27,496	30,74	29,709	23,114	25,213	35,782	35,826
31	25,845	28,786	32,832	34,742	30,246	35,458	27,414	28,605
33	19,318	20,234	27,043	27,453	30,152	28,456	32,725	33,557
35	23,783	23,544	25,808	26,05	35,949	33,433	32,212	32,824
37	18,285	18,183	31,949	32,127	32,347	33,364	30,04	30,779
39			32,716	32,928	35,63	28,693	29,933	28,315
41			32,502	33,325	28,938	27,168	28,427	28,895
43			32,205	32,82	36,491	34,174	31,244	32,381
Μέση τιμή	23,708	24,145	30,449	30,774	32,564	32,852	31,005	30,765

Στην εικόνα 3.2 (Α - Θ) φαίνονται οι επιδράσεις της άσκησης στις τιμές των Ct, σε καθένα από τα 9 μελετώμενα miRNA (συμπεριλαμβανομένου και του γονιδίου αναφοράς), ενώ στον πίνακα 3.5 συνοψίζονται τα αποτελέσματα των δοκιμασιών Wilcoxon (Two-Related Samples Tests). Στατιστικά σημαντικές διαφορές βρέθηκαν στις τιμές Ct των miRNA-33a και miRNA-378a με p -values 0,049 και 0,02 αντίστοιχα.





Εικόνα 3.2: Τιμές Ct πριν (Pre-ex) και μετά την άσκηση (Post-ex) για καθένα από τα 9 miRNA. Η κάτω πλευρά των ορθογώνιων «κουτιών» αντιστοιχεί στο 1^ο τεταρτημόριο, και η άνω στο 3^ο τεταρτημόριο. Οι οριζόντιες γραμμές μέσα στα κουτιά αντιστοιχούν στη διάμεσο, ενώ οι παράλληλες με τη διάμεσο γραμμές εκτός των κουτιών αντιστοιχούν στη μικρότερη και μεγαλύτερη τιμή. Στα διαγράμματα Γ και Θ παρουσιάζονται τα miRNA-33a και 378a αντίστοιχα, στα οποία διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική αλλαγή στις τιμές Ct μετά την άσκηση (* $p < 0,05$). Στο διάγραμμα Ε φαίνονται οι τιμές του miRNA-146a, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως ενδογενές γονίδιο αναφοράς. Οι ακραίες παρατηρήσεις που εμφανίστηκαν σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν παραλειφθεί.

Πίνακας 3.5: Αποτελέσματα μη παραμετρικής δοκιμασίας Wilcoxon μεταξύ των μεταβλητών Ct-ηρεμίας και Ct-άσκησης. * $p < 0,05$.

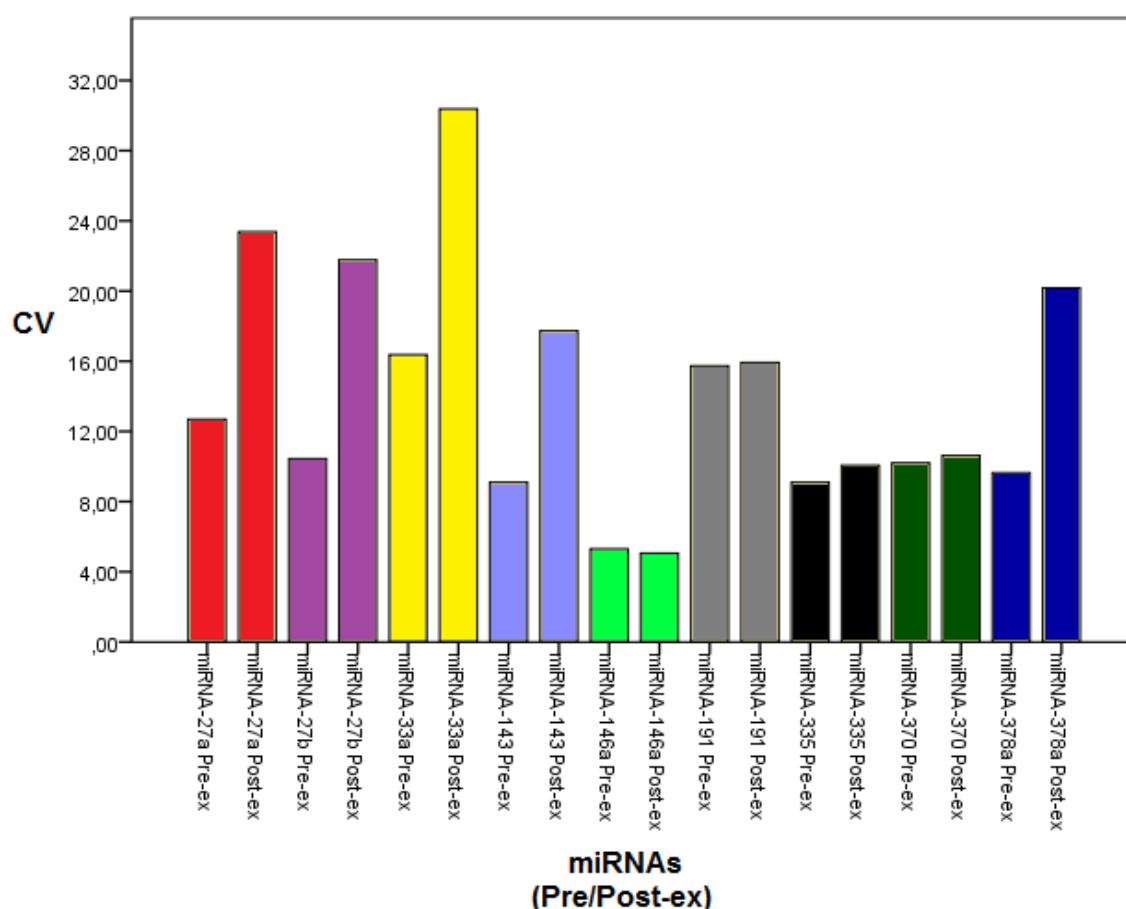
Ct (Ηρεμία-Άσκηση)	p-value
miRNA-27a-3p	0,711
miRNA-27b-3p	0,421
miRNA-33a-5p	0,049*
miRNA-143-3p	0,099
miRNA-146a-5p	0,126
miRNA-191	0,234
miRNA-335-5p	0,227
miRNA-370	0,52
miRNA-378a-5p	0,02*

3.5. Περιγραφικά μέτρα Ct – επιλογή ενδογενούς γονιδίου αναφοράς

Τα περιγραφικά μέτρα των μεταβλητών Ct (μέσες τιμές, τυπικές αποκλίσεις, συντελεστές μεταβλητότητας) συνοψίζονται στον πίνακα 3.6, ενώ στην εικόνα 3.3 παρουσιάζονται συγκριτικά οι τιμές των συντελεστών μεταβλητότητας πριν και μετά την άσκηση για καθένα από τα 9 miRNA. Διαπιστώθηκε ότι το miRNA-146a-5p παρουσίασε τη μικρότερη τυπική απόκλιση από όλα τα υποψήφια miRNA (1,57 πριν και 1,51 μετά την άσκηση), καθώς επίσης και το μικρότερο συντελεστή μεταβλητότητας (5,31 πριν και 5,06 μετά την άσκηση). Έτσι, παρά το γεγονός ότι κατά το σχεδιασμό της παρούσας έρευνας επιλέχθηκε το miR-191 ως ενδογενές γονίδιο αναφοράς, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [61], το miRNA που τελικά χρησιμοποιήθηκε ήταν το miRNA-146a-5p, το οποίο φάνηκε καταλληλότερο σύμφωνα με τα προαναφερθέντα αποτελέσματα.

Πίνακας 3.6: Περιγραφικά μέτρα των μεταβλητών Ct πριν και μετά την άσκηση.

Ct	Μέση Τιμή (Mean) Πριν την άσκηση	Μέση Τιμή (Mean) Μετά την άσκηση	Τυπική Απόκλιση (SD) Πριν την άσκηση	Τυπική Απόκλιση (SD) Μετά την άσκηση	Συντ. Μεταβλητότητας (CV) Πριν την άσκηση	Συντ. Μεταβλητότητας (CV) Μετά την άσκηση
miRNA-27a-3p	23,73	22,76	3,01	5,32	12,69	23,38
miRNA-27b-3p	27,83	27,46	2,91	5,98	10,44	21,78
miRNA-33a-5p	25,09	22,19	4,11	6,74	16,37	30,38
miRNA-143-3p	26,96	27,01	2,45	4,79	9,10	17,73
miRNA-146a-5p	29,50	29,87	1,57	1,51	5,31	5,06
miRNA-191	23,71	24,15	3,73	3,85	15,73	15,93
miRNA-335-5p	30,45	30,77	2,77	3,09	9,10	10,06
miRNA-370	32,56	32,85	3,32	3,49	10,21	10,62
miRNA-378a-5p	31,00	30,77	2,99	6,21	9,65	20,18



Εικόνα 3.3: Συγκριτική παρουσίαση των συντελεστών μεταβλητότητας (CV) κάθε miRNA πριν και μετά την άσκηση. Η πρώτη μπάρα κάθε χρώματος αντιστοιχεί στο συντελεστή μεταβλητότητας πριν την άσκηση, ενώ η δεύτερη στο συντελεστή μεταβλητότητας μετά την άσκηση. Το miRNA-146a (ανοιχτό πράσινο χρώμα) παρουσιάζει το χαμηλότερο συντελεστή μεταβλητότητας και στις δύο περιπτώσεις.

3.6. Δοκιμασία Wilcoxon / t test στις τιμές ΔCt

Στις περιπτώσεις όπου η δοκιμασία Shapiro-Wilk έδειξε κανονική κατανομή για τις μεταβλητές ΔCt (πριν και μετά την άσκηση), εφαρμόστηκε t-test (Paired-Samples t Test). Τα αποτελέσματα των δοκιμασιών Wilcoxon και t test παρουσιάζονται στον πίνακα 3.7. Στατιστικά σημαντικές διαφορές διαπιστώθηκαν στις μεταβλητές ΔCt των miRNA-33a και miRNA-378a, με τιμές $p = 0,028$ και $0,011$ αντίστοιχα.

Πίνακας 3.7: Αποτελέσματα μη παραμετρικής δοκιμασίας (Wilcoxon) και παραμετρικής (t test) μεταξύ των μεταβλητών ΔCt-ηρεμίας και ΔCt-άσκησης. * $p < 0,05$.

ΔCt (Ηρεμία – Άσκηση)	p (Wilcoxon's)	p (t-test)
miRNA-27a-3p	0,21	
miRNA-27b-3p		0,1
miRNA-33a-5p		0,028*
miRNA-143-3p		0,307
miRNA-191	0,363	
miRNA-335-5p	0,717	
miRNA-370		0,786
miRNA-378a-5p		0,011*

3.7. t test στις τιμές ΔΔCt

Οι μεταβλητές ΔΔCt παρουσίασαν κανονική κατανομή, οπότε εφαρμόστηκε σε όλες t test (One-Sample T Test). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 3.8. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές συμφωνούν με αυτές των μεταβλητών Ct και ΔCt (miRNA-33a και miRNA-378a, με p -values $0,014$ και $0,011$ αντίστοιχα).

Πίνακας 3.8: Αποτελέσματα παραμετρικής δοκιμασίας *t* test των μεταβλητών $\Delta\Delta Ct$. **p* < 0,05.

$\Delta\Delta Ct$	<i>p</i> (<i>t</i> test)
miRNA-27a-3p	0,984
miRNA-27b-3p	0,123
miRNA-33a-5p	0,014*
miRNA-143-3p	0,412
miRNA-191	0,131
miRNA-335-5p	0,155
miRNA-370	0,906
miRNA-378a-5p	0,011*

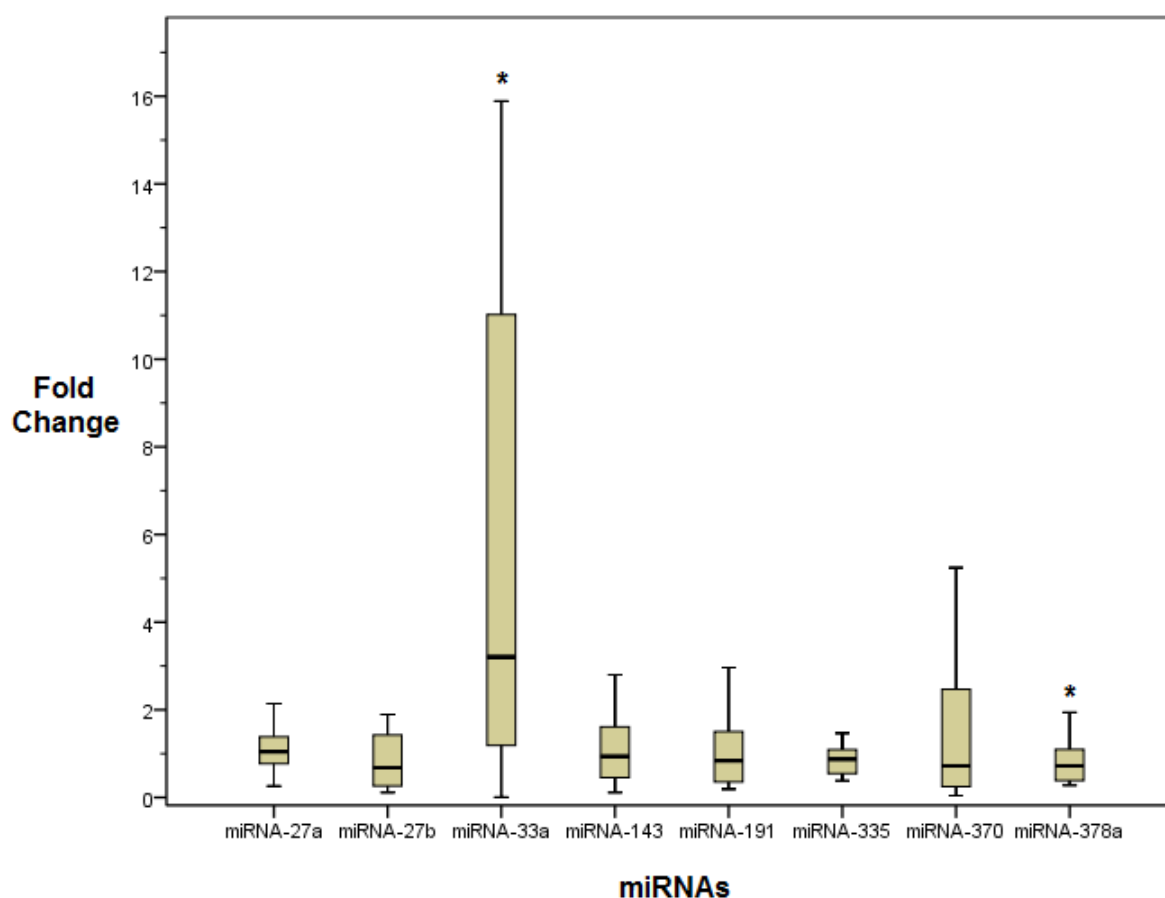
3.8. Δοκιμασία Wilcoxon στις τιμές $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Οι μέσες τιμές των μεταβλητών $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Fold Change), καθώς και τα αποτελέσματα των δοκιμασιών Wilcoxon παρουσιάζονται στον πίνακα 3.9, ενώ η εικόνα 3.4 δείχνει συγκριτικά τις μεταβλητές $2^{-\Delta\Delta Ct}$ για καθένα από τα 8 miRNA. Στατιστικά σημαντικές διαφορές βρέθηκαν στο miRNA-33a (fold change $7,66 \pm 2,94$, *p*-value 0,012), και στο miRNA-378a (fold change $0,79 \pm 0,11$, *p*-value 0,048).

Πιο αναλυτικά, η τιμή 7,66 δείχνει ότι η έκφραση του miRNA-33a (και συνεπώς η συγκέντρωσή του) μετά την άσκηση, αντιστοιχούσε στο 766% της έκφρασής του πριν την άσκηση, δηλαδή η ποσότητά του αυξήθηκε πάνω από 7 φορές. Αντίστοιχα, η τιμή 0,79 δείχνει ότι η έκφραση του miRNA-378a μετά την άσκηση αντιστοιχούσε στο 79% της έκφρασής του πριν την άσκηση, δηλαδή η ποσότητά του μειώθηκε κατά 21%.

Πίνακας 3.9: Ποσοτική αλλαγή των μελετώμενων miRNA μετά την άσκηση (fold change) και αποτελέσματα μη παραμετρικής δοκιμασίας Wilcoxon των μεταβλητών $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (* $p < 0,05$). Οι τιμές της στήλης fold change αντιστοιχούν στις μέσες τιμές $2^{-\Delta\Delta C_t} \pm$ τυπικό σφάλμα και δείχνουν τα επίπεδα έκφρασης των αντίστοιχων miRNA μετά την άσκηση, συγκριτικά με τα επίπεδα ηρεμίας.

$2^{-\Delta\Delta C_t}$	Fold Change	p (Wilcoxon's)
miRNA-27a-3p	1,24 $\pm$ 0,22	0,594
miRNA-27b-3p	1,00 $\pm$ 0,23	0,532
miRNA-33a-5p	7,66 $\pm$ 2,94	0,012*
miRNA-143-3p	1,29 $\pm$ 0,31	0,811
miRNA-191	0,97 $\pm$ 0,20	0,334
miRNA-335-5p	0,94 $\pm$ 0,12	0,287
miRNA-370	1,93 $\pm$ 0,61	0,407
miRNA-378a-5p	0,79 $\pm$ 0,11	0,048*



Εικόνα 3.4: Συγκριτική παρουσίαση των μεταβλητών $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (fold change) για τα 8 μελετώμενα miRNA (* $p < 0,05$). Η κάτω πλευρά των ορθογώνιων «κουτιών» αντιστοιχεί στο 1^ο τεταρτημόριο, και η άνω στο 3^ο τεταρτημόριο. Οι οριζόντιες γραμμές μέσα στα κουτιά αντιστοιχούν στη διάμεσο, ενώ οι παράλληλες με τη διάμεσο γραμμές εκτός των κουτιών αντιστοιχούν στη μικρότερη και μεγαλύτερη τιμή. Οι ακραίες παρατηρήσεις που εμφανίστηκαν σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν παραλειφθεί.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας έδειξαν ότι μια συνεδρία έντονης, αερόβιας άσκησης εναλλασσόμενης έντασης, διάρκειας 50 λεπτών, οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μεταβολή της έκφρασης των miR-33a και miR-378a, που συμμετέχουν στο μεταβολισμό του λίπους και τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων, σε δείγματα ανθρώπινου σάλιου. Πιο αναλυτικά, η έκφραση του miR-33a αυξήθηκε πάνω από 7,5 φορές μετά την άσκηση, ενώ η έκφραση του miR-378a μειώθηκε κατά 21% μετά την άσκηση.

Δεδομένου ότι δεν έχουν δημοσιευτεί μέχρι σήμερα μελέτες που να εξετάζουν την επίδραση της άσκησης στα miRNA του ανθρώπινου σάλιου, η σύγκριση των αποτελεσμάτων μας με ευρήματα άλλων ερευνητών δεν είναι εφικτή. Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί ότι σε μια έρευνα που δημοσιεύτηκε το 2011 [34], βρέθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του miR-378 μετά από προπόνηση με αντιστάσεις 12 εβδομάδων, σε δείγματα βιοψιών του έξω πλατέος μυός (*vastus lateralis*). Η μείωση αυτή συσχετίστηκε με αύξηση της άλιπης μάζας σώματος των συμμετεχόντων [34] και όχι με το ρόλο του συγκεκριμένου miRNA στο μεταβολισμό του λιπιδίων, εύρημα το οποίο αποδεικνύει το «ευρύ φάσμα» δράσης των miRNA στους διάφορους ιστούς.

4.1. Είναι δυνατόν τα miRNA που εκφράζονται και δρουν σε συγκεκριμένους ιστούς και όργανα να εμφανίζονται στο σάλιο;

Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι τα miRNA μπορούν να προσληφθούν από ενδοκυτταρικά κυστίδια (όπως π.χ από τα εξωσωμάτια), να απελευθερωθούν στην κυκλοφορία χωρίς να διασπαστούν από τις ριβονουκλεάσες (πιθανώς λόγω του ότι καλύπτονται με πρωτεΐνες ή βρίσκονται μέσα σε κυστίδια), αλλά και να μεταφερθούν σε άλλα κύτταρα μέσω της κυκλοφορίας [62, 63], μπορούμε να υποθέσουμε ότι οι ευρεθείσες μεταβολές στην έκφραση των miR-33a και miR-378a του σάλιου αντικατοπτρίζουν εκείνες των ιστών στους οποίους εκφράζονται και δρουν, μεταξύ των οποίων είναι το ήπαρ και ο λιπώδης ιστός. Η άποψη αυτή ενισχύεται και από μια πολύ πρόσφατη έρευνα [46], κατά την οποία ανιχνεύτηκε στην κυκλοφορία του αίματος η παρουσία miRNA που εκφράζονται στους μύες.

Το σάλιο είναι ένα πολύπλοκο υγρό, το οποίο αποτελείται από εκκρίσεις των μειζόνων και ελασσόνων σιελογόνων αδένων [63]. Υπάρχουν συνολικά 450-750 ελάσσονες σιελογόνοι αδένες, οι οποίοι εντοπίζονται στη γλώσσα, στην παρειακή βλεννογόνο και στον ουρανίσκο [63]. Επιπλέον, υπάρχει εκτεταμένη παροχή αίματος

στους σιελογόνους αδένες και, για το λόγο αυτόν, πολλά μόρια που ανιχνεύονται στο πλάσμα (όπως πρωτεΐνες, DNA και RNA), εντοπίζονται και στο σάλιο [63]. Αυτό αποδεικνύεται και από το γεγονός ότι το πλάσμα και το σάλιο περιέχουν μεγάλο αριθμό κοινών miRNA [53].

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων καθίσταται δυνατή η εισροή των miRNA από τα κύτταρα στα υγρά του σώματος δεν είναι ξεκάθαροι [63]. Ο Kosaka και οι συνεργάτες του βρήκαν ότι η απελευθέρωση των miRNA από τα κύτταρα ρυθμίζεται από την ουδέτερη σφιγγομυελινάση 2 (nSMase2) [63]. Όταν αυξάνεται η συγκέντρωση των κεραμιδίων στα κύτταρα, η nSMase2 προάγει την απελευθέρωση των miRNA [63]. Αναστολή της nSMase2 προκαλεί παρεμπόδιση της απελευθέρωσης των miRNA από τα κύτταρα [63].

4.2. Με ποιους μηχανισμούς οι αλλαγές που επέφερε η άσκηση στην έκφραση των miR-33a και miR-378a επηρεάζουν το μεταβολισμό των λιπιδίων;

Όπως προαναφέρθηκε, ολοένα και περισσότερα ερευνητικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι η άσκηση επιφέρει μεταβολές στην έκφραση των miRNA, οι οποίες με τη σειρά τους επηρεάζουν τα γονίδια-στόχους των miRNA, ρυθμίζοντας τελικά τις φυσιολογικές διεργασίες που εξαρτώνται από τα γονίδια αυτά. Στην ενότητα 1.3 παρουσιάστηκαν τα σχετικά ευρήματα και αναφέρθηκαν οι φυσιολογικές διεργασίες που φαίνεται να ρυθμίζονται από τα μελετώμενα miRNA. Στην ενότητα αυτή, θα προσπαθήσουμε να εξηγήσουμε τις ευρεθείσες μεταβολές στην έκφραση των miR-33a και miR-378a μετά την άσκηση, καθώς και την επίδραση που μπορεί αυτές να έχουν στο μεταβολισμό των λιπιδίων.

4.2.1. Επίδραση της άσκησης στο μεταβολισμό των λιπιδίων μέσω αύξησης της έκφρασης του miR-33a

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, το miR-33a εμπλέκεται στο μεταβολισμό της χοληστερόλης και των λιπαρών οξέων στο ήπαρ πειραματοζώων [13, 14, 17- 21]. Δεδομένα για την επίδραση της άσκησης στον ηπατικό μεταβολισμό της χοληστερόλης στον άνθρωπο υπάρχουν μόνο έμμεσα, δηλαδή μέσω της μέτρησης της ίδιας και των λιποπρωτεϊνών που είναι φορείς της στο αίμα [64-66]. Από τα δεδομένα αυτά προκύπτει ότι η οξεία άσκηση δεν προκαλεί συνήθως μεταβολές στη χοληστερόλη του αίματος ή προκαλεί μόνο σε περίπτωση υψηλής ενεργειακής δαπάνης [67, 68], γεγονός

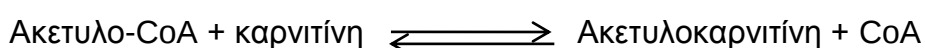
που μας περιορίζει στην αναζήτηση πιθανής επίδρασης της αύξησης του miR-33a στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, ο οποίος, αντίθετα με τη χοληστερόλη, επηρεάζεται από την άσκηση. Με βάση το εύρημα ότι η αποσιώπηση των miR-33a και miR-33b στον αφρικανικό πράσινο πίθηκο οδήγησε σε αυξημένη έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στην οξειδωση των λιπαρών οξέων και μειωμένη έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση των λιπαρών οξέων [21], μπορούμε να υποθέσουμε ότι η αύξηση της έκφρασης του miR-33a στο σάλιο των ασκηθέντων στην παρούσα έρευνα ίσως οδήγησε σε μειωμένη οξειδωση και αυξημένη σύνθεση λιπαρών οξέων στο ήπαρ.

Όσον αφορά στο μηχανισμό μέσω του οποίου επιτεύχθηκε η αύξηση της έκφρασης του miR-33a ως απόκριση στην άσκηση, υπάρχουν δύο ενδεχόμενα: 1. Είναι πιθανό η άσκηση να προκάλεσε αύξηση της έκκρισης του miR-33a από ιστούς στους οποίους παράγεται. 2. Ενδεχομένως, η άσκηση προκάλεσε μείωση της πρόσληψης του miR-33a του αίματος από κύτταρα, με επακόλουθο την αύξηση των επιπέδων του στην κυκλοφορία και στα υπόλοιπα υγρά του σώματος, δεδομένου ότι *in vitro* πειράματα έχουν δείξει ότι τα miRNA που περιέχονται στα εξωσωμάτια είναι δυνατόν να μεταφερθούν σε διάφορα κύτταρα-παραλήπτες, επηρεάζοντας με αυτό τον τρόπο τις βιολογικές τους λειτουργίες [46].

4.2.2. Επίδραση της άσκησης στο μεταβολισμό των λιπιδίων μέσω μείωσης της έκφρασης του miR-378a

Γνωρίζοντας ότι κατά τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων παρατηρείται επαγωγή του miR-378/378* [31], μπορούμε να διατυπώσουμε την άποψη ότι η μείωση της έκφρασης του miR-378a που βρέθηκε στην παρούσα έρευνα είναι δυνατόν να οδηγήσει σε αναστολή της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων. Επιπλέον, δεδομένου ότι η υπερέκφραση του miR-378/378* οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης της FAS και της *de novo* λιπογένεσης [31], είναι πιθανό ότι η μείωση των επιπέδων του miR-378a οδηγεί σε μείωση της FAS και της *de novo* λιπογένεσης, με αποτέλεσμα τη μείωση της συσσώρευσης TG στα λιποκύτταρα.

Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι το γονίδιο της Ο-ακετυλοτρανσφεράσης της καρνιτίνης (CRAT) καταστέλλεται παρουσία του miR-378 και επάγεται απουσία αυτού (εικόνα 1.4) στο ήπαρ ποντικών [32]. Η CRAT ανήκει στην οικογένεια των ακυλοτρανσφερασών της καρνιτίνης και καταλύει τη μετατροπή του ακετυλοσυνενζύμου Α σε ακετυλοκαρνιτίνη σύμφωνα με την αντίδραση:



Έτσι η CRAT δρα ως «σύστημα εξισορρόπησης» για τη διατήρηση των απαιτούμενων επιπέδων ακετυλοσυνενζύμου A και συνενζύμου A στα διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα [69], επιδρώντας με αυτόν τον τρόπο στον οξειδωτικό μεταβολισμό μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος [32, 69].

Βασιζόμενοι στα παραπάνω δεδομένα, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η μείωση της έκφρασης του miR-378a οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης του γονιδίου-στόχου *Crat*, με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της CRAT. Η αύξηση των επιπέδων του ενζύμου αυτού μπορεί να προκάλεσε με τη σειρά της επιτάχυνση της παραπάνω αντίδρασης προς την κατεύθυνση που ευνοείται θερμοδυναμικά κατά την άσκηση, δηλαδή προς τα δεξιά (λόγω υπερπαραγωγής ακετυλο-CoA ως προϊόντος της αερόβιας διάσπασης τόσο του γλυκογόνου όσο και των λιπαρών οξέων).

Όσον αφορά στους πιθανούς μηχανισμούς μέσω των οποίων επιτεύχθηκε η μείωση της έκφρασης του miR-378a ως απόκριση στην άσκηση, υπάρχουν τρία ενδεχόμενα: 1. Είναι πιθανό η άσκηση να προκάλεσε μείωση της έκκρισης του miR-378a από τα κύτταρα στα οποία εκφράζεται (κυρίως κύτταρα του φαιού λιπώδους ιστού) στην κυκλοφορία [31, 46]. 2. Ενδεχομένως η άσκηση προκάλεσε αύξηση της πρόσληψης του miR-378a από τα διάφορα κύτταρα-παραλήπτες [46]. 3. Το στρες που προκλήθηκε από την άσκηση (οξειδωτικό, ορμονικό, μηχανικό, οσμωτικό) ενδεχομένως οδήγησε σε καταστροφή ορισμένων εξωσωματίων στα οποία εγκλείονται τα miRNA [46], με αποτέλεσμα την διάσπαση ορισμένων μορίων miR-378a από τις ριβονουκλεάσες και τελικά τη μείωση των επιπέδων του συγκεκριμένου miRNA στα εξωκυτταρικά υγρά.

Τέλος, γνωρίζοντας ότι οι μεταβολές της έκφρασης του miR-378 έχουν συσχετιστεί με την αύξηση της άλιπης μάζας σώματος μετά από προπόνηση με αντιστάσεις [34], θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί εάν η αύξηση αυτή συνοδεύεται από μείωση της λιπογένεσης ή/και της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων.

4.3. Περιορισμοί

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 1, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της άσκησης σε 8 miRNA που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων. Η άσκηση που επιλέχθηκε προς μελέτη ήταν η οξεία, αερόβια άσκηση εναλλασσόμενης έντασης. Ένας περιορισμός της παρούσας έρευνας είναι ότι η ένταση της άσκησης δεν ελέγχθηκε επακριβώς, όπως αναλύεται παρακάτω. Ένας δεύτερος

περιορισμός είναι οι μεγάλες διαφορές μεταξύ των τριών Ct ορισμένων miRNA σε ορισμένα δείγματα, όπως επίσης αναλύεται παρακάτω.

4.3.1. Ένταση της άσκησης

Δεδομένου ότι το spinning πραγματοποιείται ως ομαδική άσκηση κατά την οποία ο κάθε ασκούμενος μπορεί να συμμετάσχει ανάλογα με την αντοχή του, υπάρχει μια αβεβαιότητα ως προς την ομοιομορφία της έντασης στην οποία πραγματοποιήθηκε η κάθε συνεδρία. Για παράδειγμα, ορισμένοι από τους συμμετέχοντες δεν ήταν αρκετά προπονημένοι ώστε να αντεπεξέλθουν στην ένταση του προγράμματος, με αποτέλεσμα να σταματούν κατά τη διάρκεια της άσκησης ή να ποδηλατούν με χαμηλότερη αντίσταση από αυτή που πρότεινε ο προπονητής.

Επιπλέον, επειδή οι δειγματοληψίες διεξήχθησαν σε δύο διαφορετικά γυμναστήρια, πρέπει να ληφθούν υπόψη οι πιθανές διαφορές των προγραμμάτων που ακολουθούσαν οι διαφορετικοί προπονητές, οι οποίοι ήταν 5 στο σύνολό τους. Ιδανικά, οι συμμετέχοντες θα έπρεπε να συμμετάσχουν σε ένα ενιαίο πρόγραμμα, έτσι ώστε να διασφαλίσουμε ομοιομορφία ως προς τη δομή και την ένταση του προγράμματος. Κάτι τέτοιο όμως δεν ήταν εφικτό, δεδομένου ότι οι συμμετέχοντες δεν ξεπερνούσαν τους 6 ανά συνεδρία και είχαν διαφορετικούς προπονητές.

Τέλος, λόγω του ότι δεν υπήρχε διαθεσιμότητα πολλών καρδιοσυχνόμετρων, η εκτίμηση της έντασης έγινε με τη χρήση της 10βάθμιας κλίμακας του Borg (ενότητα 2.3). Έτσι, υπάρχει το ενδεχόμενο εσφαλμένης δήλωσης της εκλαμβανόμενης έντασης από τους συμμετέχοντες.

4.3.2. Διασπορά τιμών Ct

Κατά τη διεξαγωγή της qPCR εμφανίστηκαν περιπτώσεις στις οποίες οι τρεις τιμές Ct ενός miRNA σε ένα δείγμα διέφεραν αρκετά μεταξύ τους, οπότε κρίθηκε αναγκαίο να εφαρμοστεί κάποιο κριτήριο αποκλεισμού μίας τιμής (ενότητα 2.8). Όμως, ακόμη και μετά την εφαρμογή του κριτηρίου, οι τιμές που απέμεναν διέφεραν κατά πολύ μεταξύ τους σε ορισμένες περιπτώσεις. Οι περισσότερες «προβληματικές» τιμές εντοπίστηκαν στην περίπτωση του miR-33a για άγνωστο λόγο. Πιθανολογείται ότι ο λόγος σχετίζεται με την κατασκευή των primer που χρησιμοποιήθηκαν τόσο στο στάδιο της ανάστροφης μεταγραφής όσο και σε αυτό της qPCR ή/και στη φύση του συγκεκριμένου miRNA.

4.4. Συμπεράσματα

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η επίδραση της οξείας, έντονης, αερόβιας άσκησης εναλλασσόμενης έντασης στην έκφραση 8 miRNA που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων, σε δείγματα ανθρώπινου σάλιου. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων και τα συμπεράσματα που μπορούν να διεξαχθούν από αυτά είναι τα εξής:

1. Οξεία, έντονη, αερόβια άσκηση εναλλασσόμενης έντασης, διάρκειας 50 λεπτών προκάλεσε αύξηση της έκφρασης του miR-33a στο σάλιο κατά περίπου 7,5 φορές, σε σχέση με τα επίπεδα ηρεμίας (fold change $7,66 \pm 2,94$).
2. Η ίδια άσκηση προκάλεσε μείωση της έκφρασης του miR-378a στο σάλιο, η οποία υπολογίστηκε περίπου στο 20% (fold change $0,79 \pm 0,11$).
3. Δεδομένου ότι τα miRNA μπορούν να προσληφθούν από τα εξωσωμάτια, να απελευθερωθούν στην κυκλοφορία, και να μεταφερθούν σε άλλα κύτταρα μέσω της κυκλοφορίας, οι μεταβολές στην έκφραση των miR-33a και miR-378a του σάλιου πιθανώς αντικατοπτρίζουν μεταβολές στους ιστούς στους οποίους εκφράζονται και δρουν, μεταξύ των οποίων είναι το ήπαρ και ο λιπώδης ιστός. Αυτό αποδεικνύεται και από το γεγονός ότι το πλάσμα και το σάλιο περιέχουν μεγάλο αριθμό κοινών miRNA.
4. Η αύξηση της έκφρασής του miR-33a πιθανώς οδηγεί σε μειωμένη οξειδωση και αυξημένη σύνθεση λιπαρών οξέων στο ήπαρ, λόγω μείωσης της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στην οξειδωση λιπαρών οξέων στο μιτοχόνδριο και αύξησης της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση λιπαρών οξέων.
5. Η μείωση της έκφρασης του miR-378a πιθανώς οδηγεί σε περιορισμένη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων και σε μείωση της FAS και της de novo λιπογένεσης, με αποτέλεσμα τη μείωση της συσσώρευσης TG στα λιποκύτταρα.
6. Επιπλέον, η μείωση της έκφρασης του miR-378a πιθανώς οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης του γονιδίου-στόχου *Crot*, με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της Ο-ακετυλοτρανσφεράσης της καρνιτίνης, αυξάνοντας έτσι τον οξειδωτικό μεταβολισμό και κατ' επέκταση την παραγωγή ενέργειας.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας αποδεικνύουν ότι μία συνεδρία αερόβιας άσκησης εναλλασσόμενης έντασης επιδρά στην έκφραση των miRNA, προκαλώντας αυξομειώσεις οι οποίες πιθανώς επηρεάζουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων, με αποτέλεσμα τη ρύθμιση φυσιολογικών

αποκρίσεων του οργανισμού που σχετίζονται με την άσκηση. Εάν οι προτεινόμενοι μηχανισμοί μεταβολής της έκφρασης των miRNA του μεταβολισμού επιβεβαιωθούν από άλλους ερευνητές και μελετηθούν και σε άλλα εξωκυτταρικά υγρά, είναι πιθανό να αποδειχθεί ότι οι μεταβολές των miRNA στους διάφορους ιστούς αντικατοπτρίζονται αξιόπιστα στα διάφορα βιολογικά υγρά. Εάν κάτι τέτοιο επιβεβαιωθεί, η μελλοντική μελέτη της δράσης των miRNA θα καταστεί ευκολότερη, δεδομένου ότι οι βιοψίες των ανθρώπινων οργάνων είναι δύσκολες και σε αρκετές περιπτώσεις ανέφικτες.

4.5. Μελλοντικές κατευθύνσεις

Επειδή μέχρι σήμερα η επίδραση της άσκησης στα miRNA που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων δεν έχει μελετηθεί ή τουλάχιστον δεν έχουν δημοσιευτεί αντίστοιχα ερευνητικά δεδομένα, κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση του θέματος. Για παράδειγμα, θα ήταν ενδιαφέρον να γίνει προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των συγκεκριμένων miRNA στην κυκλοφορία του αίματος ή σε άλλα εξωκυτταρικά υγρά, ακόμη και σε ιστούς οργάνων (π.χ βιοψίες λιπώδους ή μυϊκού ιστού). Με αυτό τον τρόπο θα μπορούσε να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων της παρούσας έρευνας, με ευρήματα που αφορούν σε άλλα βιολογικά υγρά ή κύτταρα.

Επιπλέον, δεδομένου ότι ο μεταβολισμός των λιπιδίων σχετίζεται με την παχυσαρκία, το μεταβολικό σύνδρομο και κατ' επέκταση με τον καρδιαγγειακό κίνδυνο, θα ήταν χρήσιμο και ενδιαφέρον να διεξαχθούν έρευνες που θα εξετάσουν την επίδραση διαφορετικών ειδών άσκησης (π.χ. προπόνηση αντοχής ή προπόνηση με αντιστάσεις) στα επίπεδα των miRNA που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων, τόσο σε υγιή άτομα όσο και σε ασθενείς. Έτσι, θα μπορούσε να αποδειχθεί ότι η άσκηση έχει παρόμοια αποτελέσματα με αυτά φαρμακευτικών παρεμβάσεων οι οποίες στοχεύουν στην αναστολή ή επαγωγή συγκεκριμένων miRNA που εμπλέκονται σε σχετικά νοσήματα.

Τα miRNA αποτελούν ένα ταχύτατα αναπτυσσόμενο ερευνητικό πεδίο, το οποίο δίνει τη δυνατότητα διεξαγωγής πληθώρας μελετών και δημιουργίας καινοτόμων θεραπευτικών παρεμβάσεων. Αναφορικά με το ρόλο τους στο μεταβολισμό των λιπιδίων, ο οποίος μόλις πρόσφατα έγινε κατανοητός, είναι πολύ πιθανό να ανακαλυφθούν καινούρια miRNA τα οποία θα συμβάλουν στην καλύτερη κατανόηση του ρυθμιστικού τους ρόλου στον ανθρώπινο οργανισμό.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ambros V. *The functions of animal microRNAs*. Nature. 2004;431(7006):350-355.
2. Ambros V. *MicroRNA Pathways in Flies and Worms: Growth, Death, Fat, Stress, and Timing*. Cell. 2003;113(6):673-676.
3. Bartel D.P. *MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions*. Cell. 2009;136(2):215-233. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002.
4. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. *Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units*. Genome Res. 2004;14(10A):1902-1910.
5. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell. 1993;75(5):843-854.
6. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. *Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?* Nat Rev Genet. 2008;9(2):102-114. doi: 10.1038/nrg2290.
7. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans*. Cell. 1993;75(5):855-862.
8. Faller M, Guo F. *MicroRNA biogenesis: There's more than one way to skin a cat*. Biochimica et Biophysica Acta. 2008;1779(11):663-667. doi: 10.1016/j.bbagr.2008.08.005.
9. Fernandes-Silva MM, Carvalho VO, Guimarães GV, Bacal F, Bocchi EA. *Physical exercise and microRNAs: new frontiers in heart failure*. Arq Bras Cardiol. 2012;98(5):459-466.
10. Yang JS, Lai EC. *Alternative miRNA Biogenesis Pathways and the Interpretation of Core miRNA Pathway Mutants*. Molecular Cell. 2011;43(6):892-903. doi: 10.1016/j.molcel.2011.07.024.
11. Graves P, Zeng Y. *Biogenesis of Mammalian MicroRNAs: A Global View*. Genomics Proteomics Bioinformatics. 2012;10(5):239-245. doi: 10.1016/j.gpb.2012.06.004.
12. Carthew RW, Sontheimer EJ. *Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs*. Cell. 2009;136(4):642-655. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.035.

13. Fernández-Hernando C, Suárez Y, Rayner KJ, Moore KJ. *MicroRNAs in lipid metabolism*. Curr Opin Lipidol. 2011;22(2):86-92. doi: 10.1097/MOL.0b013e3283428d9d.
14. Sacco J, Adeli K. *MicroRNAs: emerging roles in lipid and lipoprotein metabolism*. Curr Opin Lipidol. 2012;23(3):220-225. doi: 10.1097/MOL.0b013e3283534c9f.
15. Chen WJ, Yin K, Zhao GJ, Fu YC, Tang CK. *The magic and mystery of MicroRNA-27 in atherosclerosis*. Atherosclerosis. 2012;222(2):314-323. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.01.020.
16. Vickers KC, Shoucri BM, Levin MG, Wu H, Pearson DS, Osei-Hwedie D, Collins FS, Remaley AT, Sethupathy P. *MicroRNA-27b is a regulatory hub in lipid metabolism and is altered in dyslipidemia*. Hepatology. 2013;57(2):533-542. doi: 10.1002/hep.25846.
17. Moore KJ, Rayner KJ, Suárez Y, Fernández-Hernando C. *MicroRNAs and cholesterol metabolism*. Trends Endocrinol Metab. 2010;21(12):699-706. doi: 10.1016/j.tem.2010.08.008.
18. Rayner KJ, Fernandez-Hernando C, Moore KJ. *MicroRNAs regulating lipid metabolism in atherogenesis*. Thromb Haemost. 2012;107(4):642-647. doi: 10.1160/TH11-10-0694.
19. Chen WJ, Zhang M, Zhao GJ, Fu Y, Zhang DW, Zhu HB, Tang CK. *MicroRNA-33 in atherosclerosis etiology and pathophysiology*. Atherosclerosis. 2013;227(2):201-208. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.11.025.
20. Flowers E, Froelicher ES, Aouizerat BE. *MicroRNA regulation of lipid metabolism*. Metabolism. 2013;62(1):12-20. doi: 10.1016/j.metabol.2012.04.009.
21. Rayner KJ, Esau CC, Hussain FN, McDaniel AL, Marshall SM, van Gils JM, Ray TD, Sheedy FJ, Goedeke L, Liu X, et al. *Inhibition of miR-33a/b in non-human primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides*. Nature. 2011; 478(7369):404-407. doi: 10.1038/nature10486.
22. Goedeke L, Vales-Lara FM, Fenstermaker M, Cirera-Salinas D, Chamorro-Jorganes A, Ramírez CM, Mattison JA, de Cabo R, Suárez Y, Fernández-Hernando C. *A regulatory role for miRNA-33* in controlling lipid metabolism gene expression*. Mol Cell Biol. 2013;33(11):2339-52. doi: 10.1128/MCB.01714-12.
23. Esau C, Kang X, Peralta E, Hanson E, Marcusson EG, Ravichandran LV, Sun Y, Koo S, Perera RJ, Jain R, et al. *MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation*. J Biol Chem. 2004;279(50):52361-52365.

24. Kajimoto K, Naraba H, Iwai N. *MicroRNA and 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation*. RNA. 2006;12(9):1626-1632.
25. Li H, Zhang Z, Zhou X, Wang Z, Wang G, Han Z. *Effects of microRNA-143 in the differentiation and proliferation of bovine intramuscular preadipocytes*. Mol Biol Rep. 2011;38(7):4273-4280. doi: 10.1007/s11033-010-0550-z.
26. Takanabe R, Ono K, Abe Y, Takaya T, Horie T, Wada H, Kita T, Satoh N, Shimatsu A, Hasegawa K. *Up-regulated expression of microRNA-143 in association with obesity in adipose tissue of mice fed high-fat diet*. Biochem Biophys Res Commun. 2008;376(4):728-732. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.09.050.
27. Yang K, He YS, Wang XQ, Lu L, Chen QJ, Liu J, Sun Z, Shen WF. *MiR-146a inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced lipid accumulation and inflammatory response via targeting toll-like receptor 4*. FEBS Lett. 2011;585(6):854-860. doi: 10.1016/j.febslet.2011.02.009.
28. Chen T, Li Z, Jing T, Zhu W, Ge J, Zheng X, Pan X, Yan H, Zhu J. *MicroRNA-146a regulates the maturation process and pro-inflammatory cytokine secretion by targeting CD40L in oxLDL-stimulated dendritic cells*. FEBS Lett. 2011; 585(3):567-573. doi: 10.1016/j.febslet.2011.01.010.
29. Nakanishi N, Nakagawa Y, Tokushige N, Aoki N, Matsuzaka T, Ishii K, Yahagi N, Kobayashi K, Yatah S, Takahashi A, et al. *The up-regulation of microRNA-335 is associated with lipid metabolism in liver and white adipose tissue of genetically obese mice*. Biochem Biophys Res Commun. 2009;385(4):492-496. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.05.058.
30. Iliopoulos D, Drosatos K, Hiyama Y, Goldberg IJ, Zannis VI. *MicroRNA-370 controls the expression of microRNA-122 and Cpt1alpha and affects lipid metabolism*. J Lipid Res. 2010; 51(6):1513-1523. doi: 10.1194/jlr.M004812.
31. Gerin I, Bommer GT, McCoin CS, Sousa KM, Krishnan V, MacDougald OA. *Roles for miRNA-378/378* in adipocyte gene expression and lipogenesis*. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2010;299(2):E198-206. doi: 10.1152/ajpendo.00179.2010.
32. Carrer M, Liu N, Grueter CE, Williams AH, Frisard MI, Hulver MW, Bassel-Duby R, Olson EN. *Control of mitochondrial metabolism and systemic energy homeostasis by microRNAs 378 and 378**. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012; 109(38):15330-15335.
33. de Aguiar Vallim T, Tarling E, Kim T, Civelek M, Baldan A, Esau C, Edwards P. *MicroRNA-144 Regulates Hepatic ABCA1 and Plasma HDL Following Activation*

- of the Nuclear Receptor FXR. *Circ Res.* 2013;112(12):1602-12. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.300648.
34. Davidsen PK, Gallagher IJ, Hartman JW, Tarnopolsky MA, Dela F, Helge JW, Timmons JA, Phillips SM. *High responders to resistance exercise training demonstrate differential regulation of skeletal muscle microRNA expression.* *J Appl Physiol.* 2011;110(2):309-317. doi: 10.1152/japplphysiol.00901.2010.
 35. Nielsen S, Scheele C, Yfanti C, Akerström T, Nielsen AR, Pedersen BK, Laye MJ. *Muscle specific microRNAs are regulated by endurance exercise in human skeletal muscle.* *J Physiol.* 2010;588(Pt 20):4029-4037. doi: 10.1113/jphysiol.2010.189860.
 36. Fernandes T, Magalhães FC, Roque FR, Phillips MI, Oliveira EM. *Exercise training prevents the microvascular rarefaction in hypertension balancing angiogenic and apoptotic factors: role of microRNAs-16, -21, and -126.* *Hypertension.* 2012;59(2):513-520. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.185801.
 37. Fernandes T, Hashimoto NY, Magalhães FC, Fernandes FB, Casarini DE, Carmona AK, Krieger JE, Phillips MI, Oliveira EM. *Aerobic exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves regulatory MicroRNAs, decreased angiotensin-converting enzyme-angiotensin ii, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7).* *Hypertension.* 2011; 58(2):182-189. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.168252.
 38. Soci UP, Fernandes T, Hashimoto NY, Mota GF, Amadeu MA, Rosa KT, Irigoyen MC, Phillips MI, Oliveira EM. *MicroRNAs 29 are involved in the improvement of ventricular compliance promoted by aerobic exercise training in rats.* *Physiol Genomics.* 2011;43(11):665-673. doi: 10.1152/physiolgenomics.00145.2010.
 39. DA Silva ND Jr, Fernandes T, Soci UP, Monteiro AW, Phillips MI, DE Oliveira EM. *Swimming training in rats increases cardiac MicroRNA-126 expression and angiogenesis.* *Med Sci Sports Exerc.* 2012;44(8):1453-1462. doi: 10.1249/MSS.0b013e31824e8a36.
 40. Mojtahedi S, Kordi MR, Hosseini SE, Omran SF, Soleimani M. *Effect of treadmill running on the expression of genes that are involved in neuronal differentiation in the hippocampus of adult male rats.* *Cell Biol Int.* 2012. doi: 10.1002/cbin.10022. [Epub ahead of print]
 41. Radom-Aizik S, Zaldivar F Jr, Oliver S, Galassetti P, Cooper DM. *Evidence for microRNA involvement in exercise-associated neutrophil gene expression*

- changes. J Appl Physiol. 2010;109(1):252–261. doi: 10.1152/jappphysiol.01291.2009.
42. Radom-Aizik S, Zaldivar F Jr, Leu SY, Adams GR, Oliver S, Cooper DM. *Effects of exercise on microRNA expression in young males peripheral blood mononuclear cells.* Clin Transl Sci. 2012;5(1):32-38. doi: 10.1111/j.1752-8062.2011.00384.x.
 43. Radom-Aizik S, Zaldivar F, Haddad F, Cooper DM. *Impact of brief exercise on peripheral blood NK cell gene and microRNA expression in young adults.* J Appl Physiol. 2013;114(5):628-636. doi: 10.1152/jappphysiol.01341.2012.
 44. Baggish AL, Hale A, Weiner RB, Lewis GD, Systrom D, Wang F, Wang TJ, Chan SY. *Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training.* J Physiol. 2011;589(Pt 16):3983-3994. doi: 10.1113/jphysiol.2011.213363.
 45. Uhlemann M, Möbius-Winkler S, Fikenzer S, Adam J, Redlich M, Möhlenkamp S, Hilberg T, Schuler GC, Adams V. *Circulating microRNA-126 increases after different forms of endurance exercise in healthy adults.* Eur J Prev Cardiol. 2012. [Epub ahead of print]
 46. Aoi W, Ichikawa H, Mune K, Tanimura Y, Mizushima K, Naito Y, Yoshikawa T. *Muscle-enriched microRNA miR-486 decreases in circulation in response to exercise in young men.* Front Physiol. 2013;4:80. doi: 10.3389/fphys.2013.00080.
 47. Bye A, Røsjø H, Aspenes ST, Condorelli G, Omland T, Wisløff U. *Circulating microRNAs and aerobic fitness – The HUNT-study.* PLoS One. 2013;8(2):e57496. doi: 10.1371/journal.pone.0057496.
 48. Cortez MA, Calin GA. *MicroRN identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases.* Expert Opin Biol Ther. 2009;9(6):703-711. doi: 10.1517/14712590902932889.
 49. Hanke M, Hoefig K, Merz H, Feller AC, Kausch I, Jocham D, Warnecke JM, Sczakiel G. *A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer.* Urol Oncol. 2010; 28(6):655-661. doi: 10.1016/j.urolonc.2009.01.027.
 50. Zubakov D, Boersma AW, Choi Y, van Kuijk PF, Wiemer EA, Kayser M. *MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation.* Int J Legal Med. 2010; 124(3):217-226. doi: 10.1007/s00414-009-0402-3.

51. Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E, Wong DT. *Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection*. Clin Cancer Res. 2009;15(17):5473-5477. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0736.
52. Patel RS, Jakymiw A, Yao B, Pauley BA, Carcamo WC, Katz J, Cheng JQ, Chan EK. *High resolution of microRNA signatures in human whole saliva*. Arch Oral Biol. 2011;56(12):1506-1513. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.05.015.
53. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K. *The microRNA spectrum in 12 body fluids*. Clin Chem. 2010;56(11):1733-1741. doi: 10.1373/clinchem.2010.147405.
54. Gatti R, De Palo EF. *An update: salivary hormones and physical exercise*. Scand J Med Sci Sports. 2011;21(2):157-169. doi: 10.1111/j.1600-0838.2010.01252.x.
55. Gros Lambert A, Hintzy F, Hoffman MD, Dugué B, Rouillon JD. *Validation of a rating scale of perceived exertion in young children*. Int J Sports Med. 2001; 22(2):116-119.
56. Doherty M, Smith PM, Hughes MG, Collins D. *Rating of perceived exertion during high-intensity treadmill running*. Med Sci Sports Exerc. 2001;33(11):1953-1958.
57. Garcin M, Wolff M, Bejma T. *Reliability of rating scales of perceived exertion and heart rate during progressive and maximal constant load exercises till exhaustion in physical education students*. Int J Sports Med. 2003;24(4):285-290.
58. Katsanos CS, Moffatt RJ. *Reliability of heart rate responses at given ratings of perceived exertion in cycling and walking*. Res Q Exerc Sport. 2005; 76(4):433-439.
59. Psycharakis SG. *A longitudinal analysis on the validity and reliability of ratings of perceived exertion for elite swimmers*. J Strength Cond Res. 2011; 25(2):420-426. doi: 10.1519/JSC.0b013e3181bff58c.
60. Lagally KM, Costigan EM. *Anchoring procedures in reliability of ratings of perceived exertion during resistance exercise*. Percept Mot Skills. 2004;98(3 Pt 2):1285-1295.
61. Wiklund ED, Gao S, Hulf T, Sibbritt T, Nair S, Costea DE, Villadsen SB, Bakholdt V, Bramsen JB, Sørensen JA, et al. *MicroRNA alterations and associated aberrant DNA methylation patterns across multiple sample types in oral squamous cell carcinoma*. PLoS One. 2011;6(11):e27840. doi: 10.1371/journal.pone.0027840.

62. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvald JO. *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. Nat Cell Biol. 2007; 9(6):654-659.
63. Xie Z, Chen G, Zhang X, Li D, Huang J, Yang C, Zhang P, Qin Y, Duan Y, Gong B, et al. *Salivary MicroRNAs as Promising Biomarkers for Detection of Esophageal Cancer*. PLoS One. 2013;8(4):e57502. doi: 10.1371/journal.pone.0057502.
64. Greene NP, Martin SE, Crouse SF. *Acute exercise and training alter blood lipid and lipoprotein profiles differently in overweight and obese men and women*. Obesity (Silver Spring). 2012;20(8):1618-1627. doi: 10.1038/oby.2012.65. Epub 2012 Mar 16.
65. Park DH, Ransone JW. *Effects of submaximal exercise on high-density lipoprotein-cholesterol subfractions*. Int J Sports Med. 2003;24(4):245-51.
66. Pronk NP. *Short term effects of exercise on plasma lipids and lipoproteins in humans*. Sports Med. 1993 Dec;16(6):431-448.
67. Ferguson MA, Alderson NL, Trost SG, Davis PG, Mosher PE, Durstine JL. *Plasma lipid and lipoprotein responses during exercise*. Scand J Clin Lab Invest. 2003;63(1):73-79.
68. Mougios V (2006). *Exercise Biochemistry*. Champaign: Human Kinetics. p. 207-209.
69. Morillas M, López-Viñas E, Valencia A, Serra D, Gómez-Puertas P, Hegardt FG, Asins G. *Structural model of carnitine palmitoyltransferase I based on the carnitine acetyltransferase crystal*. Biochem J. 2004;379(Pt 3):777-784.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1 - 10 Borg Rating of Perceived Exertion Scale

0	Rest
1	Really Easy
2	Easy
3	Moderate
4	Sort of Hard
5	Hard
6	
7	Really Hard
8	
9	Really, Really, Hard
10	Maximal: Just like my hardest race



ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ

Έντυπο συγκατάθεσης εξεταζόμενου για συμμετοχή σε ερευνητική μελέτη

Τίτλος

«Η επίδραση έντονης αερόβιας άσκησης στην έκφραση μικροRNA του ανθρώπινου σάλιου, τα οποία σχετίζονται με το μεταβολισμό του λίπους»

Ενημέρωση σχετικά με την ερευνητική εργασία

Τα μικρο-ριβονουκλεϊκά οξέα (miRNA) είναι μικρά μόρια RNA που ρυθμίζουν την έκφραση διαφόρων γονιδίων του ανθρώπου, συμπεριλαμβανομένων και ορισμένων γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό του λίπους. Η απόκριση των μορίων αυτών στην άσκηση έχει μελετηθεί ελάχιστα από τους επιστήμονες και αποτελεί ένα καινούριο κι εξαιρετικά ενδιαφέρον ερευνητικό πεδίο.

Καλείσθε να λάβετε μέρος σε μια πρωτότυπη έρευνα, η οποία θα εξετάσει την επίδραση έντονης αερόβιας άσκησης (sprinting) στην έκφραση συγκεκριμένων miRNA που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του λίπους. Η μέτρηση των μορίων αυτών θα γίνει σε δείγματα σάλιου. Η μελέτη θα πραγματοποιηθεί σύμφωνα με τον «Κώδικα Δεοντολογίας Ερευνών» του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Σκοπός του εντύπου αυτού είναι να σας ενημερώσει για την ακριβή διαδικασία στην οποία θα λάβετε μέρος και για τα οφέλη από τη συμμετοχή σας.

Μέθοδος

Η δειγματοληψία θα πραγματοποιηθεί δύο φορές και θα ολοκληρωθεί σε μία ημέρα. Αρχικά, θα δώσετε μια μικρή ποσότητα σάλιου (1 ml) σε ειδικούς σωλήνες, πριν από τη διεξαγωγή του προγράμματος άσκησης. Στη συνέχεια θα ασκηθείτε και, αμέσως μετά το τέλος του προγράμματος άσκησης, θα δώσετε άλλη μια μικρή ποσότητα σάλιου όπως πριν.

Σε όλα τα δείγματα σάλιου, πριν και μετά την άσκηση, θα γίνει μέτρηση των προαναφερθέντων μορίων miRNA στο εργαστήριο.

Προστασία προσωπικών δεδομένων

Τα αποτελέσματα όλων των μετρήσεων αποτελούν προσωπικά σας δεδομένα. Τα δεδομένα αυτά δεν θα γίνουν γνωστά παρά μόνο στα μέλη της ερευνητικής ομάδας που θα τα μετρήσουν. Η δημοσίευση των αποτελεσμάτων της μελέτης δεν θα περιλαμβάνει τα ονόματά σας. Όλα τα έντυπα της μελέτης θα φυλαχθούν σε ασφαλές μέρος, θα κλειδωθούν και δεν θα αναγνωστούν από άτομα που δεν ανήκουν στην ερευνητική ομάδα. Ηλεκτρονικά αρχεία που θα περιλαμβάνουν τα ονόματά σας θα φυλαχθούν επίσης με ασφάλεια. Με τη συμπλήρωση δύο χρόνων από τη λήξη της μελέτης, τα ονόματά σας θα αφαιρεθούν από τα έντυπα και από τα ηλεκτρονικά αρχεία, τα οποία πλέον θα περιέχουν τα δεδομένα σας με κωδικοποιημένα μόνο ονόματα.

Προσδοκώμενα οφέλη

Λαμβάνοντας μέρος στην έρευνα,

- συμβάλλετε στην απόκτηση επιστημονικών γνώσεων σε ένα θέμα (την απόκριση των miRNA που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του λίπους στην έντονη αερόβια άσκηση) και
- σας δίνεται η δυνατότητα να γνωρίσετε μία διαδικασία επιστημονικής έρευνας.

Πιθανοί κίνδυνοι

Η συγκεκριμένη μελέτη δεν εμπεριέχει κινδύνους για την υγεία, δεδομένου ότι δεν θα χρησιμοποιηθούν επεμβατικές μέθοδοι κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας.

Παρακαλούμε διαβάστε με προσοχή τα παραπάνω και δηλώστε συμμετοχή, αν πιστεύετε ότι μπορείτε να ανταποκριθείτε στις απαιτήσεις της έρευνας. Στηρίζόμαστε στην υπευθυνότητά σας για την επιτυχή ολοκλήρωσή της. Ωστόσο, έχετε το δικαίωμα να αποσυρθείτε σε οποιαδήποτε φάση της μελέτης για οποιοδήποτε λόγο και χωρίς να χρειάζεται να δώσετε εξηγήσεις. Είμαστε στη διάθεσή σας για διευκρινίσεις.

Θεσσαλονίκη,/...../2012

Ονοματεπώνυμο συμμετέχοντα/-ουσας:

.....

Υπογραφή:

Ο υπεύθυνος της έρευνας

Βασίλης Μούγιος

Καθηγητής ΤΕΦΑΑ ΑΠΘ