

Κλινική Έρευνα

Τα Μεταγραφικά Επίπεδα Πρώιμων Καρδιακών Γονιδίων σε Μονοπύρνηνα Κύτταρα Περιφερικού Αίματος Αντικατοπτρίζουν τη Βαρύτητα σε Σταθερή Στεφανιαία Νόσο

ΙΩΑΝΝΑ Ε. ΚΟΝΤΑΡΑΚΗ^{1,2}, ΓΕΩΡΓΙΟΣ Ε. ΚΟΧΙΑΔΑΚΗΣ¹, ΜΑΡΙΑ Ε. ΜΑΡΚΕΤΟΥ¹,
ΓΡΗΓΟΡΙΟΣ ΧΛΟΥΒΕΡΑΚΗΣ³, ΝΙΚΟΛΑΟΣ Ε. ΗΓΟΥΜΕΝΙΔΗΣ¹, ΗΛΙΑΣ Γ. ΣΑΛΟΥΣΤΡΟΣ¹,
ΠΑΝΟΣ Ε. ΒΑΡΔΑΣ¹

¹Καρδιολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου, Ηράκλειο, Κρήτη, Ελλάδα ²Εργαστήριο Μοριακής Καρδιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, Κρήτη, Ελλάδα ³Μονάδα Βιοστατιστικής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, Κρήτη, Ελλάδα

Λέξεις ευρετηρίου:
Myocardin, GATA4, Nkx2.5, στεφανιαία νόσος.

Ημερ. παραλαβής
εργασίας:
25 Μαΐου 2012
Ημερ. αποδοχής:
21 Ματίου 2013

Διεύθυνση
Επικοινωνίας:
Ιωάννα Κονταράκη

Καρδιολογική Κλινική,
Πανεπιστημιακό
Νοσοκομείο
Ηρακλείου,
Ταχυδρομική Θυρίδα
1352, 71110
Ηράκλειο, Κρήτη,
Ελλάδα
e-mail: kontarak@med.uoc.gr

Εισαγωγή: Τα πρώιμα καρδιακά γονίδια myocardin, GATA4 and Nkx2.5, παίζουν ρόλο τόσο κατά την εμβρυϊκή καρδιαγγειακή ανάπτυξη όσο και στις καρδιαγγειακές νόσους στους ενήλικες. Εκτιμήσαμε τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων myocardin, GATA4 and Nkx2.5 σε μονοπύρνηνα κύτταρα περιφερικού αίματος σε ασθενείς με σταθερή στεφανιαία νόσο και εξετάσαμε τη σχέση τους με τη βαρύτητα της νόσου όπως αυτή προσδιορίζεται με βάση των αριθμό των εμπλεκόμενων στενωμένων αγγείων.

Μέθοδοι: 98 ασθενείς με σταθερή στεφανιαία νόσο (ηλικίας 66±9 έτη) οι οποίοι υπέστησαν στεφανιαία αγγειογραφία συμμετείχαν στη μελέτη. 66 υγιείς εθελοντές (ηλικίας 58±13 έτη) συμμετείχαν επίσης στη μελέτη για σύγκριση. Τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων προσδιορίστηκαν με αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής και ποσοτικές αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο.

Αποτελέσματα: Οι ασθενείς με στεφανιαία νόσο 3 αγγείων εμφάνισαν αυξημένα μεταγραφικά επίπεδα για το myocardin (διαφορά διαμέσων 2.7, p=0.001, 95% CI: 1-5.8), το GATA4 (μέση διαφορά 0.3, p=0.015, 95% CI: 0.1-1.9) και το Nkx2.5 (διαφορά διαμέσων 16.1, p<0.001, 95% CI: 4.5-23) σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές. Οι ασθενείς με στεφανιαία νόσο 3 αγγείων εμφάνισαν επίσης αυξημένα μεταγραφικά επίπεδα για το myocardin (διαφορά διαμέσων 2.3, p=0.001, 95% CI: 0.49-5.5) και το Nkx2.5 (διαφορά διαμέσων 11.8, p<0.001, 95% CI: 1.5-21.5) σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν νόσο 1 αγγείου.

Συμπεράσματα: Τα μεταγραφικά επίπεδα πρώιμων καρδιακών γονιδίων σε μονοπύρνηνα κύτταρα περιφερικού αίματος είναι υψηλότερα σε ασθενείς με σοβαρή σταθερή στεφανιαία νόσο απ' ότι σε υγιείς εθελοντές και δείχνουν μεταβολές στο πρότυπο έκφρασής τους ανάλογα με τη βαρύτητα της νόσου. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν για πρώτη φορά ότι μεταβολές στην έκφραση πρώιμων καρδιακών γονιδίων στο περιφερικό αίμα ασθενών με σταθερή στεφανιαία νόσο, πιθανόν αντικατοπτρίζουν το επίπεδο βαρύτητας της νόσου.

Η στεφανιαία νόσος είναι ένα από τα κύρια προβλήματα υγείας παγκοσμίως καθώς και μια βασική αιτία θανάτου στις Δυτικές χώρες.¹ Παρά τη σημαντική πρόοδο στην πρόληψη και στη θεραπεία, η καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνησιμότητα παραμένει

υψηλή στη στεφανιαία νόσο. Η ανάγκη για την ανάπτυξη νέων στρατηγικών για αξιόπιστη μη επεμβατική διάγνωση της στεφανιαίας νόσου και η αποκάλυψη νέων θεραπευτικών στόχων γίνεται όλο και πιο επείγουσα, όσο τόσο η γήρανση του πληθυσμού όσο και οι καρδιαγγειακοί

παράγοντες κινδύνου συνεχίζουν να αυξάνονται.² Η αποκάλυψη νέων βιοδεικτών και ερευνητικών τεχνικών που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε πιο αξιόπιστη διάγνωση και παρακολούθηση της πορείας της νόσου και της ανταπόκρισης στη θεραπεία γίνεται όλο και πιο σημαντική στα πλαίσια πιο στενά εστιασμένων παρεμβατικών θεραπειών.³ Ωστόσο, η αθηροσκλήρωση είναι μια σύνθετη πολυπαραγοντική διαδικασία που περιλαμβάνει πολλαπλά μονοπάτια, και έτσι η βαθύτερη γνώση των παθοφυσιολογικών μονοπατιών που οδηγούν σε αθηροσκληρωτική αγγειακή νόσο θα βελτιώσει την κατανόησή μας και θα βοηθήσει στην ανάπτυξη περισσότερο εξατομικευμένης διαστρωμάτωσης κινδύνου και πιο στοχευμένης θεραπείας.

Στο κυτταρικό επίπεδο, αγγειακά προγονικά κύτταρα (ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά προγονικά κύτταρα) συμμετέχουν στη σύνθετη παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης, στην αγγειακή αναγέννηση, στην αρτηριακή αναδιαμόρφωση και στην αγγειογένεση.⁴⁻⁷ Έχει δειχτεί ότι τα επίπεδα των κυκλοφορούντων προγονικών κυττάρων προβλέπουν την εμφάνιση καρδιαγγειακών συμβάντων, καθώς και το θάνατο που οφείλεται σε καρδιαγγειακές αιτίες.⁸ Επιπλέον, αλλαγές στη λειτουργία των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στις καρδιαγγειακές νόσους.^{9,10} Ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων αποτελούν θεμελιώδη στοιχεία στη διαδικασία της στένωσης και παίζουν σημαντικό ρόλο στην αρτηριακή αναδιαμόρφωση.¹¹ Το myocardin είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που λειτουργεί σαν κύριος ρυθμιστής της διαφοροποίησης των λείων μυϊκών κυττάρων κατά την ανάπτυξη, και είναι ο κύριος στόχος μονοπατιών σηματοδότησης που οδηγούν σε αναδιαμόρφωση των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων στις καρδιαγγειακές νόσους.¹²⁻¹⁶ Το GATA4 έχει δειχτεί να παίζει ρόλο στην αντιστάθμιση της έντασης και στη βιωσιμότητα των καρδιομυοκυττάρων,¹⁷ καθώς επίσης και στην αγγειογένεση, βοηθώντας στη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ υπερτροφίας και πυκνότητας τριχοειδών αγγείων.¹⁸ Κυκλοφορούντα very small embryonic-like (VSELs) κύτταρα που εκφράζουν τους πρώιμους καρδιογενετικούς δείκτες GATA4 και Nkx2.5 έχουν επίσης εμπλακεί στις καρδιαγγειακές νόσους.¹⁹ Το myocardin, το GATA4 και το Nkx2.5 είναι επίσης μέρος του «εμβρυϊκού γονιδιακού προγράμματος» το οποίο επανενεργοποιείται στην ενήλικη στρεσαρισμένη καρδιά σαν προσαρμοστική απάντηση.²⁰⁻²²

Στην παρούσα μελέτη, εκτιμήσαμε τα επίπεδα

γονιδιακής έκφρασης επιλεγμένων αναπτυξιακών μεταγραφικών παραγόντων σε μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με σταθερή στεφανιαία νόσο σε σχέση με τη βαρύτητα της νόσου. Επιλέξαμε τα πρώιμα μυοκαρδιακά γονίδια – δείκτες myocardin, GATA4 and Nkx2.5, τα οποία κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες που συμμετέχουν στην εμβρυϊκή ανάπτυξη της καρδιάς και φαίνεται να παίζουν ρόλο σε διάφορες καρδιαγγειακές καταστάσεις στους ενήλικες.^{20,23}

Μέθοδοι

Μελετούμενος πληθυσμός

Ο πληθυσμός που μελετήσαμε αποτελούνταν από 98 ασθενείς με σταθερή στεφανιαία νόσο (μέσης ηλικίας 66±9 έτη, 80 άνδρες και 18 γυναίκες) οι οποίοι υποβλήθηκαν σε στεφανιαία αγγειογραφία στην κλινική μας, λόγω υποψίας στεφανιαίας νόσου. Εξήντα έξι υγιείς εθελοντές (μέσης ηλικίας 58±13 έτη, 44 άνδρες και 22 γυναίκες) συμπεριελήφθησαν επίσης στη μελέτη.

Όλοι οι συμμετέχοντες υποβλήθηκαν σε πλήρη κλινική εξέταση και εργαστηριακές εξετάσεις. Οι επιλέξιμοι ασθενείς ήταν άνδρες και γυναίκες πάνω από 18 ετών, με ενδείξεις στεφανιαίας καρδιακής νόσου που τεκμηριώνονταν από προηγούμενο μυοκαρδιακό έμφραγμα (> από 5 μήνες πριν), διαδερμική ή χειρουργική στεφανιαία επανααγγείωση (> από 6 μήνες πριν), αγγειογραφική ένδειξη στένωσης ≥70% τουλάχιστον ενός κύριου στεφανιαίου αγγείου (δεξιάς, αριστερής πρόσθιας κατιούσας, ή αριστερής περιοσώμενης στεφανιαίας αρτηρίας). Τα συμπτώματα παρέμεναν σταθερά για τουλάχιστον 3 μήνες πριν την εισαγωγή τους στη μελέτη. Η βαρύτητα της στένωσης στεφανιαίας αρτηρίας εκτιμήθηκε από περισσότερους από 2 έμπειρους επεμβατικούς καρδιολόγους, που δεν ήξεραν τα δεδομένα των πρώιμων καρδιακών γονιδιακών μεταγράφων, χρησιμοποιώντας ποσοτική στεφανιαία αγγειογραφία. Όλοι οι ασθενείς είχαν τυπικό πόνο στο στήθος με κατάσπαση του διαστήματος ST ≥1 mm κατά τη διάρκεια εντεινόμενης άσκησης, ή αναστρέψιμη ισχαιμία σε σπινθηρογραφική μελέτη μυοκαρδιακής αιμάτωσης κατά την άσκηση με θάλλιο 201. Οι ασθενείς με ένδειξη οξέος στεφανιαίου συνδρόμου ή καρδιογενικού σοκ < 3 μήνες καθώς και οι ασθενείς με κλάσμα εξώθησης αριστερής κοιλίας <55% ή ηλικίας >75 ετών, αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Άλλα αίτια αποκλεισμού ήταν: σημαντική βαλβιδοπάθεια, μυοκαρ-

δίτιδα και ιστορικό ή ενδείξεις νεοπλασματικής ή αιματολογικής νόσου, καρδιακής ή νεφρικής ανεπάρκειας, και κάθε χρόνιας φλεγμονώδους ή λοιμώδους νόσου κατά τη διάρκεια των προηγούμενων 6 μηνών. Κάθε καρδιαγγειακή θεραπευτική αγωγή είχε παραμείνει αμετάβλητη για τρεις μήνες πριν τη μελέτη σε όλους τους ασθενείς.

Η μελέτη εγκρίθηκε από την επιτροπή ηθικής δεοντολογίας του νοσοκομείου μας, ακολουθήθηκαν όλες οι κατευθυντήριες οδηγίες και όλοι οι συμμετέχοντες έδωσαν έγγραφη συγκατάθεση μετά από πληροφόρηση για τη συμμετοχή τους στη μελέτη.

Απομόνωση RNA και ποσοτικές αντιδράσεις RT-PCR

Τα δείγματα αίματος συλλέχτηκαν σε EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) σωλήνες. Μονοπύρνα κύτταρα απομονώθηκαν με φυγοκέντρηση κλίσης σε Histopaque-ficoll (SIGMA), το RNA απομονώθηκε με το αντιδραστήριο TRI-Reagent (Ambion) και 1 μg RNA χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής με oligo-(dT) χρησιμοποιώντας το Reverse Transcription System (Promega) σε αντιδράσεις των 20 μl. Οι μετρήσεις των επιπέδων mRNA έγιναν με αντιδράσεις πολυμεράσης (PCR) σε πραγματικό χρόνο, χρησιμοποιώντας το STRATAGENE Mx3000P σύστημα ανίχνευσης. Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σε 1μl αντιγράφων DNA (cDNA) χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad). Όλα τα δείγματα έτρεξαν σε τριπλές PCR αντιδράσεις. Η μέθοδος της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε για απόλυτη ποσοτικοποίηση των προϊόντων πολυμερισμού και η ειδικότητά τους προσδιορίστηκε πραγματοποιώντας ανάλυση καμπύλης τήξης. Οι πρότυπες καμπύλες έκφρασης για κάθε γονίδιο δημιουργήθηκαν με διαδοχικές αραιώσεις γνωστών ποσοτήτων πρότυπων cDNA. Το γονίδιο GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase) χρησιμοποιήθηκε σαν ενδογενές γονίδιο αναφοράς, και η σχετική ποσοτικοποίηση έγινε διορθώνοντας το σήμα κάθε γονιδίου βάση του σήματος του GAPDH. Οι αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR για το myocardin, GATA4, Nkx2.5 και το GAPDH, καθώς και ο σχεδιασμός πειραματικής στρατηγικής για να επιτευχθεί ειδικότητα ήταν όπως έχει περιγραφεί προηγούμενως.²⁴

Στατιστική ανάλυση

Για τα βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών, οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται σαν μέσες τιμές

± τυπική απόκλιση (SD), και οι ασυνεχείς μεταβλητές σαν μετρήσεις και αναλογίες. Οι αρχικές κατανομές των δεδομένων γονιδιακής έκφρασης ήταν έντονα θετικά κυρτωμένες (ασύμμετρες κατανομές). Ακόμα και μετά από τετραγωνική ή κυβική ριζική μετατροπή, οι κατανομές εξακολουθούσαν να είναι ασύμμετρες και ετεροσκεδαστικές (άνισες διαφορές), και συνεπώς δεν επέτρεπαν παραμετρικές αναλύσεις. Ός εκτούτου, πραγματοποιήθηκαν μη παραμετρικές αναλύσεις. Χρησιμοποιήσαμε μετατροπές σε κυβική ρίζα για καλύτερη απεικόνιση. Η δοκιμασία Jonckheere-Terpstra χρησιμοποιήθηκε για τη διερεύνηση διαφορών μεταξύ ομάδων. Για συγκρίσεις δύο ομάδων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή Mann-Whitney ρυθμισμένη κατά Bonferroni. Τα δεδομένα παρουσιάζονται σαν διαφορές διαμέσων και διαστήματα εμπιστοσύνης 95% (Hodges-Lehman CI) για τις διαφορές διαμέσων. Όλες οι δοκιμές έγιναν με αμφίπλευρο έλεγχο και το επίπεδο σημαντικότητας $P < 0.05$ θεωρήθηκε να υποδεικνύει στατιστική σημαντικότητα. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με ένα εμπορικά διαθέσιμο στατιστικό πακέτο (IBM SPSS Statistics 19.0; Chicago, IL, USA).

Αποτελέσματα

Τα επίπεδα έκφρασης των πρώιμων μυοκαρδιακών γονιδίων – δεικτών myocardin, GATA4 και Nkx2.5 μελετήθηκαν σε μονοπύρνα κύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με σταθερή στεφανιαία νόσο ($n=98$) και υγιών εθελοντών ($n=66$) για σύγκριση. Στους ασθενείς με στεφανιαία νόσο, τα μεταγραφικά επίπεδα αυτών των γονιδίων εξετάστηκαν σε σχέση με τη βαρύτητα της νόσου. Τα βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών μας παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Όταν εξετάσαμε τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων σε υγιείς εθελοντές και στεφανιαίους ασθενείς σε σχέση με τη βαρύτητα της νόσου όπως αυτή εκτιμάται με βάση τον αριθμό των στενωμένων αγγείων, η δοκιμασία Jonckheere-Terpstra έδειξε σημαντικά αυξημένα επίπεδα myocardin ($p=0.001$), GATA4 ($p=0.005$) και Nkx2.5 ($p<0.001$) καθώς ο αριθμός των εμπλεκόμενων στενωμένων αγγείων αυξάνει. (Πίνακας 2). Δοκιμασίες ανά ζεύγη Mann-Whitney ρυθμισμένες κατά Bonferroni έδειξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ στεφανιαίων ασθενών με νόσο 3 αγγείων και υγιών εθελοντών.

Πιο συγκεκριμένα, βρήκαμε ότι οι ασθενείς με νόσο 3 αγγείων ($n=22$) είχαν αυξημένα μεταγραφικά επίπεδα για το myocardin (διαφορά διαμέσων 2.7, $p=0.001$, 95% CI: 1-5.8), το GATA4 (διαφο-

Πίνακας 1. Βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

	Ασθενείς (n=98)		Ασθενείς (n=98)	
Ηλικία (έτη)	66±9		Κρεατινίνη (mg/dl)	1,1±0,7
Άνδρες / Γυναίκες	80 / 18		Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	220,9±46,1
Καπνίζοντες	44 (43,1%)		Γλυκόζη (mg/dl)	130,5±55,9
Διαβήτης	32 (31,4%)		Αιματοκρίτης	40,3±4,2
Υπέρταση	55 (53,9%)		Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	13,2±1,4
Υπερλιπιδαιμία	62 (60,8%)		Κλάσμα εξώθησης αριστερής κοιλίας (%)	54,5±11
Οικογενειακό ιστορικό	31 (30,4%)		Φαρμακευτική αγωγή	
Ιατρικό ιστορικό STEMI	21 (20,6%)		Ασπιρίνη	98 (100%)
Ιατρικό ιστορικό nonSTEMI	14 (13,7%)		Κλοπιδογρέλη	98 (100%)
Επηρεασμένη στεφανιαία αρτηρία			Στατίνες	81 (79,4%)
Αριστερή πρόσθια κατιούσα	67 (65,7%)		β- αναστολείς	55 (53,9%)
Δεξιά στεφανιαία αρτηρία	49 (50%)		Αναστολείς του Μετατρεπτικού Ενζύμου της	
			Αγγειοτενσίνης (ΑΜΕΑ)	42 (41,2%)
Περισπώμενη	36 (35,3%)		Αναστολείς του υποδοχέα της αγγειοτενσίνης	26 (25,5%)
Νόσος 1- αγγείου	44 (43,1%)		Αιμολιπίνη	13 (12,7%)
Νόσος 2- αγγείων	32 (31,4%)		Νιτρούδη	14 (13,7%)
Νόσος 3- αγγείων	22 (21,6%)		Διουρητικά	15 (14,7%)

STEMI: Έμφραγμα με ανάσπαση του ST διαστήματος. Τα δεδομένα παρουσιάζονται σαν μέσες τιμές ± SD.

Πίνακας 2. Επίπεδα γονιδιακής έκφρασης σε υγιείς εθελοντές και ασθενείς ανάλογα με τη σοβαρότητα της νόσου, όπως αυτή εκτιμάται από τον αριθμό των εμπλεκόμενων στενωμένων αγγείων. Τα επίπεδα παρουσιάζονται σαν κυβικές ρίζες των αυθαίρετων μονάδων. Παρουσιάζονται τιμές σημαντικότητας p που προκύπτουν από τη δοκιμασία Jonckheere-Terpstra για διαφορές μεταξύ των ομάδων. Επίσης παρουσιάζονται διάμεσες τιμές και ενδοτεταρτημοριακά εύρη.

	Αρ. στενωμένων αγγείων	N	Percentiles (εκατοστιαία σημεία)			Jonckheere-Terpstra τιμές p	
			25th	50th	75th	0-3	1-3
myocardin	0	66	2,98	4,08	5,18	0,001	0,022
	1	44	3,13	4,48	6,77		
	2	32	3,21	4,46	8,73		
	3	22	4,09	6,79	17,47		
GATA4	0	66	0,44	0,61	0,84	0,005	0,068
	1	44	0,51	0,66	1,10		
	2	32	0,41	0,71	1,50		
	3	22	0,57	0,91	5,72		
Nkx2.5	0	66	2,67	5,60	12,67	<0,001	0,010
	1	44	4,13	9,87	19,32		
	2	32	5,97	13,22	30,15		
	3	22	7,21	21,0	55,42		

ρά διαμέσων 0.3, $p=0.015$, 95% CI: 0.1-1.9) και το Nkx2.5 (διαφορά διαμέσων 16.1, $p<0.001$, 95% CI: 4.5-23) σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές ($n=66$). (Εικόνα 1A, B, Γ). Σημαντικά αυξημένα επίπεδα για το Nkx2.5 (διαφορά διαμέσων 7.6, $p=0.001$, 95% CI: 2.6-11.4) παρατηρήθηκαν επίσης στους ασθενείς με νόσο 2 αγγείων σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές (Εικόνα 1Γ).

Όταν εξετάσαμε τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων στους στεφανιαίους ασθενείς σε σχέση με

τη βαρύτητα της νόσου όπως αυτή εκτιμάται με βάση τον αριθμό των στενωμένων αγγείων, η δοκιμασία Jonckheere-Terpstra έδειξε σημαντικά αυξημένα μεταγραφικά επίπεδα για το myocardin ($p=0.022$) και το Nkx2.5 ($p=0.010$) καθώς ο αριθμός των εμπλεκόμενων στενωμένων αγγείων αυξάνει (Πίνακας 2). Τα επίπεδα του GATA4 εμφανίζονται επίσης αυξημένα αλλά οριακά αποτυγχάνουν να φτάσουν στατιστική σημαντικότητα ($p=0.068$). Δοκιμασίες αναζεύγη Mann-Whitney ρυθμισμένες κατά Bonferroni

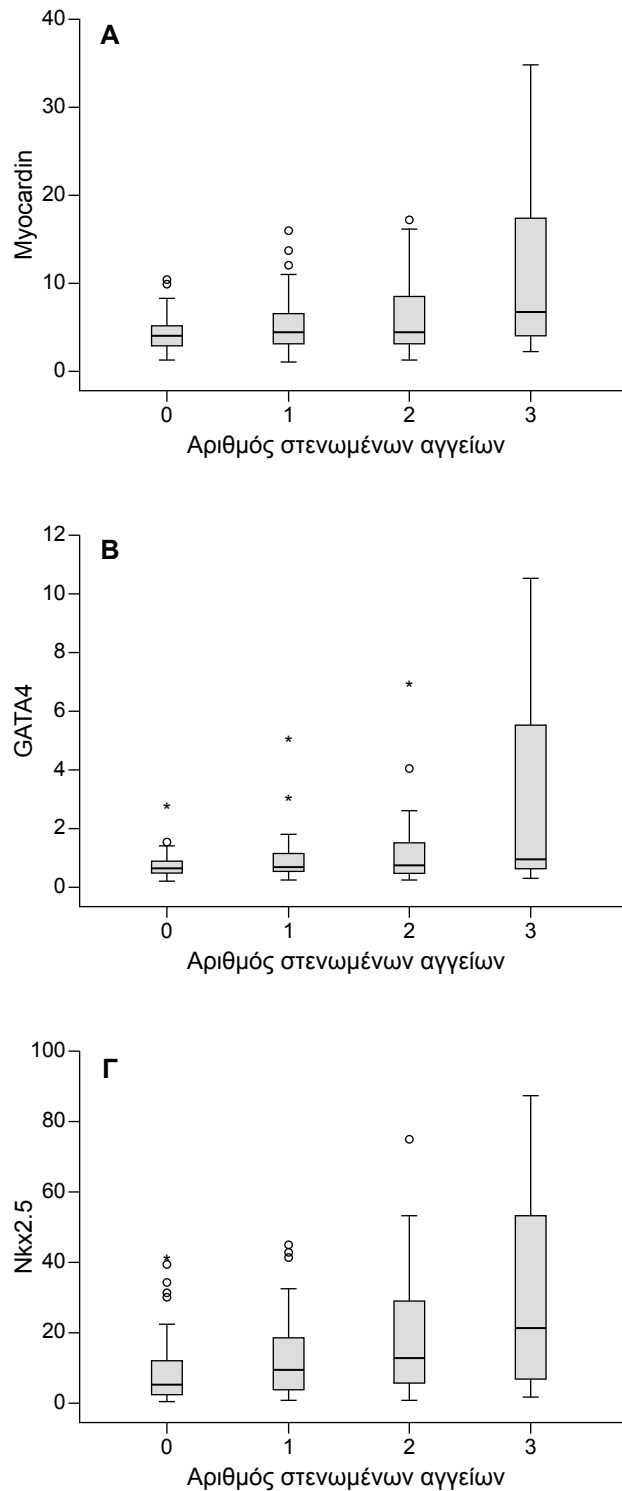
δεν ανίχνευσαν διαφορές μεταξύ νόσου 1 αγγείου και 2 αγγείων για καμία παράμετρο, ενώ ανίχνευσαν σημαντικές διαφορές των επιπέδων μεταξύ νόσου 1-αγγείου και νόσου 3-αγγείων τόσο για το *myocardin* όσο και για το *Nkx2.5*, με το *myocardin* να διαφέρει επίσης μεταξύ νόσου 2- και 3-αγγείων.

Πιο συγκεκριμμένα, βρήκαμε ότι οι ασθενείς με νόσο 3-αγγείων (n=22) είχαν αυξημένα μεταγραφικά επίπεδα για το *myocardin* (διαφορά διαμέσων 2.3, p=0.001, 95% CI: 0.49-5.5) και το *Nkx2.5* (διαφορά διαμέσων 11.8, p<0.001, 95% CI: 1.5-21.5) σε σύγκριση με τους ασθενείς με νόσο 1-αγγείου. (n=44) (Εικόνα 1Α, Γ). Το *myocardin* έδειξε επίσης να τείνει να διαφέρει (διαφορά διαμέσων 2.3, p=0.087, 95% CI: 0-5.5) μεταξύ των ομάδων ασθενών με νόσο 2- και 3-αγγείων (Εικόνα 1Α).

Συζήτηση

Η μελέτη μας παρέχει δεδομένα που υποδεικνύουν για πρώτη φορά μια σχέση μεταξύ επιπέδων έκφρασης πρώιμων καρδιακών γονιδίων σε μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με σταθερή στεφανιαία νόσο και της κατάστασης της νόσου. Αυτή είναι η πρώτη μελέτη που δείχνει, έστω έμμεσα, μια σχέση μεταξύ κυκλοφορούντων, παραγόμενων από το μυελό των οστών, καρδιαγγειακών προγονικών κυττάρων που εκφράζουν πρώιμα καρδιακά γονίδια και βαρύτητας της νόσου στη σταθερή στεφανιαία νόσο. Δείξαμε ότι πρώιμα καρδιακά γονίδια εμφανίζουν τροποποιημένα πρότυπα έκφρασης σε μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος στεφανιαίων ασθενών και ότι υπάρχει μια συσχέτιση μεταξύ του τροποποιημένου προτύπου έκφρασης και της βαρύτητας της νόσου.

Ειδικότερα, τα επίπεδα έκφρασης των πρώιμων καρδιακών γονιδίων *myocardin*, *GATA4* και *Nkx2.5*, εξετάστηκαν σε μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος σταθερών στεφανιαίων ασθενών και υγιών εθελοντών. Όταν εξετάσαμε τα μεταγραφικά επίπεδα πρώιμων καρδιακών γονιδίων ανάλογα με τη βαρύτητα της νόσου όπως αυτή προσδιορίζεται από τον αριθμό των εμπλεκόμενων στενωμένων αγγείων, βρήκαμε υψηλότερα μεταγραφικά επίπεδα σε ασθενείς με βαρύτερη νόσο. Ασθενείς με πολυ-αγγειακή νόσο έδειξαν υψηλότερα μεταγραφικά επίπεδα για το *myocardin*, το *GATA4* και το *Nkx2.5* απ' ότι οι υγιείς εθελοντές. Ασθενείς με πολυ-αγγειακή νόσο έδειξαν επίσης υψηλότερα μεταγραφικά επίπεδα για το *myocardin* και το *Nkx2.5* απ' ότι οι ασθενείς με νόσο ενός αγγείου. Τα δεδομένα μας υποδεικνύ-



Εικόνα 1. Διαγράμματα πλαισίου απολήξεων για τα επίπεδα του *myocardin* (Α), του *GATA4* (Β) και του *Nkx2.5* (Γ) σε υγιείς εθελοντές και στεφανιαίους ασθενείς ανάλογα με τη βαρύτητα της νόσου, όπως αυτή εκτιμάται με βάση τον αριθμό των εμπλεκόμενων στενωμένων αγγείων. Τα επίπεδα παρουσιάζονται σαν κυβικές ρίζες των αυθαίρετων μονάδων.

ουν ότι πρώιμα καρδιακά γονίδια πιθανόν να εμπλέκονται στις καρδιαγγειακές αλλαγές που συμβαίνουν στους ασθενείς με στεφανιαία νόσο.

Πρώιμα καρδιακά γονίδια στο περιφερικό αίμα εκφράζονται σε κυκλοφορούντα στελεχιαία-προγονικά κύτταρα που εδρεύουν στο μυελό των οστών, και συνεπώς αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης τέτοιων γονιδίων πιθανόν αντικατοπτρίζουν αλλαγές σε αυτούς τους κυτταρικούς πληθυσμούς. Ο προκαθορισμός για την καρδιακή σειρά γίνεται με την έκφραση πρώιμων καρδιακών μεταγραφικών παραγόντων, όπως το Nkx2.5 και το GATA4, οι οποίοι παίζουν ρόλο τόσο στην εμβρυϊκή καρδιαγγειακή ανάπτυξη όσο και στην καρδιομυογένεση στελεχιαίων κυττάρων.²⁵⁻²⁸ Τα πρώιμα καρδιακά γονίδια - δείκτες που εξετάσαμε σ' αυτή τη μελέτη, έχουν δείχτει προηγουμένως να εκφράζονται σε μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος^{24,29} και επιπλέον έχουν δείχτει να εκφράζονται σε ανθρώπινα μεσεγγυματικά στελεχιαία (MSCs) κύτταρα μυελού των οστών,³⁰ τα οποία έχουν την ικανότητα καρδιομυογένεσης και αγγειογένεσης και μπορούν να ενσωματωθούν σε μια χρόνια τραυματισμένη καρδιά.^{31,32} Κινητοποίηση στο περιφερικό αίμα προερχόμενων από το μυελό των οστών very small embryonic-like (VSELs) κυττάρων που εκφράζουν πρώιμα καρδιακά γονίδια (Nkx2.5 και GATA4) και πολυδύναμων στελεχιαίων κυττάρων μετά από μυοκαρδιακό έμφραγμα έχει επίσης αναφερθεί.^{33,34} Η κινητοποίηση και στρατολόγηση κυκλοφορούντων προγονικών κυττάρων, είναι μια φυσιολογική απόκριση στην ισχαιμία και ασκεί προστατευτικό ρόλο ενάντια σε δυσμενείς παθολογικές εξελίξεις. Τα τελευταία χρόνια, έχει γίνει μεγάλη προσπάθεια να βρεθούν τρόποι που θα εντείνουν αυτό το φυσιολογικό φαινόμενο.³⁵

Οι Güven et al³⁶ έδειξαν ότι ο αριθμός των κυκλοφορούντων προγονικών ενδοθηλιακών και αγγειογενετικών κυττάρων σχετίζεται άμεσα με την έκταση της στεφανιαίας αθηροσκλήρωσης σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο. Εμείς βρήκαμε αυξημένα μεταγραφικά επίπεδα πρώιμων καρδιακών γονιδίων σε ασθενείς με πιο σοβαρή στεφανιαία νόσο. Εξετάζοντας την έκφραση πρώιμων καρδιογενετικών δεικτών, στοχεύουμε σε υποπληθυσμούς κυττάρων τα οποία άλλες μελέτες που χρησιμοποιούν επιφανειακούς δείκτες ανιχνεύουν σαν κυκλοφορούντα προγονικά κύτταρα. Στοχεύουμε σε καρδιαγγειακά προγονικά κύτταρα προερχόμενα από το μυελό των οστών τα οποία εκφράζουν αυτούς τους πρώιμους καρδιογενετικούς γονιδιακούς δείκτες.^{28,37} Το myocardin εκφράζεται επίσης σε αγγειακά λεία μυϊκά

προγονικά κύτταρα τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην κατασκευή και επιδιόρθωση των αιμοφόρων αγγείων.³⁸ Απ' όσο ξέρουμε, υπάρχει έλλειψη δεδομένων όσον αφορά κυκλοφορούντα προερχόμενα από το μυελό των οστών καρδιαγγειακά προγονικά κύτταρα σε ασθενείς με σταθερή στεφανιαία νόσο, αν και υπάρχουν αμφιλεγόμενα δεδομένα που αφορούν κινητοποίηση ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων στη στεφανιαία νόσο.³⁹ Παρ' όλα αυτά, είναι τώρα καλά εδραιωμένο ότι υψηλά επίπεδα κυκλοφορούντων προγονικών κυττάρων μειώνουν την πιθανότητα βαριάς στεφανιαίας νόσου και αυξάνουν την ελεύθερη συμβάντων επιβίωση μετά από καρδιαγγειακά γεγονότα.⁵ Απ' αυτή την άποψη, τα αυξημένα μεταγραφικά επίπεδα πρώιμων καρδιακών γονιδίων που βρήκαμε, τα οποία πιθανόν αντικατοπτρίζουν μεταβολές στα κυκλοφορούντα προγονικά καρδιαγγειακά κύτταρα σε πιο βαριά νόσο, θα μπορούσαν να απεικονίζουν μια φυσιολογική απόκριση στην ισχαιμία στα πιο βαριά της στάδια.

Τα πρώιμα καρδιακά γονίδια που εξετάσαμε αποτελούν επίσης μέρος του «εμβρυϊκού γονιδιακού προγράμματος», το οποίο επανενεργοποιείται στους ενήλικες υπό καταστάσεις στρες σαν προσαρμοστικός μηχανισμός επιβίωσης.^{20,21} Πρόσφατα δείξαμε ότι αυξημένα μεταγραφικά επίπεδα του myocardin και του GATA4 σε μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με ιδιοπαθή διατακτική καρδιομυοπάθεια και καρδιακή ανεπάρκεια πιθανόν να αντικατοπτρίζουν καλύτερη λειτουργικότητα αριστερής κοιλίας σε αυτούς τους ασθενείς, υποστηρίζοντας την υπόθεση ότι η επιστροφή στο εμβρυϊκό γονιδιακό πρότυπο ίσως είναι μια προσαρμοστική εξέλιξη συνδεδεμένη με την επιβίωση.²⁹ Επίσης υποδείξαμε μια πιθανή επανενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιακού προτύπου στην υπερτασική καρδιακή νόσο, η οποία πιθανόν αντικατοπτρίζει τη σοβαρότητα της νόσου σαν μέρος αυτής της προσαρμοστικής εξέλιξης επιβίωσης.⁴⁰ Η στεφανιαία νόσος είναι μια κατάσταση στρες για την καρδιά, και μια πιθανή επανενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιακού προτύπου στη στεφανιαία νόσο, θα μπορούσε να είναι μέρος αυτής της προσαρμοστικής απόκρισης επιβίωσης.

Συμπεράσματα

Πρώιμα καρδιακά γονίδια εμφανίζουν μεταβολές στο πρότυπο έκφρασής τους στο περιφερικό αίμα ασθενών με σταθερή στεφανιαία νόσο ανάλογα με την υφιστάμενη κατάσταση της νόσου.

Τα μεταγραφικά επίπεδα των πρώιμων καρδια-

κών γονιδίων myocardin, GATA4 και Nkx2.5 είναι αυξημένα σε μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με σοβαρή σταθερή στεφανιαία νόσο σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές. Μεταβολές στα μεταγραφικά επίπεδα πρώιμων καρδιακών γονιδίων, που πιθανόν αντικατοπτρίζουν μεταβολές σε κυκλοφορούντα καρδιαγγειακά προγονικά κύτταρα που εκφράζουν αυτά τα γονίδια, συνδεδεμένες με τη σοβαρότητα της νόσου, παρατηρήθηκαν επίσης.

Τα δεδομένα της παρούσας μελέτης, υποδεικνύουν ότι μεταβολές στα μεταγραφικά επίπεδα πρώιμων καρδιακών γονιδίων στο περιφερικό αίμα ασθενών με σταθερή στεφανιαία νόσο, που πιθανόν αντικατοπτρίζουν μεταβολές κυκλοφορούντων καρδιαγγειακών προγονικών κυττάρων σαν μέρος ενός προσαρμοστικού μηχανισμού επιβίωσης, ίσως αναπαριστούν το επίπεδο σοβαρότητας της νόσου. Περαιτέρω μελέτες σε μεγαλύτερους πληθυσμούς χρειάζονται για να διασαφηνίσουν αυτή την υπόθεση και να ενδυναμώσουν ή να βελτιώσουν την κλινική και φυσιολογική σημασία των ενδεικτικών μας παρατηρήσεων. Η φύση των κυκλοφορούντων κυττάρων που εκφράζουν πρώιμα καρδιακά γονίδια, ο ρόλος τους στην εξέλιξη ή σταθεροποίηση της αγγειακής νόσου και η επίδρασή τους στην κλινική έκβαση, παραμένουν θέματα για περαιτέρω μελέτη.

Βιβλιογραφία

- Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJL. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *The Lancet* 2006; 367: 1747-1757.
- Maragiannis D, Lazaros G, Vavuranakis M, et al. Chronic Stable Angina: Percutaneous Coronary Intervention or Medication? *Hellenic J Cardiol* 2011; 52: 246-252.
- Kullo IJ, Cooper LT. Early identification of cardiovascular risk using genomics and proteomics. *Nat Rev Cardiol* 2010; 7: 309-317.
- Hristov M, Weber C. Progenitor cell trafficking in the vascular wall. *J Thromb Haemost*. 2009; 7: 31-34.
- Moreno PR, Sanz J, Fuster V. Promoting Mechanisms of Vascular Health: Circulating Progenitor Cells, Angiogenesis, and Reverse Cholesterol Transport. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53: 2315-2323.
- Becher MU, Nickenig G, Werner N. Regeneration of the vascular compartment. *Herz* 2010; 35: 342-351.
- Albiero M, Menegazzo L, Fadini GP. Circulating Smooth Muscle Progenitors and Atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2010; 20: 133-140.
- Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al. Circulating Endothelial Progenitor Cells and Cardiovascular Outcomes. *N Engl J Med*. 2005; 353: 999-1007.
- Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease. *Physiol. Rev.* 2004; 84: 767-801.
- Orlandi A, Bennett M. Progenitor cell-derived smooth muscle cells in vascular disease. *Biochem Pharmacol.* 2010; 79: 1706-1713.
- Daniel J-M, Sedding DG. Circulating smooth muscle progenitor cells in arterial remodeling. *J Mol Cell Cardiol.* 2011; 50: 273-279.
- Du KL, Ip HS, Li J, et al. Myocardin Is a Critical Serum Response Factor Cofactor in the Transcriptional Program Regulating Smooth Muscle Cell Differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 2003; 23: 2425-2437.
- Wang Z, Wang D-Z, Hockemeyer D, et al. Myocardin and ternary complex factors compete for SRF to control smooth muscle gene expression. *Nature* 2004; 428: 185-189.
- Wang D-Z, Olson EN. Control of smooth muscle development by the myocardin family of transcriptional coactivators. *Curr Opin Genet Dev.* 2004; 14: 558-566.
- Liu N, Olson EN. Coactivator control of cardiovascular growth and remodeling. *Curr Opin Cell Biol.* 2006; 18: 715-722.
- Long X, Bell RD, Gerthoffer WT, Zlokovic BV, Miano JM. Myocardin Is Sufficient for a Smooth Muscle-Like Contractile Phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28: 1505-1510.
- Oka T, Maillet M, Watt AJ, et al. Cardiac-Specific Deletion of Gata4 Reveals Its Requirement for Hypertrophy, Compensation, and Myocyte Viability. *Circ Res* 2006; 98: 837-845.
- Heineke J, Auger-Messier M, Xu J, et al. Cardiomyocyte GATA4 functions as a stress-responsive regulator of angiogenesis in the murine heart. *J Clin Invest.* 2007; 117: 3198-3210.
- Wojakowski W, Kucia M, Liu R, et al. Circulating Very Small Embryonic-Like Stem Cells in Cardiovascular Disease. *J Cardiovasc Transl Res.* 2011; 4: 138-144.
- Oka T, Xu J, Molkentin JD. Re-employment of developmental transcription factors in adult heart disease. *Semin Cell Dev Biol.* 2007; 18: 117-131.
- Rajabi M, Kassiotis C, Razeghi P, Taegtmeyer H. Return to the fetal gene program protects the stressed heart: a strong hypothesis. *Heart Fail Rev.* 2007; 12: 331-343.
- Taegtmeyer H, Sen S, Vela D. Return to the fetal gene program. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1188: 191-198.
- Parmacek MS. Myocardin-Related Transcription Factors: Critical Coactivators Regulating Cardiovascular Development and Adaptation. *Circ Res* 2007; 100: 633-644.
- Kontaraki JE, Parthenakis FI, Patrianakos AP, Karalis IK, Vardas PE. Altered expression of early cardiac marker genes in circulating cells of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovasc Pathol.* 2007; 16: 329-335.
- Bruneau BG. Transcriptional Regulation of Vertebrate Cardiac Morphogenesis. *Circ Res* 2002; 90: 509-519.
- Srivastava D. Making or Breaking the Heart: From Lineage Determination to Morphogenesis. *Cell* 2006; 126: 1037-1048.
- Mercola M, Ruiz-Lozano P, Schneider MD. Cardiac muscle regeneration: lessons from development. *Genes Dev.* 2011; 25: 299-309.
- Sturzu AC, Wu SM. Developmental and Regenerative Biology of Multipotent Cardiovascular Progenitor Cells. *Circ Res.* 2011; 108: 353-364.
- Kontaraki JE, Parthenakis FI, Nyktari EG, Patrianakos AP, Vardas PE. Myocardial gene expression alterations in peripheral blood mononuclear cells of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail.* 2010; 12: 541-548.

30. van Tuyn J, Knaan-Shanzer S, van de Watering MJM, et al. Activation of cardiac and smooth muscle-specific genes in primary human cells after forced expression of human myocardin. *Cardiovasc Res.* 2005; 67: 245-255.
31. Quevedo HC, Hatzistergos KE, Oskouei BN, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106: 14022-14027.
32. Williams AR, Hare JM. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res.* 2011; 109: 923-940.
33. Wojakowski W, Tendera M, Kucia M, et al. Mobilization of Bone Marrow-Derived Oct-4+ SSEA-4+ Very Small Embryonic-Like Stem Cells in Patients With Acute Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2009; 53: 1-9.
34. Wojakowski W, Tendera M. New Concepts in Cardiac Stem Cell Therapy. *Hellenic J Cardiol* 2010; 51: 10-14.
35. Pesce M, Burba I, Gambini E, et al. Endothelial and cardiac progenitors: Boosting, conditioning and (re)programming for cardiovascular repair. *Pharmacol Ther.* 2011; 129: 50-61.
36. Güven H, Shepherd RM, Bach RG, Capoccia BJ, Link DC. The Number of Endothelial Progenitor Cell Colonies in the Blood Is Increased in Patients With Angiographically Significant Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 48: 1579-1587.
37. Bollini S, Smart N, Riley PR. Resident cardiac progenitor cells: At the heart of regeneration. *J Mol Cell Cardiol.* 2011; 50: 296-303.
38. Majesky MW, Dong XR, Regan JN, Hoglund VJ. Vascular Smooth Muscle Progenitor Cells. *Circ Res.* 2011; 108: 365-377.
39. Leone AM, Valgimigli M, Giannico MB, et al. From bone marrow to the arterial wall: the ongoing tale of endothelial progenitor cells. *Eur Heart J.* 2009; 30: 890-899.
40. Kontaraki JE, Marketou ME, Zacharis EA, Parthenakis FI, Vardas PE. Early cardiac gene transcript levels in peripheral blood mononuclear cells in patients with untreated essential hypertension. *J Hypertens.* 2011; 29: 791-797.