

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KSENIJA RAVNIKAR

**MAGISTRSKA NALOGA**  
ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2018



Univerza v Ljubljani  
Fakulteta *za farmacijo*

KSENIJA RAVNIKAR

Izražanje izbranih genov v levkocitih pri bolnikih z restenozo femoropoplitalne arterije po  
perkutani transluminalni angioplastiki

Expression of candidate genes from leukocytes in patients with femoropopliteal artery  
restenosis after percutaneous transluminal angioplasty

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za klinično biokemijo, pod mentorstvom doc. dr. Mojce Božič Mijovski, univ. dipl. biol., spec. med. biok. Eksperimentalno delo sem opravljala v laboratorijih katedre za Klinično biokemijo, kjer me je vodila in mi bila v pomoč Manja Cedilnik, spec. med. biok. Vzorce krvi so odvzeli na Kliničnem oddelku za žilne bolezni (KOŽB) Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, v laboratoriju za hemostazo in aterotrombozo, kjer sem jih tudi prevzela v nadaljnjo analizo.

## ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Mojci Božič Mijovski, univ. dipl. biol., spec. med. biok. za vso pomoč, strokovne nasvete in vodenje pri izdelavi magistrske naloge. Posebna zahvala gre tudi Manji Cedilnik, spec. med. biok., ki mi je pomagala pri težavah, nastalih tekom dela v laboratoriju. Zahvaljujem se tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo za pomoč in prijaznost. Posebna zahvala gre tudi moji družini in prijateljem za podporo in spodbudne besede ves čas študija.

## IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo pod mentorstvom doc. dr. Mojce Božič Mijovski, univ. dipl. biol., spec. med. biok., izdelala samostojno. Vsebina magistrske naloge je del raziskovalnega projekta ARRS (šifra: P3-0308), katerega nosilec je prof. dr. Mirza Šabovič, dr. med. (UKC Ljubljana).

Ljubljana, september 2018

Ksenija Ravnikar

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Matjaž Jeras

Mentorica: doc. dr. Mojca Božič Mijovski

Član komisije: doc. dr. Nace Zidar

## Kazalo vsebine

1 UVOD.....	1
1.1 Periferna arterijska bolezen .....	1
1.1.1 Perkutana transluminalna angioplastika.....	3
1.2 Patofiziologija aterosklerotične PAB.....	5
1.3 Vloga genetike v razvoju PAB in uspešnosti PTA .....	7
1.3.1 PECAM-1 .....	9
1.3.2 IL-6.....	10
1.3.3 IL-1 $\beta$ .....	11
1.3.4 NR4A2 .....	13
1.3.5 miR-568.....	15
2 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE.....	17
3 MATERIALI IN METODE .....	18
3.1 Bolniki .....	18
3.2 Splošna opozorila za delo v genetskem laboratoriju .....	18
3.3 Izolacija celokupne RNA.....	19
3.4 Ocena količine in kvalitete izolirane RNA .....	19
3.5 Reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo .....	22
3.5.1 Reverzna transkripcija.....	24
3.5.2 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času .....	25
3.5.3 Določanje polimorfizmov .....	27
3.6 Statistične metode .....	27
4 REZULTATI .....	29
4.1 Uspešnost PTA .....	29
4.2 Vpliv PTA na izražanje genov .....	29
4.3 Povezava med izražanjem genov pred in po PTA ter restenozo.....	30

4.4 Povezava izražanja genov s tveganjem za pojav restenoze .....	31
4.5 Povezava polimorfizmov z izražanjem gena .....	32
5 RAZPRAVA.....	33
6 SKLEP .....	39
7 LITERATURA .....	40

## **Kazalo slik**

Slika 1: Potek PTA. A: Vstavljanje balonskega katetra na mesto zožitve arterije. B: Napolnitev balonskega katetra in s tem potiskanje aterosklerotične lehe ob steno arterije. C: Uspešno razširjeni del žile po PTA. Povzeto po (13). .....	4
Slika 2: Začetna faza razvoja ateroskleroze; prirejeno po (19). .....	6
Slika 3: Nadaljnji razvoj ateroskleroze – vnetje in proliferacija gladkomišičnih celic; prirejeno po (19). .....	7
Slika 4: Mesto nahajanja gena PECAM1 na kromosomu 17; povzeto po (34). .....	9
Slika 5: Mesto nahajanja gena IL6 na kromosomu 7; povzeto po (43). .....	11
Slika 6: Mesto nahajanja gena IL1B na kromosomu 2; povzeto po (50). .....	12
Slika 7: Mesto nahajanja gena NR4A2 na kromosomu 2; povzeto po (56). .....	15
Slika 8: Mesto gena miR568 na kromosomu 3; povzeto po (61). .....	16
Slika 9: Čip za kapilarno elektroforezo Agilent Bioanalyzer; prirejeno po (70). .....	21
Slika 10: Primer elektroferogramov visoko kvalitetne RNA (RIN=9,2) in degradirane RNA (RIN=5,8); prirejeno po (72). .....	22
Slika 11: Princip delovanja hidrolizirajoče sonde TaqMan; prirejeno po (75). .....	23

## **Kazalo preglednic**

Preglednica I: Fontaineova klasifikacija ishemije uda (2). .....	1
Preglednica II: Trije pogosti haplotipi na osnovi SNP-ov v genih za IL-1 (52). .....	13
Preglednica III: Štirje haplotipi na podlagi treh SNP-ov s frekvencami več kot 1% (53). .	15
Preglednica IV: Sestava reagenčne mešanice Master mix z encimom RT in Master mix brez encima RT. ....	24
Preglednica V: Reverzna transkripcija – uporabljeni program. ....	25

Preglednica VI: Priprava standardov (količine za 6 genov + 2 gena rezerve). .....	25
Preglednica VII: Priprava reakcijske zmesi za NR4A2 s SYBR Select oligonukleotidnimi začetniki (200 nM).....	26
Preglednica VIII: Priprava reakcijske zmesi s sondami za GAPDH, IL1B, IL6, PECAM1 in miR568. ....	26
Preglednica IX: Program SYBER Select MM. ....	26
Preglednica X: Program TaqMan Universal MM II.....	27
Preglednica XI: Rezultati ultrazvočnih preiskav. Prikazano je število restenoz ali prehodnih arterij po vsakem pregledu in delež restenoze.....	29
Preglednica XII: Izražanje genov pred in po PTA. Prikazane so mediane (1.–3. kvartil), število vzorcev pred in po PTA ter p vrednosti za Wilcoxonov test predznačnih rangov. .	29
Preglednica XIII: Izražanje genov pri bolnikih z restenozo 1 mesec po PTA in bolnikih s prehodnimi arterijami. Prikazane so mediane (1.–3. kvartil) in p vrednosti za Wilcoxonov test predznačnih rangov.....	30
Preglednica XIV: Izražanje genov pri bolnikih z restenozo 6 mesecev po PTA in bolnikih s prehodnimi arterijami. Prikazane so mediane (1.–3. kvartil) in p vrednosti za Wilcoxonov test predznačnih rangov.....	30
Preglednica XV: Izražanje genov pri bolnikih z restenozo 12 mesecev po PTA in bolnikih s prehodnimi arterijami. Prikazane so mediane (1.–3. kvartil) in p vrednosti za Wilcoxonov test predznačnih rangov.....	30
Preglednica XVI: Povezanost izražanja genov z razvojem restenoze 1 mesec po PTA. Prikazane so mediane (1.–3. kvartil) in p vrednosti Mann-U-Whitneyevega testa.....	31
Preglednica XVII: Povezanost izražanja genov z razvojem restenoze 6 mesecev po PTA. Prikazane so mediane (1.–3. kvartil) in p vrednosti Mann-U-Whitneyevega testa.....	31
Preglednica XVIII: Povezanost izražanja genov z razvojem restenoze 12 mesecev po PTA. Prikazane so mediane (1.–3. kvartil) in p vrednosti Mann-U-Whitneyevega testa.....	31
Preglednica XIX: Ocena tveganja za razvoj restenoze šest mesecev po posegu. Prikazani so: razmejitevna vrednost, razmerje obetov in 95-odstotni interval zaupanja. ....	32
Preglednica XX: Povezanost polimorfizmov z izražanjem relevantnega gena. Prikazane so: genske spremembe, genotipi s pripadajočim številom bolnikov in p vrednosti Kruskal-Wallisovega testa.....	32

## POVZETEK

Najpogostejši vzrok za nastanek periferne arterijske bolezni (PAB) predstavlja napredovana ateroskleroza, ki povzroči spremembe na žilni steni in s tem zožitev žilnega lumna, kar onemogoča normalen pretok krvi skozi ude. Ena izmed oblik zdravljenja zožitve žil je perkutana transluminalna angioplastika (PTA), katere glavni zaplet po posegu še vedno predstavlja restenoza (ponovna zožitev), ki se v roku enega leta pojavi pri kar 40–60% bolnikov. Natančen mehanizem pojava restenoze še ni povsem pojasnjen, številne raziskave pa so že večkrat potrdile močno povezavo z vnetjem, ki se razvije na mestu operirane arterije. V naši raziskavi smo v ta namen preučevali izražanje genov nekaterih mediatorjev vnetja, s čemer smo želeli ugotoviti, ali obstajajo kakršne koli povezave med izražanjem teh genov in restenozo, ter ocenjevali njihovo prognostično vrednost. Izražanje genov *PECAMI*, *IL1B*, *IL6*, *NR4A2* in *miR568* smo s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR) določali v vzorcih komplementarne DNA (cDNA), prepisane iz celokupne RNA vzorca krvi, odvzetega 24 ur pred in neposredno po posegu. Po posegu smo bolnike spremljali še eno leto, učinkovitost postopka pa smo preverjali z ultrazvočno preiskavo 1, 6 in 12 mesecev po posegu. Pri pregledu rezultatov smo z Wilcoxonovim testom predznačnih rangov ugotovili, da je pri bolnikih, ki so v roku enega leta po posegu ohranili prehodne arterije, prišlo do spremenjenega izražanja genov po posegu, in sicer sta se gena *PECAMI* in *IL1B* izražala povečano, medtem ko je bilo izražanje gena *IL6* zmanjšano. V skupini z restenozo smo dokazali samo spremenjeno izražanje gena *IL1B*, in sicer pri tistih bolnikih, ki so v roku šestih ali dvanajstih mesecev po posegu razvili restenozo. Hipotezo, ali je izražanje genov kakor koli povezano z razvojem restenoze 1, 6 ali 12 mesecev po PTA, smo preverjali z neparametričnim Mann-U-Whitneyevim testom. Pri tem smo ugotovili, da so imeli bolniki, z izražanjem gena *PECAMI* pred posegom nad 1,0066, skoraj 3x večje tveganje za razvoj restenoze 6 mesecev po posegu v primerjavi s tistimi, pri katerih je bilo izražanje *PECAMI* pod to mejno vrednostjo. Pri ostalih genih nismo dobili statistično pomembnih rezultatov. V zadnjem delu smo preučevali še polimorfizme rs12803, rs146608 in rs13428968 v genu *NR4A2*, rs668 in rs12953 v genu *PECAMI* ter rs10499563 v genu *IL6*, pri čemer pa z neparametrično analizo variance (ANOVA) nismo uspeli dokazati nobenega vpliva polimorfizma na izražanje posameznega relevantnega gena.

**Ključne besede:** PTA, restenoza, vnetje, izražanje genov, qPCR.

## ABSTRACT

One of the main causes of peripheral arterial disease (PAD) is advanced atherosclerosis, which causes changes in the vascular wall and, consequently, the narrowing of the vascular lumen, preventing normal blood flow through the limbs. One option for vascular narrowing treatment is percutaneous transluminal angioplasty (PTA), but its main complication after procedure is still restenosis occurring in 40–60% of patients during the one year follow-up. The exact mechanism for restenosis has not yet been fully explained, but numerous studies have confirmed a strong connection with the inflammation that develops at the site of the operated artery. In our study we measured the expression of the genes of certain inflammatory mediators, and studied possible associations between the expression of those genes and restenosis and we also evaluated the prognostic value of gene expression. The expression of the genes *PECAMI*, *IL1B*, *IL6*, *NR4A2*, and *miR568* was determined in complementary DNA (cDNA) samples, transcribed from the total RNA sample of blood taken 24 hours before and right after the procedure with real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR). After the procedure patients were followed for one year and the effectiveness of the procedure was checked by the ultrasound, 1, 6 and 12 months after the procedure. With the Wilcoxon's pre-signed rank test we have shown that patients who have not developed restenosis within the one year follow-up had a change in gene expression before and after the procedure, namely, the expression of genes *PECAMI* and *IL1B* increased, while the expression of the *IL6* gene was reduced. In the restenosis group, only *IL1B* gene expression was found to be changed after the procedure, and this was in patients, who developed restenosis within 6 or 12 months after the procedure. The hypothesis that the expression of genes was in any way associated with the development of restenosis 1, 6 or 12 months after PTA, was checked with a nonparametric Mann-U-Whitney test. We found that patients, who had pre-procedure *PECAMI* expression above 1.0066, had a nearly 3x greater risk of developing restenosis six months after the procedure than those with *PECAMI* below this threshold. For other genes we did not find statistically significant results. In the latter part, polymorphisms rs12803, rs146608 and rs13428968 were studied in the *NR4A2*, rs668 and rs12953 in the *PECAMI* gene and rs10499563 in the *IL6* gene, but with nonparametric ANOVA we were unable to show any influences on the expression of the relevant gene.

**Key words:** PTA, restenosis, inflammation, gene expression, qPCR.



## Seznam okrajšav

Kratica	Pomen
ABC A1	adenozin trifosfat vezavni kasetni transporter A1 (angl. ATP-binding cassette transporter A1)
ACTB	aktin beta (angl. actin beta)
B2M	beta-2 mikroglobulin (angl. beta-2 microglobuline)
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kislina
CRP	C-reaktivni protein
Ct	pražni cikel (angl. treshold cycle)
dNTP	deoksinukleozid-trifosfati
FGF	fibroblastni rastni dejavnik (angl. fibroblast growth factor)
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (angl. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
GUSB	glukoronidaza beta (angl. glucuronidase beta)
ICAM	znotrajcelična adhezijska molekula (angl. intracellular adhesion molecule)
IL	interlevkin (angl. interleukin)
IP	z interferonom gama induciran protein (angl. interferon gamma inducible protein)
IL-1RN	antagonist IL-1 receptorjev (angl. interleukin 1 receptor antagonist)
LDL	lipoproteini z nizko gostoto (angl. low density lipoproteins)
MCP	kemoatraktantni protein za monocite (angl. monocyte chemoattractant protein)
MCSF	stimulirajoči dejavnik makrofagne kolonije (angl. macrophage colony-stimulating factor)
MIF	inhibitorni dejavnik migracije makrofagov (angl. macrophage migration inhibitory factor)
miRNA	mikro RNA (angl. micro RNA)
MMP	matriksna metaloproteinaza (angl. matrix metalloproteinases)
mRNA	informacijska RNA (angl. messenger RNA)
NFkB	jedrni dejavnik kapa B (angl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NR4A2	jedrnemu receptorju podoben protein 1, starejše Nurr1 (angl. nuclear receptor

	related 1 protein)
oLDL	oksidirani LDL
PAB	periferna arterijska bolezen
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
PECAM	trombocitna endotelijska adhezijska molekula (angl. platelet and endothelial cell adhesion molecule)
PTA	perkutana transluminalna angioplastika
PTCA	perkutana transluminalna koronarna angioplastika
qPCR	kvantitativni PCR
RIN	parameter integritete RNA (angl. RNA integrity number)
RISC	z RNA induciran utiševalni kompleks (angl. RNA – induced silencing complex)
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
RPLP0	stranska stebelna podenota P0 ribosomske beljakovine (angl. ribosomal protein lateral stalk subunit P0)
RT encim	encim reverzna transkriptaza
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo z reverzno transkripcijo
SAA	serumski amiloid A (angl. serum amyloid A)
SNP	polimorfizem posameznega nukleotida (angl. single-nucleotide polymorphism)
TBP	vezavna beljakovina TATA-škatlice (angl. TATA-box binding protein)
Th 1 / 2	celice pomagalke tipa 1 in 2 (angl. type 1 / 2 T helper cells)
TNF	tumor nekrotizirajoči dejavnik (angl. tumor necrosis factor)
UNG	uracil-N-glikozilaza
VCAM	žilnocelična adhezijska molekula (angl. vascular cell adhesion molecule)
VEGF	žilni endotelijski rastni dejavnik (angl. vascular endothelial growth factor)
VNTR	polimorfizem števila tandemskih ponovitev (angl. variable number tandem repeat)

# 1 UVOD

## 1.1 Periferna arterijska bolezen

Periferna arterijska bolezen (PAB) je kronična bolezen, pri kateri je zaradi sprememb na arterijah motena prekrvavitev udov. Najpogosteje so prizadeti spodnji udi, v večini primerov pa je vzrok za nastanek napredovana ateroskleroza, ki povzroči zožitev (stenoza) oziroma zaporo (okluzijo) večjih arterij v udu in tako onemogoča normalno raztezanje arterijske stene. Bolezen se razvija počasi in jo v osnovi glede na izraženost kliničnih znakov najpogosteje klasificiramo po Fontaineu (Preglednica I), ki razvršča bolnike v 4 glavne kategorije. Te se naprej delijo na podskupine, ki podrobneje opredeljujejo stopnjo ishemije med telesnim naporom (klavdikacijsko razdaljo) in stadij kronične kritične ishemije (obseg gangrene) (1, 2).

Preglednica I: Fontaineova klasifikacija ishemije uda (2).

### Kategorije po Fontaineu

<b>stadij I</b>	asimptomatski bolniki
<b>stadij II</b>	ishemična bolečina med hojo
II a	dolga klavdikacijska razdalja (>200m)
II b	kratka klavdikacijska razdalja (<200m)
<b>stadij III</b>	ishemična bolečina med mirovanjem
<b>stadij IV</b>	razjede in gangrena
IV a	omejena gangrena
IV b	obsežna gangrena

Potek napredovanja bolezní ni zvezen, se pa navadno začne asimptomatsko. To pomeni, da bolnik v tem stadiju bolezní še ne občuti značilnega nelagodja v nogah pri gibanju, čeprav je že prišlo do bolezenskih sprememb (zožitev) na arterijah (asimptomatska predklinična oblika) (3). Te spremembe lahko zaznamo z merjenjem gleženjskega indeksa, ki velja za temeljno objektivno in neinvazivno preiskavo (1). Gre za razmerje med sistoličnim tlakom na vsakem gležnju z višjim sistoličnim tlakom na nadlakti, ki je pri zdravi osebi približno med 0,91 in 1,40. Čim hujša je obtočna motnja, tem nižji je gleženjski indeks, zato lahko s tovrstno preiskavo ocenjujemo tudi stopnjo napredovanja bolezní (2, 5).

Kasneje se pri približno tretjini bolnikov pojavijo intermitentne klavdikacije. Gre za bolečine oziroma mišično nelagodje, kot so krči in mišična utrujenost, ki jih bolnik občuti pri gibanju (5). Sprva se bolečina pojavlja pri hitri hoji ali hoji v hrib, z napredovanjem

bolezni pa tudi pri hoji po ravnem (4). Pojavlja se predvsem v predelu meč, lahko pa tudi v predelu stegen oziroma zadnjice in navadno preneha po desetminutnem počitku. Vzrok za to so lezije v arteriji, ki preprečujejo povečan dotok krvi v ude, kar povzroči neravnovesje med dostavo kisika in metabolično potrebo mišic po kisiku. V mirovanju je pretok krvi še normalen, zato bolniki po počitku ne občutijo več bolečin (5).

V napredovalih fazah bolezni je bolečina prisotna tudi v mirovanju in nezdravljena vodi v čedalje hujšo ishemijo uda; pojavljati pa se lahko začnejo tudi razjede in gangrene na prstih, stopalu ali goleni (2).

Poznanih je več dejavnikov tveganja za razvoj PAB, ki se močno prepletajo z dejavniki tveganja za druge srčno-žilne bolezni (5). Eden najbolj raziskanih dejavnikov tveganja je kajenje; pojavnost PAB naj bi bila pri kadilcih več kot 3x višja kot pri nekadilcih (5), kajenje pa naj bi dokazano pospešilo tudi razvoj bolezni, poslabšalo rezultate zdravljenja in povečalo tveganje za amputacijo uda (4). Pomembni dejavniki tveganja predstavljajo tudi sladkorna bolezen, povišan krvni tlak, povišana raven krvnih lipidov, povišana raven vnetnih mediatorjev, hiperviskozno in hiperkoagulabilno stanje krvi (povišan hematokrit in raven fibrinogena), hiperhomocisteinemija, kronična ledvična insuficienca, starost (s starostjo razširjenost narašča), spol (po nekaterih raziskavah je razširjenost nekoliko višja pri moških kot pri ženskah), etničnost ter prisotnost drugih srčno-žilnih bolezni (5).

Ne glede na to, v katerem stadiju bolezni je bolnik, PAB bistveno vpliva na kvaliteto življenja, saj omejuje njegove gibalne sposobnosti. Hkrati je PAB znan in potrjen neodvisni dejavnik tveganja za pojav koronarnega in cerebrovaskularnega dogodka (s smrtnim izidom ali brez), predstavlja pa tudi primarni vzrok za amputacijo spodnjega uda v razvitih državah (6, 7). Bolniki s PAB umirajo več kot 3x pogosteje v primerjavi z ljudmi enake starosti brez PAB, in sicer zaradi različnih vzrokov, najpogosteje zaradi koronarno srčnih bolezni in srčno-žilnih bolezni (8). Na podlagi večih epidemioloških raziskav je bila razširjenost asimptomatske PAB med odraslimi v razvitem svetu, ki so starejši od 55 oziroma 60 let, ocenjena na 15–20% (1, 2). Pri visoko rizičnih skupinah, kot je starost nad 50 let s prisotnima dejavnikoma tveganja kajenje ali sladkorna bolezen in starost nad 70 let, pa je bila ocenjena že na več kot 25% (9).

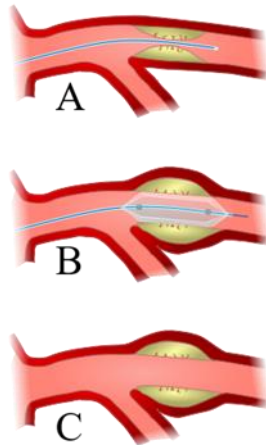
Zdravljenje PAB je sestavljeno iz systemskega preprečevanja srčno-žilnih ishemičnih dogodkov in lokalnega zdravljenja klavdikacijskih simptomov ali kronične kritične

ishemije uda. Ker imajo bolniki s PAB veliko tveganje za ishemične zaplete tudi v koronarnem in karotidnem povirju, jih obravnavamo po skupnih smernicah za preventivo srčno-žilnih bolezni. V obdobju z intermitentnimi klavdikacijami se izvajajo intervalni mišični treningi, ki naj bi na podlagi večih randomiziranih raziskav povečali klavdikacijsko razdaljo za 50–200%; izjemoma pa lahko uvedemo tudi farmakološko zdravljenje z zdravili s hemoreološkimi učinki (pentoksifilin). Bolnikom, pri katerih se težave ne izboljšajo ali jih močno ovirajo pri vsakdanjem življenju, se izvede revaskularizacijski poseg (1, 2, 4).

### **1.1.1 Perkutana transluminalna angioplastika**

PTA je revaskularizacijski poseg, ki v Evropi velja za metodo izbora zdravljenja kritične ishemiije in omejujoče kratke klavdikacijske razdalje pri zožitvi/zapori femoropoplitealne arterije (10). PTA je minimalno invaziven poseg, s katerim ponovno vzpostavimo pretok krvi skozi arterijo, kjer je nastala zožitev ali zapora. Na začetku posega se v krvni obtok vbrizga kontrastno sredstvo, s pomočjo katerega pod rentgenskim nadzorom ugotavljamo položaj zožitve in prehodnost arterije. V nadaljevanju skozi arterijo na zoženo mesto vstavimo balonski kateter, katerega premer je odvisen od žilnega premera zdravega dela žile, in ga napolnimo s fiziološko raztopino, s čimer potisnemo aterosklerotično leho ob steno arterije (Slika 1). Čas napihnjenosti balončka, tlak in število ponovitev so odvisni od morfoloških značilnosti lehe. Kadar samo širjenje z balonom ni uspešno, ko narava in mesto zožitve to zahtevata ali pride do raztrganja žile oz. krvavitve, se lahko zdravnik odloči za vstavitve žilne opornice ali znotrajžilne proteze (11, 12).

Ker PTA povzroči poškodbo arterijske intime in medije, na tem mestu nastane trombogena površina. Bolniki zato predhodno prejemajo nizek odmerek acetilsalicilne kisline, ki zavira nabiranje in agregacijo trombocitov; tik pred posegom pa trombogenost zavremo še z ustreznim odmerkom heparina (11). Ko se zdravnik s pomočjo kontrastnega sredstva in rentgenskega slikanja prepriča o uspešnosti posega, odstrani balonski kateter.



Slika 1: Potek PTA. A: Vstavljanje balonskega katetra na mesto zožitve arterije. B: Napolnitev balonskega katetra in s tem potiskanje aterosklerotične lehe ob steno arterije. C: Uspešno razširjeni del žile po PTA. Povzeto po (13).

Podatki iz literature kažejo na veliko varnost samega postopka, zelo visok tehnični uspeh, nizko stopnjo zapletov (zgolj 2–3% bolnikov) in zelo nizko stopnjo umrljivosti (10). Najpogostejši zapleti so nastanek hematoma na mestu vboda, distalna embolija, trombotična zapora, razširitev žile, razpoka žilne stene in redko raztrganje arterije (12, 14). Dolgoročno uspešnost PTA omejuje restenoza/reokluzija, ki se po poročanju večih raziskav pojavi pri 40–60 % bolnikov v prvem letu po posegu, od tega se polovica pojavi v prvih treh mesecih (15).

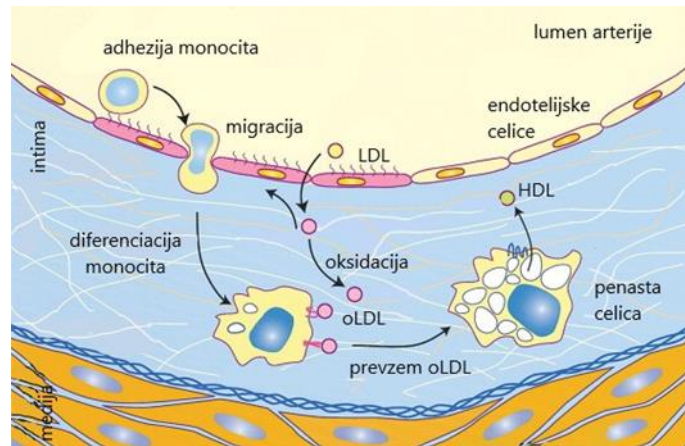
Natančen mehanizem pojava restenoze/reokluzije še ni povsem pojasnjen, vemo pa, da na trajanje uspešnosti postopka vplivajo stopnja PAB, sočasne bolezni (sladkorna bolezen, ledvična insuficienca, koronarna arterijska bolezen), prisotnost dejavnikov tveganja (kajenje), morfološke značilnosti arterijske lezije (okluzija ali stenoza, dolžina in število lezij, kalcifikacija plakov), funkcionalne lastnosti prizadete arterije (obseg žilnega vnetja) in hemodinamske značilnosti žilja, ki so ovrednotene z arterijskim pritokom/iztokom (10, 11, 15).

Marsikatero raziskavo so pokazale močno povezavo med učinkovitostjo postopka PTA in arterijskim iztokom (16), prav tako pa so bile že večkrat potrjene močne povezave med PAB in vnetjem. Ta namreč sproži žilno remodelacijo ter neointimalno hiperplazijo, katere posledica je izguba žilnega lumna. Vnetni označevalci imajo zato lahko veliko prognozično vrednost za pojav restenoze/reokluzije po PTA (17).

## 1.2 Patofiziologija aterosklerotične PAB

Ateroskleroza je kronična vnetna bolezen, kjer zaradi progresivnega kopičenja lipidov, veziva, netopnih kalcijevih soli in celičnih ostankov pride do formacije aterosklerotične lehe v intimi (tanki notranji plasti) stene arterije. Kritični dejavnik za razvoj ateroskleroze je nesposobnost endotelija za opravljanje svoje funkcije (endotelna disfunkcija). Endotelij je namreč dinamično tkivo, ki uravnava protivnetno, mitogeno in kontraktilno funkcijo žilne stene ter hemostazo žilne svetline. Začetek procesa se sproži s poškodbo endotelijskih celic, in sicer večinoma zaradi velikih strižnih sil in turbulentnega toka (posledica arterijske hipertenzije), dodatno pa endotelijsko disfunkcijo in aktivacijo endotelijskih celic spodbujajo še hiperholesterolemija, oksidativni stres (reaktivne kisikove zvrsti, ROS), produkti glikacije lipoproteinov, kemični iritanti, vazoaktivni amini, imunski kompleksi in drugo (18).

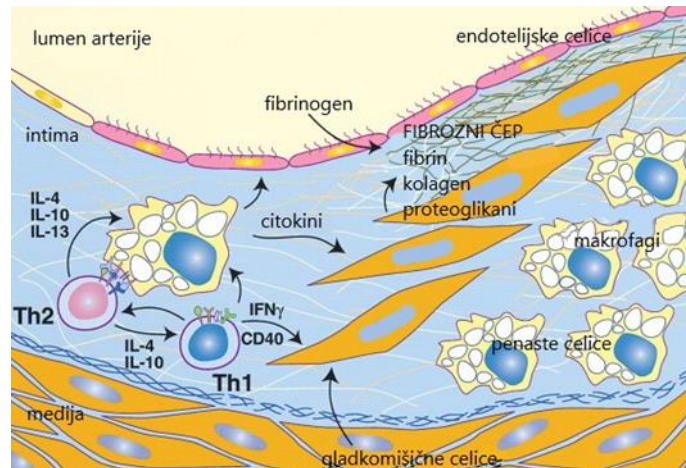
Poškodovane endotelijske celice ne zagotavljajo več učinkovite prepreke med plazmo in subendotelijskim prostorom, zato pride do povečanega vstopa lipoproteinov (zlasti lipoproteinov nizke gostote, LDL) v intimo arterijske stene. Tam se te molekule kemično spremenijo, in sicer poteče oksidacija nenasičenih višjih maščobnih kislin ali neencimska glikacija. Aktivirane endotelijske celice na svoji površini povečajo sintezo adhezijskih molekul, med katerimi so v zgodnjem obdobju še najpomembnejše žilnocelična adhezijska molekula-1 (VCAM-1), znotrajcelična adhezijska molekula-1 (ICAM-1), P-selektin in E-selektin, ki povzročijo pospešeno prilepljanje levkocitov (monocitov in limfocitov T) iz krvnega obtoka na površino endotelijskih celic in njihovo transendotelijsko migracijo. Oksidirani LDL (oLDL) preko transkripcijskega jedrnega dejavnika kapa B (NF $\kappa$ B) še dodatno povečajo izražanje celičnih adhezijskih molekul. Vstopanje levkocitov vzpodbujajo tudi kemokini, ki se sproščajo iz aktiviranih endotelijskih celic, kot so monocitni kemotaktični protein-1 (MCP-1) in interleukin-8 (IL-8) za monocite ter z interferonom gama inducirani protein-10 (IP-10) za limfocite T. V intimi se monociti pod vplivom makrofagno kolonijo stimulirajočega dejavnika (M-CSF) preobrazijo v makrofage, ki fagocitirajo oLDL, pri čemer nastanejo penaste celice (Slika 2).



Slika 2: Začetna faza razvoja ateroskleroze; prirejeno po (19).

Sčasoma nekatere penaste celice odmrejo zaradi apoptoze in nekroze, s čimer se oblikuje lipidna sredica z izvenceličnim holesterolom. Poleg kopičenja lipidov v makrofagih spremlja aterogenezo tudi kronično vnetje. Aktivirani makrofagi in intrinzične celice arterijske stene sintetizirajo velike količine posrednikov nespecifične imunosti (citokine, rastne dejavnike, proteaze, reaktivne kisikove in dušikove zvrsti), ki vzpodbujajo proliferacijo makrofagov, proliferacijo gladkih mišičnih celic in sintezo zunajceličnega matriksa. Specifično imunost vzpodbujajo modificirani lipoproteini in infekcijski dejavniki. Limfociti T po vstopu v intimo sproščajo citokine, ki naprej modulirajo vnetje. Celice pomagalk 1 (Th1) sintetizirajo provnetne citokine, kot so interferon  $\gamma$ , limfotoksin, ligand CD40, tumor nekrotizirajoči dejavnik (TNF), ki aktivirajo celice arterijske stene in destabilizirajo aterosklerotično leho ter povečajo trombogenost. Celice Th2 pa proizvajajo protivnetne citokine, kot je IL-10, ki zavirajo vnetje. Gladkomišične celice se pod vplivom citokinov in rastnih dejavnikov začnejo razmnoževati, prihaja pa tudi do njihove migracije iz medije v intimo. Tam povečano izločajo kolagen, elastin in proteoglikane (zunajcelični matriks), kar prispeva k rasti aterosklerotične spremembe na žilni steni. Hkrati gladkomišične celice v intimi arterijske stene skupaj z makrofagi fagocitirajo oksidirane lipoproteine (Slika 3). Z rastjo aterosklerotične lehe se v njej razraščajo žile, kar vzpodbujajo angiogenetski dejavniki, kot sta fibroblastni rastni dejavnik (FGF) in žilni endotelijski rastni dejavnik (VEGF). Z napredovanjem ateroskleroze se začnejo v leham kopičiti tudi kalcijeve soli s prostimi maščobnimi kislinami, zaradi česar postane arterijska stena trda in neelastična (18, 19).





Slika 3: Nadaljnji razvoj ateroskleroze – vnetje in proliferacija gladkomišičnih celic; prirejeno po (19).

### 1.3 Vloga genetike v razvoju PAB in uspešnosti PTA

PAB ima tako kot ostale aterosklerotične bolezni številne dejavnike tveganja, za katere vemo, da so genetsko pogojeni (dislipidemija, hipertenzija, sladkorna bolezen). Raziskovalci so se zato začeli usmerjati v iskanje genetskih variant, ki bi vplivale na razvoj PAB neodvisno od teh dejavnikov. Prvič je bil vpliv dednih dejavnikov na gleženjski indeks opisan v raziskavi, ki jo je izvedel Nacionalni inštitut za srce, pljuča in kri v letih 1995–1997 na 184 parih eno- in dvojajčnih dvojčkov. Rezultati so pokazali, da naj bi bila približno polovica zaznane variabilnosti v gleženjskem indeksu posledica genetskih vplivov, druga polovica pa posledica okoljskih dejavnikov (20). Rezultati so bili kasneje potrjeni tudi v drugih raziskavah na različnih populacijah (raziskavi GENOA in Framingham Offspring) (21, 22). Ker vemo, da ima vnetje temeljno vlogo pri razvoju in napredovanju ateroskleroze, so se raziskovalci naprej usmerili v preučevanje genetskih variant znotraj družin provnetnih mediatorjev (citokini, kemokini, adhezijske molekule in proteolitični encimi). Ugotovljene so bile povečane koncentracije vnetnih mediatorjev, kot so C-reaktivnega proteina (CRP), serumskega amiloida A (SAA), IL-6,  $\beta$ 2-mikroglobulina, VCAM-1, ICAM-1 in drugih (23). O pomembnosti polimorfizmov posameznega nukleotida (SNP, angl. single nucleotide polymorphism) so do sedaj poročali pri citokinih CRP, IL-6 in inhibitorjem dejavniku migracije makrofagov (MIF), MCP-1, adhezijskih molekulah E-selektinu in ICAM-1 ter proteolitičnih encimih matriksne metaloproteinaze MMP-1, MMP-3 in MMP-9. V isti raziskavi so poudarili tudi sinergističen učinek med temi provnetnimi genotipi, ki določajo genetski profil, povezan z različno stopnjo tveganja za razvoj in progresijo PAB (24). Nadaljnje raziskave so se

usmerile tudi v preučevanje dejavnikov, ki sodelujejo v koagulacijski kaskadi (fibrinogen, von Willebrandov dejavnik, tkivni aktivator plazminogena, D-dimer fibrina), angiogenezi (VEGF-A), metabolizmu lipidov, regulaciji krvnega tlaka, regulaciji žilnega matriksa in vplivajo na endotelno disfunkcijo (23, 25).

Znanstveniki so se posvetili tudi preučevanju genetskih variant, ki bi vplivale na učinkovitost revaskularizacijskega posega pri bolnikih s PAB. Ker razvoj restenoze vključuje remodelacijo žilne stene in neointimalno hiperplazijo – za ta dva procesa vemo, da je glavni sprožilni dejavnik žilno vnetje – so se znanstveniki osredotočili na vlogo vnetnih mediatorjev. Različne raziskave so pokazale pomembno povezavo med proteini akutne faze in PTA (26, 27). V dosedanjih raziskavah je bila ugotovljena povezava med pogostostjo restenoze in polimorfizmi v genih za IL-6, NR4A2 in IL-1 (27–29). Poleg vnetnih mediatorjev so preučevali tudi dejavnike, ki so pomembni v procesu strjevanja krvi in vplivajo na delovanje trombocitov, vendar jim ni uspelo dokazati neposrednih povezav med njimi (11, 23).

Kljub velikemu številu do sedaj opravljenih raziskav pa nam še vedno ni uspelo razviti idealnega genetskega kazalnika, ki bi nam omogočal prepoznavati bolnike z večjim tveganjem za razvoj PAB ali spremljanje terapevtskega odziva na revaskularizacijske posege (23). Genetske kazalnike iščemo na ravni proteinov ali z merjenjem izražanja genov, pri čemer določamo količino informacijske RNA (mRNA, angl. messenger RNA), v zadnjem času pa veliko obetajo tudi mikro RNA (miRNA). Ker so te molekule visoko stabilne v krvi in odporne proti razgradnji, predstavljajo potencialno idealni genetski kazalnik. Kadar nas ne zanima samo iskanje z boleznijo povezanega gena, ampak bi radi razjasnili tudi mehanizem, nam več o tem lahko pove merjenje izražanja proteinov. Fenotip celice namreč določajo končno izraženi proteini, napačno pa je tudi takojšnje sklepanje, da je količina mRNA sorazmerna s količino nastalega proteina. Vzrok je v tem, da tvorba in vzdrževanje celičnih proteinov zahtevata niz zapletenih, med seboj povezanih procesov, ki zajemajo prepisovanje DNA v mRNA, obdelavo primarnega transkripta v zrelo mRNA, razgradnjo mRNA, prevod mRNA v neaktivni protein, obdelavo teh transkriptov v zrel in aktiven protein ter programirano uničenje samih beljakovin in zato je korelacija odvisna od vrste tkiva in celice (30, 31). V tem procesu imajo pomembno vlogo tudi mikro RNA, ki so vpletene v posttranskripcijsko regulacijo izražanja gena in vplivajo na stabilnost in translacijo mRNA. Nedavna raziskava je identificirala 12 mikro RNA, ki so se drugače

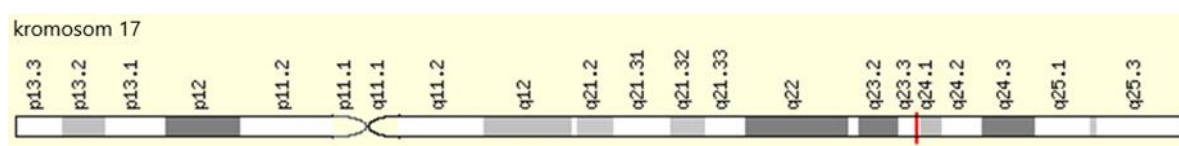
izražale pri bolnikih s PAB kot v kontrolni skupini brez PAB. V pilotski raziskavi so dokazali, da se 3 mikro RNA (miR-130a, miR-210 in miR-27b) signifikantno povišano izražajo pri bolnikih s PAB glede na kontrolno skupino, raven miR-210 pa so obratno povezali z dolžino klavdikacijske razdalje. Ta odkritja potrebujejo dodatne potrditve na več skupinah bolnikov (23).

V naši raziskavi smo se osredotočili na merjenje izražanja genov, saj želimo najti z restenozo povezane gene, ki bi nam omogočili razvoj novih terapevtskih tarč po posegu. Prav tako nam merjenje proteinov takoj po posegu v eni časovni točki morda ne daje objektivne slike, saj je lahko povečanje ali zmanjšanje določenega proteina zgolj prehodno in posledica akutne poškodbe zaradi posega. Rešitev bi bilo spremljanje koncentracije skozi daljše časovno obdobje in šele takrat sklepanje na povezanost s pojavom restenoze v poznejših obdobjih. Hkrati na nastanek proteinov, kot že omenjeno, vplivajo še drugi dejavniki. Z merjenjem izražanja gena pa lahko dobimo najbolj neposreden vpogled na vpliv opravljenega posega in s tem tudi prve tarče za preprečevanje ponovne zapore arterije.

### 1.3.1 PECAM-1

Trombocitna endotelijska adhezijska molekula 1 (PECAM-1, angl. Platelet and Endothelial Cell Adhesion Molecule 1), poznana tudi kot CD31, je 130 kDa dolg glikoprotein, ki spada v družino imunoglobulinov. Izraža se na površini hematopoetskih celic, in sicer na trombocitih, monocitih, nevtrofilcih in nekaterih limfocitih ter na površini endotelijskih celic v medceličnih stikih (32, 33). Gre za multifunkcionalno signalno molekulo, ki je vpletena v številne procese. Vpliva na funkcijo trombocitov, angiogenezo, vaskulogenezo, regulacijo integrinov, aktivacijo limfocitov T in B ter migracijo levkocitov skozi endotelij, zaradi česar ima pomembno vlogo pri vnetnem procesu, ki vodi v nastanek aterosklerotičnega plaka (32).

Sestavljen je iz 6 zunajceličnih domen, 1 transmembranske in 1 citoplazemske domene (32). Gen, ki kodira protein, se nahaja na kromosomu 17 (natančneje 17q23.3, Slika 4).



Slika 4: Mesto nahajanja gena *PECAM1* na kromosomu 17; povzeto po (34).

Dosedanje raziskave so poročale o prisotnosti 11 različnih SNP-ov, od katerih 3 kodirajo aminokislinsko substitucijo. Osredotočili se bomo na dva polimorfizma, ki ju preučujemo tudi v naši raziskavi. To sta polimorfizma rs668 in rs12953. Nahajata se v eksonu 3 in 8 zunanje domene, ki je odgovorna za vezavo PECAM-1 z drugimi molekulami, zato lahko polimorfizem v tem delu vpliva na sposobnost tvorbe interakcij z vnetnimi mediatorji in s tem na nagnjenost posameznika k razvoju ateroskleroze (32, 33).

Polimorfizem rs668 v eksonu 3 na mestu +373 vključuje zamenjavo citozina – C z gvaninom – G (C373G), zaradi česar pride do zamenjave aminokislina levcin z valinom na mestu 125 (Leu125Val). Polimorfizem v tem delu naj bi vplival na sposobnost tvorbe homofilnih interakcij z drugimi molekulami in s tem na transmigracijo levkocitov v procesu ateroskleroze. V različnih raziskavah so polimorfizem v tem delu povezovali s povečanim tveganjem za razvoj koronarne arterijske bolezni in miokardnega infarkta (32, 35–38).

Polimorfizem rs12953 v eksonu 8 na mestu +1688 vključuje zamenjavo gvanina – G z adeninom – A (G1688A), zaradi česar pride do menjave serina z asparaginom na mestu 563 (Ser563Asn). Polimorfizem v tem delu naj bi vplival na heterofilne interakcije z integrini (39). V raziskavi so ga povezovali s povečanim tveganjem za razvoj miokardnega infarkta (40).

### **1.3.2 IL-6**

Interlevkin-6 (IL-6, angl. Interleukin-6) je 26 kDa dolg pleiotropni citokin. Sintetizirajo ga številne celice v steni arterij, vključno z limfociti, monociti, fibroblasti, makrofagi, gladkomišičnimi celicami in endotelijskimi celicami. Vpleten je v številne procese, posreduje pa tako pro- kot protivnetne učinke, kar je odvisno od vrste poškodbe, na kateri organ ali na katero vrsto celic v telesu deluje.

Ena izmed njegovih najpomembnejših vlog v sistemske vnetnem procesu (kar je pomembno tudi pri vpletenosti v razvoj in proces srčno-žilnih bolezni) je regulacija akutnega vnetnega odgovora. IL-6 kot zgodnji mediator vnetja v hepatocitih vzpodbuja sintezo proteinov akutne faze, kot so CRP, SAA, fibrinogen,  $\alpha$ 1-kemotripsin in haptoglobin. Zvišane vrednosti CRP in SAA so bile prav tako že večkrat povezane z aterosklerozo. Ostali protivnetni učinki IL-6 so še: kemotaktična aktivnost za nevtrofilce in makrofage, spodbujanje proliferacije T celic ter končne diferenciacije makrofagov,

protrombotični učinek ter promovira proliferacijo gladkomišičnih celic. Sodeluje tudi pri aktivaciji endotelijskih celic, ki pod vplivom IL-6 sproščajo različne kemokine in druge adhezijske molekule (41, 42). IL-6 vpliva tudi na metabolizem lipidov. Pokazali so, da naj bi IL-6 zmanjšal aktivnost lipoproteinske lipaze v maščobnem tkivu, zaradi česar se zmanjša privzem trigliceridov. To lahko vodi v kronično zvišane vrednosti cirkulirajočih lipidov, ki prispevajo k aterogenezi (41).

Poleg teh skupno negativnih učinkov na formacijo ateroma pa ima IL-6 tudi protivnetne učinke, saj inhibira produkcijo TNF- $\alpha$  in IL-1 ter vzpodbuja sintezo antagonistov receptorjev TNF- $\alpha$  in topnega TNF- $\alpha$  receptorja p55. IL-6 prav tako inhibira z lipopolisaharidi inducirano sintezo TNF- $\alpha$  v monocitih. Injiciranje rekombinantnega IL-6 pri zdravih prostovoljcih je povzročilo povečano produkcijo protivnetnih citokinov: antagonistov receptorjev IL-1 in IL-10. Hkrati inducira tudi produkcijo inhibitorja MMP-1, zaradi česar ima antiproteolitično aktivnost. IL-6 ima tudi pozitivne učinke na metabolizem lipidov preko pospešitve izražanja ATP-vezavnega kasetnega transporterja A1 (ABC A1), ki je vpleten v efluks lipidov iz makrofagov (42).

Gen, ki kodira protein, se nahaja na kromosomu 7 (natančneje 7p15.3, Slika 5).



Slika 5: Mesto nahajanja gena *IL6* na kromosomu 7; povzeto po (43).

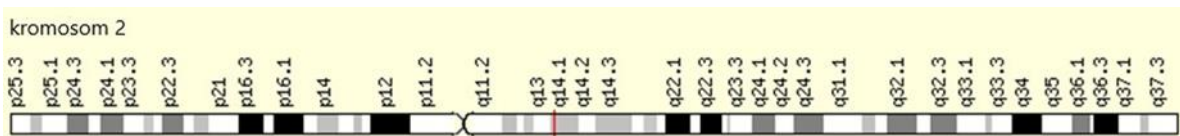
Znotraj populacije so razlike v koncentraciji IL-6 posledica tako genetskih kot okoljskih vplivov. Razvoj in izraženost srčno-žilnih bolezni so v večih raziskavah že povezali s povišanimi koncentracijami IL-6 (28, 42, 44, 45). Gen *IL6* je sestavljen iz 5 eksonov, v kodirajočem zaporedju pa so znani redki polimorfizmi. Zato so se pojavile hipoteze, da so razlike v koncentracijah IL-6 posledica razlik v promocijski regiji *IL6*. V naši raziskavi smo opazovali polimorfizem rs10499563, kjer gre za zamenjavo timina – T s citozinom – C na mestu -6331 (T-6331C). V raziskavi so ugotovili, da so imeli bolniki z genotipom TT višje plazemske vrednosti IL-6 v primerjavi z bolniki z genotipom CC (44).

### 1.3.3 IL-1 $\beta$

Interlevkin-1 beta (IL-1 beta, angl. Interleukin-1 Beta) je član družine citokinov IL-1, eden izmed ključnih regulatorjev akutnega in kroničnega vnetja, ki sproži sintezo in izražanje

številnih sekundarnih vnetnih mediatorjev, ter močan induktor prirojenega imunskega odziva. Sintetizirajo in sproščajo ga različne celice, kot so endotelijske celice, gladkomišične celice, hepatociti, krvni monociti, aktivirani makrofagi in dendritične celice. Produkcija in aktivnost IL-1 $\beta$  je regulirana na večih stopnjah. Hitrost omejujoč korak v produkciji je transkripcija, vendar pa potrebuje mRNA še dodaten signal za sintezo. Stimulus so lahko citokini, kot so TNF- $\alpha$ , IL-18, agonisti Toll-u podobnih receptorjev (celični ostanki, bakterijski produkti), IL-1 $\alpha$  in tudi IL-1 $\beta$  z avtoindukcijo, kar je ključno pri patogenezi avtoimnih bolezni. IL-1 $\beta$  je najprej sintetiziran kot 31 kDa dolga prekursorska neaktivna oblika (proIL-1 $\beta$ ), ki jo nato proteolitično procesirajo kaspaze-1 (intracelularne cisteinske proteaze) v aktiven, 18 kDa dolg protein. Aktivacija kaspaze-1 zahteva oligomerizacijo kompleksa intracelularnih proteinov, ki tvorijo tako imenovani inflamatom. Identificirani so bili številni potencialni sprožilci inflamatomov, ki vplivajo na produkcijo IL-1 $\beta$ , kot so mikrobnih antigeni, celični ostanki, adenosin trifosfat, ishemija, holesterolni kristali in drugi ligandi Toll-u podobnih receptorjev. V imunskem sistemu ima IL-1 $\beta$  številne sistemske učinke, in sicer je vpleten v nastanek vročine, hipersenzibilnost nociceptivnih receptorjev preko indukcije ciklooksigenaze 2 v centralnem živčnem sistemu, sodeluje pri odzivu na stres, metabolizmu inzulina, lipidov (zvišuje raven trigliceridov), kosti in je eden ključnih mediatorjev v vnetnem odzivu. Deluje na endotelijske celice in gladkomišične celice, pri čemer inducira izražanje adhezivnih molekul na površini endotelijskih celic, poveča izražanje dejavnikov koagulacije krvi in inhibitorjev fibrinolize ter vzpodbuja sekrecijo drugih citokinov in kemokinov. Prav tako deluje kot kemoatraktant in mitogen za gladkomišične celice in je v povečani količini prisoten na mestu poškodbe arterijske stene, s čimer sproža nastanek neointimalne hiperplazije, kar nakazuje na centralno vlogo IL-1 $\beta$  v procesu aterogeneze (46–49).

Gen, ki kodira protein, se nahaja na kromosomu 2 (natančneje 2q14.1, Slika 6).



Slika 6: Mesto nahajanja gena *IL1B* na kromosomu 2; povzeto po (50).

Številne objavljene raziskave so pokazale povezanost izražanja IL-1 s srčno-žilnimi boleznimi, kot so miokardni infarkt, koronarna arterijska bolezen, akutna ishemična kap,

restenoza po vstavitvi žilne opornice v koronarne arterije in venska tromboza. Genske variacije v IL-1 družini, ki vključuje IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  in antagonista IL-1 receptorjev (IL-1RN), so v določenih raziskavah pokazale, da vplivajo na količino provnetnih mediatorjev (51). Veliko SNP-ov je bilo identificiranih v kodirajočih in regulatornih regijah IL-1 genov. Ker je med njimi visoka stopnja vezavnega neravnovesja (angl. linkage disequilibrium), nam je to omogočilo identifikacijo skupin SNP-ov, ki se dedujejo skupaj v blokih, oziroma s tem identifikacijo haplotipov. Pri belcih so bili identificirani 3 pogosti haplotipi (Preglednica II). V splošnem naj bi nosilci alelov, ki so povezani s haplotipom 1, imeli signifikantno višje vrednosti IL-1 $\beta$  v plazmi, prav tako pa naj bi njihovi krvni monociti proizvajali večjo količino IL-1 $\beta$  kot iste celice pri nosilcih drugih alelov. Tovrstne IL-1 genske variacije so bile prav tako povezane z višjimi koncentracijami CRP-ja ter tkivnih dejavnikov v plazmi in serumu. Dosedanji rezultati raziskav nakazujejo, da so variacije v genu *IL1*, ki vplivajo na povečano izražanje vnetnih mediatorjev, povezane z večjim tveganjem za srčno-žilne dogodke (52). V eni izmed raziskav so preučevali tudi vpliv polimorfizmov na tveganje za pojav restenoze, kjer so kombiniran efekt SNP-ov C(-511)T v genu *IL1B* in polimorfizem števila tandemskih ponovitev (VNTR, angl. variable number tandem repeat) v intronu 2 gena za antagonista IL-1 receptorjev povezali z večjim tveganjem za pojav restenoze femoropoplitealne arterije po PTA (27).

Preglednica II: Trije pogosti haplotipi na osnovi SNP-ov v genih za IL-1 (52).

IL-1 haplotip	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$		IL-1RN
	(+4845) ali (-889) <sup>1</sup>	(+3954)	(-511) ali (-31) <sup>2</sup>	(+2018) ali VNTR <sup>3</sup>
1	2	2	1	1
2	1	1	2	1
2b	1	1	2	2
3	1	1	1	1

<sup>1</sup> IL-1 $\alpha$ (+4845) in IL-1 $\alpha$ (-889) sta pri belcih 100% konkordantna; <sup>2</sup> IL-1 $\beta$ (-511) in IL-1 $\beta$ (-31) sta pri belcih 100% konkordantna; VNTR je pentaalelni sistem, v katerem so aleli 3, 4 in 5 zelo redki. Če se zruši v dvoalelni sistem z aleli 2–5 kot alel 2, je pri belcih visoko konkordanten z IL-1RN(+2018).

### 1.3.4 NR4A2

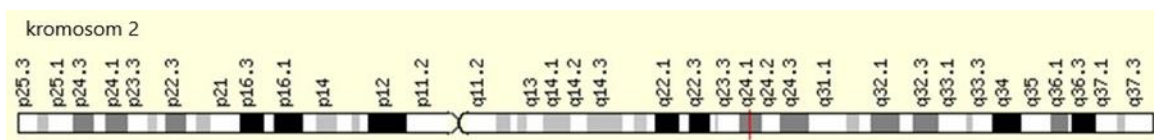
Jedrnemu receptorju podoben protein 1 (NR4A2 oz. starejše NURR1; angl. Nuclear Receptor Related Protein 1) spada v NR4A podskupino jedrnih receptorjev, kamor uvrščamo še NR4A1 (Nur77) in NR4A3 (NOR1). Pravimo jim tudi receptorji sirote (angl. orphan receptors), ker zanje ne poznamo endogenih ligandov. Ti transkripcijski dejavniki so bili opisani v regulaciji procesov diferenciacije, proliferacije, apoptoze in preživetja

mnogih različnih celic. NR4A2 se veže kot monomer ali homodimer z ustreznim odzivnim elementom v promotorski regiji tarčnega gena, hkrati pa lahko tvori tudi heterodimer z retinoidnimi X receptorji, s čimer posreduje retinoidni odziv. Poleg neposrednega uravnavanja izražanja genov NR4A2 modulira izražanje genov tudi preko transrepresije drugih transkripcijskih dejavnikov (53, 54). Učinek aktivacije NR4A2 na izražanje genov je močno odvisen od vrste celice/tkiva in narave opazovane signalne poti. NR4A2 aktivacija lahko inducira apoptozo v rakavih celičnih linijah, hkrati stimulira razvoj in dozorevanje dopaminergičnih nevronov in blokira vnetni odziv v makrofagih. Raziskave v zadnjih letih so pokazale vlogo receptorja NR4A2 v številnih procesih, ki vključujejo energijski metabolizem, aterosklerozo, žilno funkcijo, s T-celičnim receptorjem posredovano apoptozo, vnetni odziv, regulacijo hipotalamus-hipofizne osi in reprodukcijski proces. NR4A2 dokazano igra pomembno vlogo tudi pri razvoju in homeostazi centralno-živčnega sistema; povezovali pa so ga tudi s funkcionalnostjo delovnega spomina in Parkinsonovo boleznijo (54).

Nedavne raziskave, ki so raziskovale vlogo receptorjev NR4A v razvoju srčno-žilnih bolezni, so ugotovile, da se NR4A receptorji povečano izražajo v aterosklerotičnih endotelijskih celicah, posredujejo pa tako atero- kot protiaterogene učinke. Rezultati so pokazali, da znotraj teh receptorjev NR4A3 promovira razvoj aterosklerotične lehe, medtem ko NR4A1 in NR4A2 oslabita sam proces. Pokazati jim je uspelo, da NR4A2 posreduje antimitogene in protivnetne učinke v gladkomišičnih celicah, in sicer preko inhibicije NF $\kappa$ B poti, ki vpliva na izražanje provnetnih citokinov in kemokinov. Prav tako naj bi TNF $\alpha$  inducirala sintezo NR4A2, medtem ko bi ta v odgovor povratno zmanjšal izražanje IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  in MCP-1 v gladkomišičnih celicah (53–55). Njegova protektivna vloga v zaščiti pred aterogenezo in razvojem z gladkomišičnimi celicami bogatimi lezijami je bila potrjena tudi v raziskavi na miših, ki je odkrila, da je NR4A2 negativno reguliran z miR-145 (54). Dodatne raziskave na humanih makrofagih so pokazale, da NR4A2 inhibira privzem oLDL v makrofage, medtem ko TNF $\alpha$ , lipopolisaharidi ter oLDL prehodno povišajo raven NR4A2 v makrofagih in promovirajo signalizacijo Toll-u podobnega receptorja-4, ki je dokazano vpleten v aterogenezo (54, 55).

Protein NR4A2 kodira gen *NR4A2*, ki se nahaja na kromosomu 2 (natančneje na mestu 2q24.1, Slika 7).





Slika 7: Mesto nahajanja gena *NR4A2* na kromosomu 2; povzeto po (56).

V genu za *NR4A2* je bilo opisanih kar nekaj SNP-ov, vendar pa lahko na podlagi 3 SNP-ov določimo 4 haplotipe s pogostostjo več kot 1%, ki pokrivajo več kot 96% variacij in so bili preučevani v povezavi s srčno-žilnimi boleznimi (Preglednica III). Ti so rs1466408, kjer se na mestu -15906 timin – T zamenja z adeninom – A (SNP A), rs13428968, kjer se na -3413 mestu timin – T zamenja s citozinom – C (SNP B), in rs12803, kjer se na +7275 mestu gvanin – G zamenja s timinom – T (SNP C) (53).

Preglednica III: Štirje haplotipi na podlagi treh SNP-ov s frekvencami več kot 1% (53).

Haplotipi	SNP A	SNP B	SNP C
1	T	T	G
2	T	T	T
3	T	C	T
4	A	T	T

V dosedanjih raziskavah so iskali povezave med haplotipi in razvojem restenoze, saj se pojavnost le-te v zadnjem času pripisuje regulaciji vnetja preko *NR4A2*. Haplotipe 3 in 4 so povezali z večjo stopnjo pojava restenoze po perkutani koronarni intervenciji, pojavom revaskularizacije tarčne lezije in 2–3x večjim tveganjem za pojav srčnih dogodkov v enem letu po posegu (53). Na podoben vpliv so sklepali tudi pri preučevanju vpliva haplotipov na pojav restenoze po PTA, pri čemer so v raziskavi pokazali povezanost haplotipa 2 in 3 s povečano stopnjo restenoze/reokluzije (57).

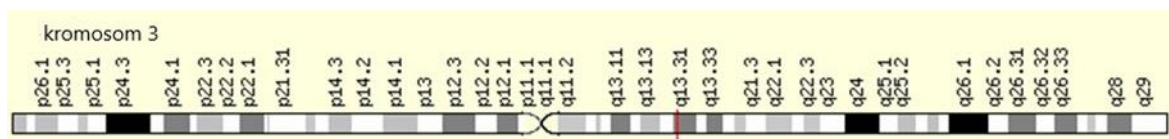
### 1.3.5 miR-568

MiRNA molekule so kratke (20–24 nukleotidov dolge) nekodirajoče RNA, ki so vpletene v posttranskripcijsko regulacijo izražanja gena. Največkrat delujejo tako, da vplivajo na stabilnost in translacijo mRNA. Sinteza miRNA se začne v jedru celice s prepisom genov za miRNA, ki v večini primerov poteka z RNA polimerazo II. Pri tem se tvori primarni transkript oz. primarna RNA (pri-miRNA), ki zaradi komplementarnih baz tvori sekundarno strukturo v obliki stebelne zanke. Naslednji korak zorenja poteka v jedru, kjer pride do cepitve pri-miRNA z encimom Drosha RNA-za III, pri čemer nastane 70 nukleotidov dolga lasnična struktura (prekurzorska miRNA, pre-miRNA). Po končanem

jedrnem zorenju se pre-miRNA s pomočjo exportina-5 prenese v citoplazmo, kjer jo drugi encim, imenovan Dicer ribonukleaza, pretvori v zrelo dupleks obliko miRNA, sestavljeno iz funkcionalne (zrele) verige in spremljevalne verige. Funkcionalna veriga se nato vgradi v z RNA inducirani utiševalni kompleks (RISC, angl. RNA – induced silencing complex), medtem ko se spremljevalna veriga razgradi s pomočjo celičnih nukleaz. Njena funkcija v RISC kompleksu je prepoznavna in vezava na tarčni odsek mRNA. Po vezavi nanjo povzroči njeno destabilizacijo in/ali prepreči izražanje proteina (58, 59).

MiRNA so se pojavile kot ključni regulatorji v številnih fizioloških in patoloških procesih v srčno-žilnem sistemu, vključno z razvojem ateroskleroze, kjer vplivajo na endotelno funkcijo, proliferacijo in migracijo gladkomišičnih celic, makrofagno funkcijo ter formacijo penastih celic (60).

Mikro RNA 568 (miR-568, angl. Micro RNA 568) je majhna, približno 22 nukleotidov dolga molekula. Gen za miR-568 se nahaja na kromosomu 3, natančneje na mestu 3q13.31 (Slika 8).



Slika 8: Mesto gena *miR568* na kromosomu 3; povzeto po (61).

Dosedanje raziskave so miR-568 povezovala z regulacijo vnetja, patogenezo in napredovanjem srčne odpovedi, kronično mieloično levkemijo in zgodnjo diabetično nefropatijo (62–66). Bioinformatične analize so napovedale številne tarčne gene miR-568, med njimi tudi takšne, ki delujejo provnetno, kot so: *VEGFA*, *IL6*, *VCAM1*, *TNF*, *MMP1* in drugi, preko katerih bi lahko vplival na proces vnetja in napredovanje aterosklerotične bolezni (67). Za analizo smo si ga izbrali zato, ker so v pilotski raziskavi iz leta 2008 na manjši skupini bolnikov dokazali statistično pomembne razlike v izražanju tega gena pri bolnikih, ki so po šest mesecih razvili restenozo, in bolnikih, ki so ohranili prehodne arterije (68).

## 2 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

PTA je uveljavljen postopek zdravljenja omejujoče kratkih klavdikacijskih razdalj in kritične ishemijske femoropoplitealne arterije pri bolnikih s PAB. Čeprav je njegova uspešnost visoka, se kot najpogostejši zaplet po posegu še vedno pojavlja nastanek ponovne restenoze/reokluzije v roku enega leta po posegu, in sicer po zadnjih ocenah pri 40–60% bolnikov. Dejavniki, ki so odgovorni za ta pojav, še vedno niso popolnoma znani. Znano pa je, da je pojav vnetja na področju operirane arterije kot posledica stresa, ki ga predstavlja opravljen poseg, eden izmed dejavnikov, ki pomembno vplivajo na trajnost in učinkovitost postopka.

V ta namen bomo v naši raziskavi preučevali izražanje genov nekaterih kazalnikov vnetja, za katere vemo ali predvidevamo, da so povezani z razvojem srčno-žilnih bolezni in sodelujejo v procesu žilne remodelacije ter neointimalne hiperplazije. Preučevali bomo izražanje genov *IL6*, *IL1B*, *PECAM1*, *NR4A2* in *miR568*, zanimalo pa nas bo, ali opravljen postopek PTA kakor koli vpliva na njihovo izražanje. Ker imamo v raziskavo vključene tako bolnike, ki so tekom enoletnega spremljanja razvili restenozo, kot bolnike, ki le-te niso razvili (kontrolna skupina), nam to omogoča tudi primerjavo izražanja izbranih genov znotraj skupin bolnikov in s tem ugotavljanje potencialne napovedne vrednosti izbranih genetskih kazalnikov na razvoj restenoze. Prehodnost arterij so pri izbranih bolnikih na Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana spremljali s pomočjo ultrazvočnega pregleda, in sicer en mesec, šest in dvanajst mesecev po posegu.

Hipoteze bomo testirali v vzorcih komplementarne DNA (cDNA), prepisane iz celokupne RNA vzorca krvi, odvzetega 24 ur pred in neposredno po posegu, s pomočjo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR) in ustrezno statistično obdelavo. Na podlagi rezultatov polimorfizmov, ki so jih izmerili pri istih bolnih za potrebe druge magistrske naloge, bomo ugotavljali tudi, ali se polimorfizmi rs12803, rs146608 in rs13428968 v genu *NR4A2*, rs668 in rs12953 v genu *PECAM1* ter rs10499563 v genu *IL6* kakor koli povezujejo z izražanjem izbranega gena.

## **3 MATERIALI IN METODE**

### **3.1 Bolniki**

V raziskavo smo vključili in prospektivno spremljali 126 bolnikov s PAB, ki so privolili v sodelovanje v raziskavi (78 moških, povprečne starosti  $64 \pm 8$  let in 48 žensk, povprečne starosti  $71 \pm 9$  let) in ki so jim opravili PTA femoropoplitealnega odseka zaradi kritično kratke klavdikacijske razdalje ali kronične kritične ishemije uda. Povprečna starost ob posegu je bila  $67 \pm 9$  let.

Vsem bolnikom so bili odvzeti vzorci krvi 24 ur pred posegom in neposredno po njem v epruvete Tempus™ Blood RNA Tubes (Applied Biosystems, ZDA), ki so namenjene stabilizaciji in kasnejši izolaciji celokupne RNA iz levkocitov za analizo izražanja genov. Pri odvzemu krvi v te epruvete pride do takojšnje lize belih krvnih celic, inaktivacije RNA-z in stabilizacije RNA s pomočjo selektivnih precipitantov, ki enkapsulirajo celokupno RNA v micelle. Genomska DNA in proteini pri tem ostanejo raztopljeni (69). Vzorci krvi so bili do analize hranjeni pri temperaturi  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Od 126 v raziskavo vključenih bolnikov, za katere naj bi imeli na razpolago po dva vzorca ( $n = 252$ ), smo dejansko analizirali 243 vzorcev: štirje vzorci so bili izločeni zaradi nepravilnega odvzema krvi, saj je kri v epruveti koagulirala in zato izolacija RNA ni bila uspešna, en vzorec smo zavrgli zaradi prevelike razgradnje RNA, trije vzorci pa so manjkali.

Po opravljeni PTA je bil pri vseh bolnikih načrtovan ultrazvočni pregled, in sicer en mesec, šest in dvanajst mesecev po opravljenem posegu, da bi preverjali prehodnost operirane arterije. Kot neugoden izid po PTA so označili ugotovitev  $\geq 50\%$  stenoze femoropoplitealnega odseka.

### **3.2 Splošna opozorila za delo v genetskem laboratoriju**

Pri praktičnem delu smo uporabljali čiste halje in zaščitne rokavice iz lateksa, s čimer smo preprečili morebitno kontaminacijo vzorcev in zaščitili sebe ter drugo osebje. Pred začetkom dela in po koncu smo delovne površine, material in opremo vedno počistili najprej s 3-odstotnim natrijevim hipokloritom in nato s 70-odstotnim etanolom. V času rokovanja z RNA smo dodatno uporabljali RNAze-zap™ (Sigma-Aldrich, ZDA), s čimer smo uničili RNA-ze (encime, ki katalizirajo hidrolizo fosfodiesterne vezi v RNA). Komoro

za izolacijo RNA in komoro za qPCR smo očistili enako kot ostale delovne površine, pred pričetkom dela pa smo jo za 30 minut osvetlili z UV svetlobo.

Pri delu z RNA smo uporabljali pipete, ki se uporabljajo posebej samo za delo z RNA, in sterilni material za enkratno uporabo (sterilni nastavki za pipete s filtrom, centrifugirke). Ko smo RNA prepisali v cDNA, smo uporabljali pipete, namenjene izključno za delo z DNA, in material (pipetni nastavki, epice), ki smo ga predhodno avtoklavirali.

Vse biološke odpadke in material, ki so pri delu prišli v stik z vzorci, smo odvrgli v posebne koše, namenjene za zbiranje tovrstnih odpadkov.

### **3.3 Izolacija celokupne RNA**

Izolacijo celokupne RNA smo po navodilih proizvajalca izvedli v RNA komori s kompletom Preserved Blood RNA Purification Kit I za 50 reakcij (Norgen Biotek Corporation, Kanada). Princip metode temelji na kolonski kromatografiji, ki uporablja posebno Norgenovo stacionarno fazo.

Epruvete s krvjo smo najprej odtalili na ledu in nato vsebino prelili v 50 ml centrifugirke, dodali ustrezno količino raztopine za redčenje in vorteksirali. V nadaljevanju smo vzorce 30 minut centrifugirali pri 4 °C in 5.000 g na centrifugi z nihajnim rotorjem. Po koncu centrifugiranja smo odlili supernatant in centrifugirko sušili še 2 minuti. Nastale RNA pelete na dnu smo raztopili v raztopini za lizo celic, ki je vsebovala gvanidinijeve soli, ki so povzročile lizo celic, denaturacijo proteinov in inhibirale RNA-ze. Pred pričetkom kolonske kromatografije smo po navodilih proizvajalca dodali ustrezno količino absolutnega etanola in vsebino prenesli na kolono, nameščeno v zbirno epruvetko, centrifugirali 1 minuto pri 10.000 g in zavrgli filtrat. Sledilo je trikratno spiranje kolone za odstranitev nevezanih komponent, kjer smo vsakič kolono z zbirno epruvetko centrifugirali 1 minuto pri 14.000 g, oziroma dokler ni prišel skozi ves filtrat. Na koncu je sledila še elucija vezane RNA v elucijsko epruvetko, ki smo jo centrifugirali sprva 2 minuti pri 200 g in nato 1 minuto pri 14.000 g. Filtrat smo do nadaljevanja analize shranili pri -70 °C. Vsi reagenti z izjemo absolutnega etanola (Sigma-Aldrich, ZDA), kolone, zbiralne in elucijske epruvetke so bili del kompleta za izolacijo.

### **3.4 Ocena količine in kvalitete izolirane RNA**

Količino izolirane celokupne RNA smo ocenili spektrofotometrično z NanoDrop™ (Thermo Scientific, ZDA), z merjenjem absorbanc pri 260 nm. Podlaga za analizo je Beer-

Lamberotov zakon (*Enačba 1*), ki temelji na tem, da je koncentracija raztopine pri konstanti dolžini poti svetlobe, valovni dolžini svetlobe in temperaturi direktno proporcionalna količini absorbirane svetlobe.

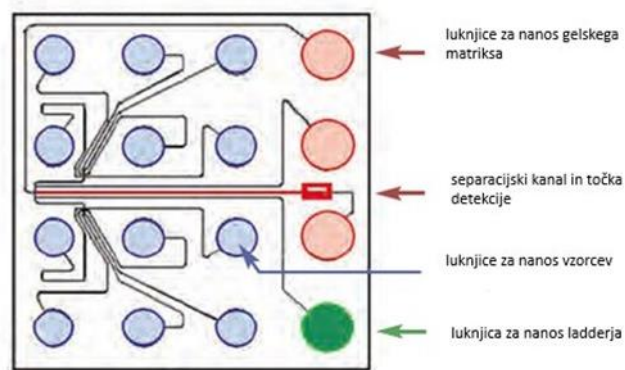
$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

*Enačba 1*: Beer-Lambertov zakon;  $\varepsilon$  = molarni ekstinkcijski koeficient,  $b$  = dolžina poti svetlobe,  $c$  = molarna koncentracija vzorca,  $A$  = absorbanca

Nukleinske kisline zaradi aromatskih obročev v purinskih in pirimidinskih bazah absorbirajo UV svetlobo z maksimumom absorbance pri 260 nm. Čistost izolata smo ocenili z merjenjem absorbanc pri 230 nm in 280 nm. Razmerje  $A_{260/280}$  mora biti, da je sprejemljivo, večje od 1,8. Nižje vrednosti kažejo na prisotnost proteinov, kajti tirozin in triptofan močno absorbirata pri 280 nm. Razmerje  $A_{260/230}$  je idealno v območju med 2,0 in 2,2. Pove nam prisotnost rezidualnih organskih kontaminantov, uporabljenih pri izolaciji, saj gvanidinijske soli in fenol močno absorbirajo pri 230 nm.

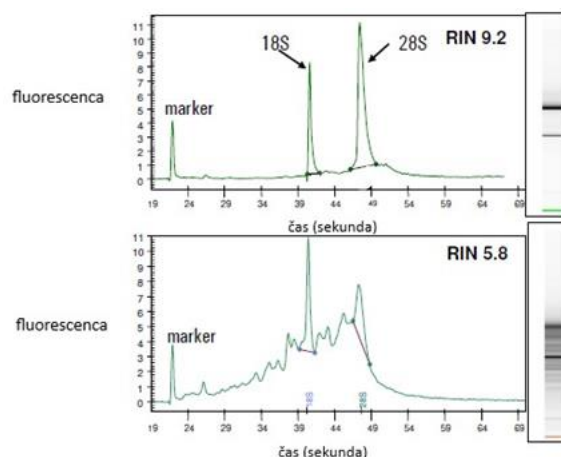
Predhodno smo izmerili še spekter referenčne raztopine, ki je bila pri nas elucijska raztopina kompleta za izolacijo RNA, s čimer smo se znebili motečih elementov ozadja oziroma preostalih reagentov iz postopka izolacije.

Za oceno razgradnje oz. kvalitete izolirane RNA smo vzorcem določili RIN (angl. RNA integrity number). RIN izražamo v vrednostih 1–10, kjer je 10 intaktna in 1 povsem degradirana RNA. RIN smo določili z napravo Agilent Bioanalyzer 2100 in RNA 6000 Nano Asay Kit-om (Agilent Technologies, ZDA), ki izvede kapilarno elektroforezo na čipu. Čip je narejen iz stekla, ima 12 luknjic za vzorce, 3 luknjice za nanos gela in eno luknjico za nanos zunanjega standarda (lestvica RNA); povezujejo pa jih vrezani mikrokanali (Slika 9).



Slika 9: Čip za kapilarno elektroforezo Agilent Bioanalyzer; prirejeno po (70).

Pri pripravi čipa smo po navodilih proizvajalca kanale najprej napolnili z gelskim matriksom (porozni polimer in fluorescentno barvilo), ki smo ga predhodno pripravili v komori za izolacijo RNA. Po pripravi vzorcev (odtjanje vzorcev, mešanje, dveminutna denaturacija na termobloku pri 70°C) in lestvice RNA smo na čip odpipetirali še interni standard, vzorce in lestvico RNA ter jih s pomočjo brizge (Agilent Technologies, ZDA) enakomerno porazdelili po čipu ter ga postavili na stresalnik za 1 minuto. Po vstavitvi čipa v napravo se elektrode usedejo v luknjice, vsaka pa je povezana z neodvisnim virom napetosti. Nabite molekule, kot je RNA, elektroforezno potujejo zaradi gradienta napetosti. Ker je naboj na enoto dolžine verige RNA stalen, je mobilnost v električnem polju odvisna od velikosti in oblike. Krajši fragmenti potujejo hitreje in posledično pripotujejo dlje od večjih. Fragmente vizualiziramo s pomočjo fluorescentnega barvila, ki se vrine med bazne pare. S pomočjo lestvice RNA, ki vsebuje komponente znanih velikosti, se oblikuje standardna krivulja časa migracije v odvisnosti od velikosti fragmentov. Iz migracijskega časa vsakega fragmenta se na podlagi standardne krivulje določi velikost fragmentov v vzorcu. Informacija se prevede v sliko potovanja v gelu in elektroferogram. Tipičen elektroferogram RNA (Slika 10) vsebuje 18S in 28S ribosomska vrhova RNA. Degradacijo RNA lahko vidimo s pomikom bazne linije in zmanjšanim razmerjem 28S:18S, ki je normalno 1,8–2,0. Degradacija namreč povzroči distribucijo velikosti proti manjšim fragmentom in zmanjša fluorescentni signal, ker so mesta za interkalacijo barvila uničena (71).



Slika 10: Primer elektroferogramov visoko kvalitetne RNA (RIN=9,2) in degradirane RNA (RIN=5,8); prirejeno po (72).

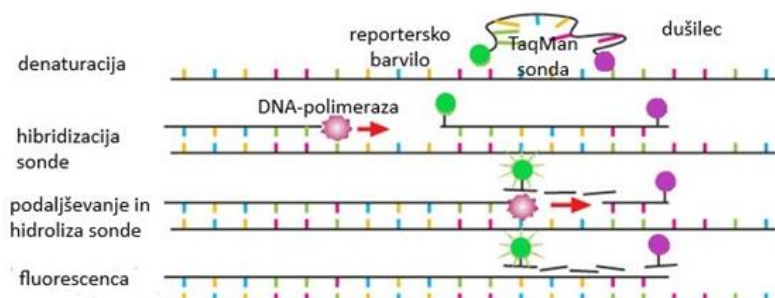
### 3.5 Reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo

PCR je *in vitro* metoda, ki nam omogoča sintezo velikega števila kopij želenega odseka DNA v zelo kratkem času. Reakcija poteka v več ciklih, v katerih se teoretično podvoji število tarčnih odsekov. Za izvedbo pomnoževanja potrebujemo: DNA, oligonukleotidna začetnika (18–25 nukleotidov), deoksinukleozid-trifosfate (dNTPje),  $Mg^{2+}$  ione, reakcijski pufer in termostabilno DNA-polimerazo (74).

Pri klasičnem PCR poteka detekcija produktov po končanem pomnoževanju z uporabo gelske elektroforeze. Kot nadgradnjo klasičnega PCR so kasneje razvili verižno reakcijo s polimerazo v realnem času, imenovano tudi kinetični ali kvantitativni PCR (qPCR), ki že med samo reakcijo meri količino produkta v vsakem ciklu. Detekcija produktov temelji na fluorescenci, merjenje nastalega produkta pa poteka v eksponentni fazi PCR reakcije. Hkrati v tej fazi določimo tudi prazno fluorescenco; gre za fluorescenco, ki je značilno višja od ozadja, cikel, ko se to zgodi, pa se imenuje kvantifikacijski cikel - Cq (oznake v literaturi so tudi Ct – angl. threshold cycle, Cp – angl. crossing point in TOF – angl. take-off point) (73, 74). Produkt lahko detektiramo specifično ali nespecifično. Pri specifičnih načinih detekcije uporabljamo sisteme z označenimi sondami oz. označenimi začetniki, ki specifično prepoznajo nukleotidno zaporedje in se v stopnji prileganja vežejo nanj. Najpogosteje se iz te skupine uporabljajo hidrolizirajoče (npr. TaqMan) sonde. Te smo tudi mi uporabili za detekcijo *IL6*, *IL1B*, *PECAM1* in *miR568*, izkoriščajo pa 5'–3' eksonukleazno Taq DNA-polimerazno aktivnost. Sonda je označena z dvema barviloma; in sicer je pri intaktni sondi na 5' konec vezano donorsko barvilo (reporter), ki pri ekscitaciji emitira fluorescenco, na 3' konec pa receptorsko barvilo (dušilec), ki to fluorescenco



prestreže. Med reakcijo povzroči 5'-eksonukleazna aktivnost Taq DNA-polimeraze hidrolizo vezi, razdalja med barviloma se poveča in dušilec več ne prestreže fluorescence. Fluorescenca reporterskega barvila zato poraste in je sorazmerna s količino produkta (Slika 11) (73, 74).



Slika 11: Princip delovanja hidrolizirajoče sonde TaqMan; prirejeno po (75).

Ker lahko s PCR pomnožujemo le molekule DNA, smo morali naše vzorce RNA najprej prepisati v DNA, oba procesa skupaj pa tvorita RT – qPCR (angl. reverse transcription qPCR). Reverzna transkripcija je sinteza cDNA na osnovi enoverižne RNA. Opravijo jo encimi reverzne transkriptaze (encimi RT), ki se med seboj razlikujejo v lastnostih, kot so temperaturna obstojnost, točnost, procesivnost, senzitivnost, specifičnost, RNA-zna H aktivnost, vrsti potrebnega kofaktorja ipd. Kot matrico najpogosteje uporabimo celokupno RNA, lahko pa tudi samo mRNA ali miRNA. Z uporabo le mRNA se lahko poveča senzitivnost (ostala RNA iz ozadja zmanjša učinkovitost reverzne transkriptaze), vendar pa se povečana senzitivnost lahko izniči zaradi izgube materiala pri dodatni stopnji izolacije (74).

Raziskave genskega izražanja so osnovane na primerjavi izražanja genov med dvema neodvisnima populacijama, zato moramo pri delu uporabiti notranje kontrole, s pomočjo katerih rezultate najprej normaliziramo, da jih lahko nato primerjamo. S tem je primerjava rezultatov med vzorci bolj verodostojna, saj z njo izničimo vpliv razlik v učinkovitosti izolacije nukleinskih kislin in učinkovitosti reverzne transkripcije ter qPCR-ja med posameznimi vzorci. Za normalizacijo uporabljamo tako imenovane »hišne gene«. Idealno je to gen, ki se ne glede na vplive izraža enako v vseh preučevanih vzorcih in se ne izraža preveč različno od proučevanega gena. Najpogostejši geni, ki jih za to uporabljamo, so  $\beta$ -aktin, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH), ribosomalna RNA in drugi, lahko pa uporabimo tudi kombinacijo genov (73, 74).

### 3.5.1 Reverzna transkripcija

Ves postopek priprave vzorcev in Master mix-a smo izvedli v komori za delo z RNA, uporabili pa smo komplet High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, ZDA). Vzorce smo na začetku redčili na enotno koncentracijo. Izbrali smo koncentracijo, ki je bila čim nižja in hkrati optimalna za potek reakcije RT – qPCR, določena pa je bila v predhodnem pilotnem poskusu iz leta 2008. Po navodilih proizvajalca smo potrebovali 10 µL vzorca, določili pa smo koncentracijo 60 ng/µL. Količino potrebnega vzorca smo izračunali po *Enačbi 2*. Preostali volumen smo dopolnili z destilirano vodo za delo z RNA (Sigma-Aldrich, ZDA).<sup>1</sup>

$$V_{rna} = \frac{C_k \cdot V_k}{C_{rna}}$$

*Enačba 2:* Enačba za izračun potrebne količine RNA pri redčenju vzorcev na enotno koncentracijo celokupne RNA;  $V_{rna}$  = volumen RNA,  $C_k$  = koncentracija končne raztopine (60 ng/µL),  $V_k$  = volumen končne raztopine (10 µL),  $C_{rna}$  = koncentracija celokupne RNA, določena z Nanodropom

Master mix smo pripravili na ledu znotraj komore za delo z RNA, pripravili pa smo dve vrsti Master mix-a, enkrat z encimom RT in enkrat brez. Master mix brez encima nam je služil kot kontrola za preverjanje, da se tekom RT - PCR ne pomnožuje še kaj drugega kot RNA. Sestavine in količine posameznih reagentov za pripravo Master mix-ov so prikazane v Preglednici IV . Pred dodatkom vsake sestavine smo le-to vorteksirali, z izjemo encima.

Preglednica IV: Sestava reagenčne mešanice Master mix z encimom RT in Master mix brez encima RT.

MASTER MIX Z ENCIMOM RT (količine za 1 vzorec)		MASTER MIX BREZ ENCIMA RT (količine za 1 vzorec)	
Sestavina	Volumen (µL)	Sestavina	Volumen (µL)
puffer	2,0	puffer	2,0
dNTP mešanica	0,8	dNTP mešanica	0,8
naključni oligonukleotidni začetniki	2,0	naključni oligonukleotidni začetniki	2,0
encim MultiScribe™ RT	1,0	encim MultiScribe™ RT	0
inhibitor RNA-z	1,0	inhibitor RNA-z	1,0
voda brez nukleaz	3,2	voda brez nukleaz	4,2
SKUPAJ	10,0	SKUPAJ	10,0

<sup>1</sup> Pri določenih vzorcih je bila izmerjena koncentracija z Nanodropom nižja od 60 ng/µL. V takem primeru vzorca nismo redčili z vodo, ampak smo ga samo odpipetirali po 10 µL v epice in dodali Master mix.

V 10  $\mu\text{L}$  pripravljene redčene raztopine RNA vzorcev smo dodali 10  $\mu\text{L}$  Master mixa z encimom in premešali s pipeto. Dodatno smo si izbrali še 8 vzorcev, ki so nam služili za kontrolo, saj smo vanje namesto Master mix-a z encimom dodali Master mix brez RT. Epice smo centrifugirali in vzorce prenesli v PCR Thermal cycler (PEQLAB, Nemčija), ki nam je celokupno RNA prepisal v cDNA. V Preglednici V je podan uporabljen program za prepis. Produkta reverzne transkripcije smo nato zamrznili na  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  do analize qPCR.

Preglednica V: Reverzna transkripcija – uporabljeni program.

	<b>KORAK 1</b>	<b>KORAK 2</b>	<b>KORAK 3</b>	<b>KORAK 4</b>
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	25	37	85	4
Čas (min)	10	120	5	$\infty$

### 3.5.2 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času

Vzorce smo odtalili na ledu, premešali, centrifugirali in odpiptirali po 2  $\mu\text{L}$  vsakega vzorca v skupno epico. Na ta način smo dobili »stock«, ki nam je služil za pripravo umeritvene krivulje. Iz njega smo pripravili 6 standardov, kot je prikazano v Preglednici VI. Za redčenje smo uporabili destilirano vodo (Sigma-Aldrich, ZDA). Na enak način smo pripravili še »stock« kontrolnih vzorcev.

Preglednica VI: Priprava standardov (količine za 6 genov + 2 gena rezerve).

<b>Standard</b>	<b>Koncentracija (<math>\text{ng}/\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Volumen DNA (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Volumen H<sub>2</sub>O (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Skupen volumen (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Prenos (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
St1	4	52	338	390	195
St2	2	195	195	390	195
St3	1	195	195	390	195
St4	0,5	195	195	390	195
St5	0,25	195	195	390	195
St6	0,125	195	195	390	

Vzorce smo v nadaljevanju redčili na enotno koncentracijo standarda 2 (2  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) in pripravili reakcijske zmesi, kot je prikazano v Preglednicah VII in VIII. Za merjenje izražanja gena *NR4A2* smo uporabili ustrezne oligonukleotidne začetnike in SYBR Select MM 2x (Thermo Fisher Scientific, ZDA), za gene *GAPDH*, *IL6*, *IL1B*, *PECAMI* ter *miR568* pa ustrezne sonde in TaqMan Universal MM II 2x (Thermo Fisher Scientific, ZDA). Vse vzorce smo nanesti v trojniku, zato smo potrebovali količino reagentov za 845 reakcij - 2 x 384 ploščica (FrameStar® 480/384, 4titude®, Velika Britanija). Reakcijske

zmesi smo pripravljali v PCR komori, reagente predhodno premešali s pipeto in končno zmes centrifugirali.

Preglednica VII: Priprava reakcijske zmesi za *NR4A2* s SYBR Select oligonukleotidnimi začetniki (200 nM).

Reagenti	Količina za 1 vzorec (µL)	Količina za 845 vzorcev (768 + 10 %) (µL)
destilirana voda	2,2	1859
obratnosmerni oligonukleotidni začetnik (20 µM)	0,15	126,75
istosmerni oligonukleotidni začetnik (20 µM)	0,15	126,75
SYBR Select 2x Master Mix	7,5	6337,5
SKUPAJ	10	8450/845 = 10

Preglednica VIII: Priprava reakcijske zmesi s sondami za *GAPDH*, *IL1B*, *IL6*, *PECAMI* in *miR568*.

Reagenti	Količina za 1 vzorec (µL)	Količina za 845 vzorcev (768 + 10%) (µL)
destilirana voda	1,6	1352
20x TaqMan sonde	0,4	338
TaqMan Universal MasterMix II 2x	5,0	4225
SKUPAJ	7	5915/845 = 7 µL

Vzorci, slepo raztopino (destilirana voda namesto vzorca), kontrolo brez encima RT ter pripravljeno reakcijsko zmes smo nanesti na ploščice. Pri merjenju *NR4A2* smo nanesti 5µL vzorca (ali vode ali vzorca brez encima RT) in 10µL reakcijske zmesi; pri ostalih genih s TaqMan sondami pa smo nanesti po 3µL vzorca (ali vode ali vzorca brez encima RT) in 7µL reakcijske zmesi. Ploščice smo po nanosu obojega dobro zalepili s samolepilno folijo in jih centrifugirali 2 minuti ter analizirali z Roche LightCycler 480 II. Za *NR4A2* smo uporabili program SYBER Select MM (Preglednica IX), za ostale gene pa program TaqMan Universal MM II (Preglednica X).

Preglednica IX: Program SYBER Select MM.

	Temperatura (°C)	Trajanje	Cikli
UNG aktivacija	50	2 minuti	/
aktivacija AmpliTaq Fast DNA polimeraza	95	2 minuti	/
denaturacija	95	15 sekund	/
podaljševanje	60	1 minuta	50
hlajanje	40	30 sekund	/

Preglednica X: Program TaqMan Universal MM II.

	Temperatura (°C)	Trajanje	Cikli
UNG aktivacija	50	2 minuti	/
aktivacija AmpliTaq Fast DNA polimeraze	95	10 minut	/
denaturacija	95	15 sekund	/
podaljsevanje	60	1 minuta	50
ohlajanje	40	30 sekund	/

### 3.5.3 Določanje polimorfizmov

Odseke genov, kjer se nahajajo polimorfizmi, smo pomnožili s qPCR-jem, genotipe pa določili z alelna diskriminacijo. Pri tem smo uporabili TaqMan sonde, ki so bile specifične za želeni alel. Uporabili smo predpripravljene mešanice oligonukleotidnih začetnikov in sond TaqMan Pre-Designed SNP Genotyping Assay ter analizator ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Švica).

### 3.6 Statistične metode

Po končani reakciji smo dobili rezultate v obliki vrednosti Ct, ki predstavlja cikel, v katerem je fluorescenca preseгла prazno fluorescenco. Na vsaki ploščici smo pripravili umeritveno krivuljo z znanimi koncentracijami standardov, s pomočjo katerih je LightCycler 480 Software release 15.1.62 SP3 določil koncentracije za tri tehnične ponovitve (z metodo maksimuma drugega odvoda, angl. Abs. Qant. / 2nd Derivative Max), njihovo povprečno koncentracijo in standardno deviacijo. Če je katera paralela zelo odstopala, smo jo odstranili. Enako smo naredili za naš »hišni« gen, ki je bil *GAPDH*, in smo ga izbrali na podlagi predhodnega testiranja 6 različnih genov: *GAPDH*, *RPLP0*, *GUSB*, *B2M*, *ACTB* in *TBP* na manjši podskupini vzorcev. S pomočjo programa Normfinder smo določili najbolj optimalen gen, kjer so bile razlike med preiskovanima skupinama (restenoza da/ne) najmanjše. Rezultate smo normalizirali tako, da smo povprečne koncentracije treh (ali dveh) ponovitev preiskovanega gena delili s povprečnimi koncentracijami treh (ali dveh) ponovitev »hišnega gena« istega bolnika.

Rezultate smo obdelali s programom IBM SPSS Statistics (Version 22). Pri spremenljivki *NR4A2* smo pri pregledu histograma ugotovili, da ima veliko podatkov vrednost nič oziroma blizu 0, medtem ko so ostali podatki porazdeljeni podobno kot pri ostalih genih. Te nizke vrednosti so bile posledica rahlo zaznavne fluorescence v 45 ciklu, katerim je bila vsem dodeljena enotna vrednost povprečne koncentracije 0,125. Ker so rezultati v tako

pozmem ciklu nezanesljivi in ker smo zaradi teh vrednosti dobili krivuljo, ki je nakazovala bimodalno porazdelitev in bi nam onemogočala pravilno sklepanje s klasičnimi statističnimi testi, smo te vrednosti odstranili (20 vzorcev). Opazili smo tudi, da imamo pri skoraj vseh genih nekaj ekstremnih statističnih osamelcev, za katere smo sklepali, da niso posledica bioloških razlik, temveč napak pri merjenju izražanja gena. Te smo zato pred nadaljnjo statistično obdelavo izločili po naslednjih kriterijih.

Najprej smo z *Enačbo 3* določili interkvartilni razmik (IQR).

$$\text{IQR} = Q_3 - Q_1$$

*Enačba 3*: Določitev interkvartilnega razmika (IQR);  $Q_3$  = tretji kvartil,  $Q_1$  = prvi kvartil.

S pomočjo tega smo določili osamelce, in sicer je bil za nas podatek ( $x$ ) osamelec, če je veljalo naslednje:

$$x > Q_3 + 3 \times \text{IQR}$$

in teoretično tudi  $x < Q_1 - 3 \times \text{IQR}$ , vendar takih podatkov nismo imeli. Skupno je to pomenilo, da smo odstranili 19 meritev. Ker smo rezultate normalizirali na gen *GAPDH*, smo se s tem znebili še drugih napak tekom izolacije RNA in prepisa v cDNA (neustrezna koncentracija redčene RNA, slabši RIN ipd.).

Podatke smo testirali z neparametričnimi testi Mann-U-Whitney, Wilcoxonov test predznačnih rangov za parne vzorce in neparametrično ANOVO. Kot stopnjo tveganja smo upoštevali  $\alpha = 0,05$ , zato so kot statistično značilne vrednosti veljale  $p < 0,05$ .

## 4 REZULTATI

### 4.1 Uspešnost PTA

V raziskavo smo vključili 126 bolnikov z opravljeno PTA. Število restenoz po posegu v roku enega leta je navedeno v Preglednici XI.

Preglednica XI: Rezultati ultrazvočnih preiskav. Prikazano je število restenoz ali prehodnih arterij po vsakem pregledu in delež restenoze.

Čas spremljanja (mesece)	Restenoza (n)	Prehodna arterija (n)	Skupaj (n)	Delež restenoze (%)
1	16	110	126	13
6	51	74	125	41
12	72	53	125	58

Po prvem mesecu je bila povprečna starost bolnikov z restenozo  $67 \pm 7$  let in bolnikov s prehodnimi arterijami  $66 \pm 10$  let. Po šestih mesecih je bila povprečna starost bolnikov z restenozo  $67 \pm 9$  let ter bolnikov s prehodnimi arterijami  $67 \pm 9$  let. Po enem letu je bila povprečna starost bolnikov z restenozo  $66 \pm 9$  let in bolnikov s prehodnimi arterijami  $67 \pm 10$  let. Obe skupini (bolniki z restenozo in bolniki s prehodnimi arterijami) sta bili ves čas uravnoteženi po spolu in starosti ( $p > 0,05$ ).

### 4.2 Vpliv PTA na izražanje genov

Po PTA se je izražanje genov *PECAMI* in *IL1B* statistično pomembno povečalo, medtem ko se je izražanje gena *IL6* pomembno zmanjšalo. PTA ni vplivala na izražanje drugih preiskovanih genov (Preglednica XII).

Preglednica XII: Izražanje genov pred in po PTA. Prikazane so mediane (1.–3. kvartil), število vzorcev pred in po PTA ter p vrednosti za Wilcoxonov test predznačnih rangov.

	Pred PTA	Po PTA	Število vzorcev (n)	Wilcoxonov test (p)
<i>PECAMI</i>	0,94 (0,84–1,05)	0,98 (0,86–1,15)	116	< 0,01
<i>IL6</i>	0,84 (0,51–1,20)	0,69 (0,44–1,05)	114	0,02
<i>IL1B</i>	0,84 (0,68–1,00)	0,92 (0,81–1,09)	115	< 0,01
<i>NR4A2</i>	5,06 (3,04–8,51)	4,76 (2,25–8,16)	113	0,73
<i>miR568</i>	1,26 (0,97–1,61)	1,27 (0,86–1,76)	115	0,81

### 4.3 Povezava med izražanjem genov pred in po PTA ter restenozo

Da bi ugotovili, ali je zgoraj pokazano spremenjeno izražanje genov po PTA povezano z razvojem restenoze, smo naredili Wilcoxonov test predznačnih rangov posebej pri bolnikih, ki so po enem, šestih ali dvanajstih mesecih po posegu razvili restenozo, in bolnikih, ki so v tem času ohranili prehodne arterije. Statistično pomembne razlike smo pri vseh treh genih (*PECAMI1*, *IL6*, *IL1B*) dokazali pri bolnikih s ohranjenimi prehodnimi arterijami, pri bolnikih z restenozo šest in dvanajst mesecev po posegu pa le spremenjeno izražanje gena *IL1B* (Preglednice XIII, XIV in XV).

Preglednica XIII: Izražanje genov pri bolnikih z restenozo 1 mesec po PTA in bolnikih s prehodnimi arterijami. Prikazane so mediane (1.–3. kvartil) in p vrednosti za Wilcoxonov test predznačnih rangov.

	Restenoza			Prehodne arterije		
	Pred PTA	Po PTA	p	Pred PTA	Po PTA	p
<i>PECAMI1</i>	0,95 (0,85-1,03)	0,92 (0,79-1,03)	0,50	0,94 (0,84-1,05)	0,99 (0,87-1,16)	<0,01
<i>IL6</i>	1,14 (0,53-1,52)	0,70 (0,44-1,27)	0,95	0,83 (0,51-1,13)	0,69 (0,44-1,05)	0,01
<i>IL1B</i>	0,73 (0,72-0,92)	0,82 (0,69-0,97)	0,34	0,85 (0,67-1,00)	0,92 (0,81-1,10)	<0,01
<i>NR4A2</i>	4,11 (2,65-7,39)	2,84 (1,18-4,70)	0,64	5,23 (3,32-8,59)	5,23 (2,38-8,24)	0,79
<i>miR568</i>	1,49 (1,08-1,70)	1,45 (0,94-1,96)	0,76	1,23 (0,96-1,56)	1,26 (0,88-1,72)	0,91

Preglednica XIV: Izražanje genov pri bolnikih z restenozo 6 mesecev po PTA in bolnikih s prehodnimi arterijami. Prikazane so mediane (1.–3. kvartil) in p vrednosti za Wilcoxonov test predznačnih rangov.

	Restenoza			Prehodne arterije		
	Pred PTA	Po PTA	p	Pred PTA	Po PTA	p
<i>PECAMI1</i>	1,00 (0,87-1,09)	0,98 (0,83-1,17)	0,35	0,90 (0,83-1,01)	0,98 (0,88-1,08)	<0,01
<i>IL6</i>	0,86 (0,54-1,32)	0,70 (0,46-1,04)	0,33	0,83 (0,49-1,12)	0,69 (0,42-1,05)	0,04
<i>IL1B</i>	0,80 (0,68-1,02)	0,90 (0,78-1,03)	0,01	0,85 (0,68-0,98)	0,93 (0,82-1,17)	<0,01
<i>NR4A2</i>	4,42 (2,72-8,54)	4,20 (1,52-7,42)	0,58	5,96 (3,50-8,48)	5,26 (2,40-8,23)	0,90
<i>miR568</i>	1,38 (1,01-1,66)	1,29 (0,94-1,86)	0,52	1,20 (0,91-1,46)	1,24 (0,88-1,67)	0,71

Preglednica XV: Izražanje genov pri bolnikih z restenozo 12 mesecev po PTA in bolnikih s prehodnimi arterijami. Prikazane so mediane (1.–3. kvartil) in p vrednosti za Wilcoxonov test predznačnih rangov.

	Restenoza			Prehodne arterije		
	Pred PTA	Po PTA	p	Pred PTA	Po PTA	p
<i>PECAMI1</i>	0,97 (0,85-1,09)	0,98 (0,84-1,17)	0,15	0,91 (0,83-1,00)	0,98 (0,87-1,10)	<0,01
<i>IL6</i>	0,84 (0,53-1,34)	0,70 (0,46-1,05)	0,31	0,87 (0,50-1,12)	0,69 (0,42-1,04)	0,03
<i>IL1B</i>	0,83 (0,69-1,01)	0,91 (0,79-1,07)	<0,01	0,85 (0,67-0,98)	0,93 (0,82-1,11)	<0,01
<i>NR4A2</i>	4,84 (2,95-8,52)	4,32 (2,24-7,61)	0,46	5,65 (3,13-8,32)	5,33 (2,26-8,21)	0,61
<i>miR568</i>	1,24 (0,98-1,63)	1,27 (0,81-1,81)	0,72	1,25 (0,95-1,46)	1,27 (0,91-1,65)	0,70



#### 4.4 Povezava izražanja genov s tveganjem za pojav restenoze

Z Mann-U-Whitneyevim testom za dva neodvisna vzorca smo testirali, ali obstaja povezava med izražanjem gena in pojavom restenoze po enem, šestih ali dvanajstih mesecih po opravljeni PTA. Statistično pomembno razliko smo opazili le pri izražanju gena *PECAMI* pred posegom pri bolnikih, ki so razvili restenozo šest mesecev po posegu (Preglednice XVI, XVII in XVIII).

Preglednica XVI: Povezanost izražanja genov z razvojem restenoze 1 mesec po PTA. Prikazane so mediane (1.–3. kvartil) in p vrednosti Mann-U-Whitneyevega testa.

	Pred PTA			Po PTA		
	Restenoza	Prehodne arterije	p	Restenoza	Prehodne arterije	p
<i>PECAMI</i>	0,95 (0,85-1,03)	0,94 (0,84-1,05)	0,75	0,92 (0,79-1,03)	0,99 (0,87-1,16)	0,14
<i>IL6</i>	1,14 (0,53-1,52)	0,83 (0,51-1,13)	0,36	0,70 (0,44-1,27)	0,69 (0,44-1,05)	0,61
<i>IL1B</i>	0,73 (0,72-0,92)	0,85 (0,67-1,00)	0,39	0,82 (0,69-0,97)	0,92 (0,81-1,10)	0,11
<i>NR4A2</i>	4,11 (2,65-7,39)	5,23 (3,32-8,59)	0,37	2,84 (1,18-4,70)	5,23 (2,38-8,24)	0,09
<i>miR568</i>	1,49 (1,08-1,70)	1,23 (0,96-1,56)	0,21	1,45 (0,94-1,96)	1,26 (0,88-1,72)	0,74

Preglednica XVII: Povezanost izražanja genov z razvojem restenoze 6 mesecev po PTA. Prikazane so mediane (1.–3. kvartil) in p vrednosti Mann-U-Whitneyevega testa.

	Pred PTA			Po PTA		
	Restenoza	Prehodne arterije	p	Restenoza	Prehodne arterije	p
<i>PECAMI</i>	1,00 (0,87-1,09)	0,90 (0,83-1,01)	<b>0,04</b>	0,98 (0,83-1,17)	0,98 (0,88-1,08)	0,74
<i>IL6</i>	0,86 (0,54-1,32)	0,83 (0,49-1,12)	0,45	0,70 (0,46-1,04)	0,69 (0,42-1,05)	0,73
<i>IL1B</i>	0,80 (0,68-1,02)	0,85 (0,68-0,98)	0,79	0,90 (0,78-1,03)	0,93 (0,82-1,17)	0,10
<i>NR4A2</i>	4,42 (2,72-8,54)	5,96 (3,50-8,48)	0,38	4,20 (1,52-7,42)	5,26 (2,40-8,23)	0,36
<i>miR568</i>	1,38 (1,01-1,66)	1,20 (0,91-1,46)	0,09	1,29 (0,94-1,86)	1,24 (0,88-1,67)	0,61

Preglednica XVIII: Povezanost izražanja genov z razvojem restenoze 12 mesecev po PTA. Prikazane so mediane (1.–3. kvartil) in p vrednosti Mann-U-Whitneyevega testa.

	Pred PTA			Po PTA		
	Restenoza	Prehodne arterije	p	Restenoza	Prehodne arterije	p
<i>PECAMI</i>	0,97 (0,85-1,09)	0,91 (0,83-1,00)	0,08	0,98 (0,84-1,17)	0,98 (0,87-1,10)	0,81
<i>IL6</i>	0,84 (0,53-1,34)	0,87 (0,50-1,11)	0,44	0,70 (0,46-1,05)	0,69 (0,42-1,04)	0,56
<i>IL1B</i>	0,83 (0,69-1,01)	0,85 (0,67-0,98)	0,92	0,91 (0,79-1,07)	0,93 (0,82-1,11)	0,29
<i>NR4A2</i>	4,84 (2,95-8,52)	5,65 (3,13-8,32)	0,96	4,32 (2,24-7,61)	5,33 (2,26-8,21)	0,64
<i>miR568</i>	1,24 (0,98-1,63)	1,25 (0,95-1,46)	0,49	1,27 (0,81-1,81)	1,27 (0,91-1,65)	0,89

Kot je razvidno iz Preglednice XVII, je pri bolnikih, ki so po šestih mesecih od PTA razvili restenozo, koncentracija *PECAMI* pred posegom pomembno višja kot v skupini s prehodnimi arterijami. Razmejitvena vrednost in razmerje obetov sta prikazana v Preglednici XIX.

Preglednica XIX: Ocena tveganja za razvoj restenozе šest mesecev po posegu. Prikazani so: razmejitvena vrednost, razmerje obetov in 95-odstotni interval zaupanja.

Gen	Razmejitvena vrednost	Razmerje obetov	95-odstotni interval zaupanja
<i>PECAMI</i>	1,0066	2,78	1,29–5,98

#### 4.5 Povezava polimorfizmov z izražanjem gena

V zadnjem delu smo se lotili še iskanja povezav med genskimi spremembami (polimorfizmi) v genih *PECAMI*, *IL6* in *NR4A2* z izražanjem relevantnega gena. Bolnikov nismo več ločevali v dve skupini (skupina bolnikov z restenozo in skupina bolnikov s prehodnimi arterijami), ampak smo jih obravnavali skupno. Uporabili smo Kruskal-Wallisov test za neodvisne vzorce (neparametrična ANOVA). Nobeden od preučevanih polimorfizmov se ni povezoval z izražanjem relevantnih genov (Preglednica XX).

Preglednica XX: Povezanost polimorfizmov z izražanjem relevantnega gena. Prikazane so: genske spremembe, genotipi s pripadajočim številom bolnikov in p vrednosti Kruskal-Wallisovega testa.

Gen	Polimorfizem	Genotip	Število bolnikov (n)	p	
				Pred PTA	Po PTA
<i>NR4A2</i>	rs12803	TT	106	0,64	0,30
		TA	18		
		AA	0		
	rs146608	TT	93	0,81	0,30
		TC	25		
		CC	6		
rs13428968	GG	37	0,70	0,28	
	GT	55			
	TT	32			
<i>IL6</i>	rs10499563	TT	89	0,97	0,85
		TC	29		
		CC	6		
<i>PECAMI</i>	rs668	GG	40	0,65	0,33
		GC	48		
		CC	36		
	rs12953	AA	46	0,30	0,46
		AG	57		
		GG	21		

## 5 RAZPRAVA

Patofiziološki mehanizem procesa restenoze po PTA je kompleksen in še vedno ne v celoti pojasnjen. Z namenom, da bi odkrili potencialne dejavnike, ki sodelujejo v tem procesu ali vplivajo nanj, smo preučevali izražanje genov *PECAMI*, *IL6*, *IL1B*, *NR4A2* in *miR568*. Ugotovili smo, da PTA poveča izražanje genov *PECAMI* ter *IL1B* in zmanjša izražanje gena *IL6*. Izražanje gena *PECAMI* pred PTA je bilo pomembno višje pri bolnikih z restenozo 6 mesecev po posegu v primerjavi z bolniki s prehodnimi arterijami, medtem ko se izražanje preostalih genov med skupinama ni razlikovalo. Nobeden od preučevanih polimorfizmov ni bil v povezavi z izražanjem relevantnega gena.

V prvem delu analize smo želeli preveriti, ali poseg spremeni izražanje izbranih genov. Uporabili smo Wilcoxonov test predznačnih rangov, s katerim smo dokazali statistično pomembno povečano izražanje ( $p < 0,05$ ) genov *PECAMI* in *IL1B* ter statistično pomembno zmanjšano izražanje gena *IL6*. Dodatno smo preverili, ali PTA enako vpliva na izražanje genov v skupini bolnikov z restenozo in v skupini bolnikov s prehodnimi arterijami. Skupini bolnikov z restenozo in tistih s prehodnimi arterijami sta bili po vsaki časovni točki uravnoveženi po spolu in starosti, kar nam je omogočilo, da smo statistična sklepanja glede na dejavnika tveganja spol in starost ob posegu podajali nepristransko. Ugotovili smo, da je prišlo do spremenjenega izražanja vseh treh genov (*PECAMI*, *IL1B*, *IL6*) zgolj pri bolnikih, ki so ohranili prehodne arterije, medtem ko je pri bolnikih, ki so po šestih ali dvanajstih mesecih po PTA razvili restenozo, prišlo do statistično pomembno povečanega izražanja samo gena *IL1B*. Dobljeni rezultati nakazujejo na obstoj določenih molekularnih mehanizmov, ki vplivajo na spremenjeno izražanje genov pri bolnikih s prehodnimi arterijami, ne pa tudi pri bolnikih z restenozo, in s tem vpletenost teh molekul pri trans-diferenciaciji žilnih gladkomišičnih celic, pri čemer pride do spremembe iz njihove normalne, pretežno kontraktilne funkcije v sekretorno/proliferativno stanje, za kar je znano, da igra pomembno vlogo v razvoju aterosklerotične lezije in razvoju restenoze po angioplastiki (76). Spremembe v izražanju proteinov IL-1 $\beta$ , IL-6 ter drugih vnetnih mediatorjev so preučevali tudi v drugih raziskavah, kjer so želeli ugotoviti povezavo med izražanjem teh mediatorjev z revaskularizacijskim posegom in restenozo ter ugotoviti njihovo potencialno napovedno vrednost. Guimaraes je s sodelavci v svoji raziskavi na 27 bolnikih, ki so jim opravili PTA femoropoplitealne arterije z vstavitvijo žilne opornice, ugotovil, da je v 24 urah in 6 mesecev po posegu v krvi prišlo do signifikantno

zmanjšane izražanje proteinov IL-1 $\beta$  in IL-6 glede na stanje pred posegom, pri čemer pa mu nobenega od preučevanih citokinov ni uspelo povezati z restenozo (77). Podobno je v svoji raziskavi preučeval tudi Hage s sodelavci, v kateri je želel ugotoviti, ali lahko vnetni označevalci, med njimi sta bila tudi IL-1 $\beta$  in IL-6, služijo kot napovedni dejavnik za restenozo po perkutani koronarni intervenciji pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2, pri čemer pa niso pokazali pomembnih razlik v izražanju teh proteinov in se preučevani označevalci niso izkazali kot dober napovedni dejavnik (78).

Za gen *PECAMI* smo ugotovili, da se je po posegu povečano izražal zgolj pri bolnikih s prehodnimi arterijami. PECAM-1 ima vlogo v angiogenezi, funkciji trombocitov, v odzivu endotelijskih celic na strižne sile in v regulaciji migracije levkocitov skozi žilno steno (79, 80). Za PECAM-1 je znano, da regulira tudi aktivnost endotelijske NO sintaze (81), s čimer vpliva na žilno remodelacijo. Podobnih raziskav, ki bi merile izražanje gena *PECAMI* po PTA, ni. Nakazawa s sodelavci je na živalskem modelu meril količino PECAM-1 po vstavitvi žilne opornice, pri čemer pa je dokazal, da koncentracija PECAM-1 po posegu narašča; hkrati je zmanjšano izražanje te molekule povezal s slabšo funkcionalnostjo in manj ustreznim okrevanjem endotelija (82). V drugi raziskavi so merili koncentracijo PECAM-1 po perkutani transluminalni koronarni angioplastiki (PTCA) pri bolnikih z miokardnim infarktom, pri čemer pa v primerjavi z zdravimi prostovoljci niso opazili spremenjenega izražanja po posegu (83). Rezultati te raziskave temeljijo zgolj na 10 vzorcih, vendar se skladajo z rezultati naše raziskave, saj tudi mi nismo opazili razlik med skupinama v izražanju gena *PECAMI* po posegu. Ugotovili pa smo povečano izražanje tega gena pri bolnikih z restenozo pred posegom. Pri bolnikih z restenozo en mesec po posegu teh razlik še ni bilo, pri šestih mesecih je bilo izražanje povečano in pri dvanajstih mesecih smo dobili mejno značilen rezultat ( $p = 0,08$ ). Dobljeni rezultati odpirajo vprašanje pomembnosti časovne komponente, ki povezuje vnetje in preučevane vnetne mediatorje s procesom restenoze. Vzroki za nekonsistentnost razlik v izražanju gena so morda v tem, da en mesec po posegu vnetje še ni odgovorno za razvoj restenoze, po dvanajstih mesecih pa morda vlogo v procesu vnetja začnejo prevzemati drugi vnetni mediatorji, ki jih v naši raziskavi nismo preučevali.

Za gen *IL1B* smo ugotovili, da se je po posegu povečano izražal pri vseh bolnikih. Ta gen, ki kodira citokin IL-1 $\beta$ , naj bi sodeloval pri sprožitvi aktivacije gladkomišičnih celic in transformaciji levkocitov, kar vpliva na nastanek restenoze (84). Raziskava, ki jo je opravil

Schulze s sodelavci, je dokazala, da je bila v 48 urah po PTCA z vstavitvijo žilne opornice koncentracija IL-1 $\beta$  pomembno višja pri tistih, ki so kasneje razvili restenozo, medtem ko je v kontrolni skupini brez restenoze prišlo do padca koncentracije tega proteina v serumu. V raziskavi so zato zaključili, da je lahko merjenje koncentracije IL-1 $\beta$  po posegu dober napovedni dejavnik za razvoj restenoze (85). Podobno je Tashiro s sodelavci v svoji raziskavi, kjer so preučevali plazemske koncentracije določenih citokinov 3–6 mesecev po PTCA, ugotovil, da se je IL-1 $\beta$  pomembno povečal v skupini bolnikov z restenozo, medtem ko v kontrolni skupini ni prišlo do razlik v izražanju (86). Vzrok za drugačna opažanja je lahko v tem, da so ostali merili koncentracijo proteina in ne izražanja genov. Vemo namreč, da količina nastalega proteina iz mRNA nujno ne korelira njeni količini, saj so na poti od gena do proteina vpleteni številni dejavniki. Zaradi tega je mogoče, da tudi pri nas ugotovljeno povečano izražanje gena v resnici ne vodi tudi v povečano količino proteina in na izražanje vplivajo druge, potencialno vpletene molekule, od mikro RNA do drugih protivnetnih citokinov, ki zavrejo njegovo sintezo. Na živalskem modelu je Wang s sodelavci meril izražanje mRNA za IL-1 $\beta$  v karotidni arteriji miši po balonski angioplastiki, pri čemer je ugotovil, da pride v 6 urah po posegu do izrazito povečanega izražanja tega gena, ki pa se 24 ur po posegu normalizira na bazalno raven (84). Ti rezultati se načeloma skladajo z našimi, saj smo tudi mi dokazali povečano izražanje tega gena neposredno po posegu; ker pa smo merili izražanje le v eni časovni točki, ne vemo, kaj se dogaja z izražanjem tega gena po 6 ali 24 urah. Izjema v primerjavi s to ugotovitvijo je restenozo en mesec po posegu, kjer nismo dokazali povečanega izražanja *IL1B*. Vzrok za to je lahko nezanesljivost določitve, saj smo imeli za to skupino zelo majhen vzorec, in sicer samo 12 bolnikov. Možno je, da bi na večjem vzorcu tudi v tem primeru dokazali povečano izražanje, kar bi sovpadalo z rezultati raziskave Wanga s sodelavci, v kateri je dokazal splošno povečanje izražanja gena *IL1B*, ne glede na to, ali pozneje pride do restenoze ali ne.

Za gen *IL6* smo dokazali, da je pri bolnikih, ki v roku enega leta po posegu niso razvili restenoze, prišlo do zmanjšane izražanja tega gena neposredno po posegu, medtem ko se pri bolnikih z restenozo izražanje ni spremenilo. IL-6 velja za enega glavnih induktorjev proteinov akutne faze in drugih citokinov ter rastnih dejavnikov, imel pa naj bi tudi prokoagulantne lastnosti in mitogeno aktivnost za gladkomišične celice, kar lahko igra kritično vlogo v razvoju restenoze (41, 42). Hoyo s sodelavci je meril koncentracijo IL-6 v krvi koronarnega sinusa po opravljeni PTCA. Pri tem so ugotovili, da se je koncentracija

IL-6 po posegu močno povečala, uspelo pa jim je pokazati tudi pozitivno korelacijo med povečano koncentracijo IL-6 in izgubo žilnega lumna šest mesecev po posegu. Prav tako so ugotovili, da so bile vrednosti IL-6 pri bolnikih, ki so takrat razvili restenozo, pomembno višje kot pri bolnikih, ki je niso razvili (87). Podobno je Danielsson s sodelavci v svoji raziskavi ugotovil povišane vrednosti IL-6 po PTA pri bolnikih s PAB, in sicer 6 ur po posegu (88). Parmar je s sodelavci preučeval izražanje citokinov pri bolnikih, ki so jim opravili PTA spodnjih udov ali le angiografijo. Pri tem je ugotovil, da je v roku 24 ur po posegu prišlo do statistično pomembnega povečanja koncentracije IL-6 pri bolnikih, ki so imeli opravljeno PTA, v primerjavi s tistimi z angiografijo (89). Ikeda s sodelavci je v svoji raziskavi poročal o večjem deležu restenoze po perkutani koronarni intervenciji pri bolnikih z večjimi koncentracijami IL-6 kot pri tistih z nižjimi (90). To nakazuje, da bi IL-6 lahko bil potencialni označevalec restenoze, vsaj po PTCA, kjer so povezavo že večkrat dokazali v raziskavah. Izsledki naše raziskave se, če koreliramo količino mRNA s količino proteina, ne ujemajo, za kar je lahko vzrok v tem, da so bile koncentracije proteinov v teh raziskavah merjene v drugih časovnih točkah (6 ur po posegu ali kasneje) in so zato rezultati težko primerljivi. Povečana koncentracija proteina je bila lahko posledica povečanega izražanja gena ali pa je bila morda le posledica sprostitve tega proteina iz celic zaradi poškodbe tkiva ob posegu. V naši raziskavi smo dokazali zmanjšano izražanje gena samo v skupini s prehodnimi arterijami. Ti izsledki bi lahko imeli pomembno terapevtsko vrednost, če bi se izkazalo, da je zmanjšano izražanje gena *IL6* res odgovorno za manjšo pogostost zapletov po posegu. Na podobno vpletenost proinflammatoryh citokinov in drugih rastnih dejavnikov ciljajo tudi novejša metode zdravljenja, kjer bolnikom po PTA namesto klasične žilne opornice vstavijo opornico s sproščujočo učinkovino (npr. everolimus, deksametazon, paklitaksel), ki zavira nastanek provnetnih citokinov in/ali celično proliferacijo. Na podlagi rezultatov teh raziskav so že uspeli povezati manjšo pogostnost zapletov po posegu z uporabo žilnih opornic s sproščujočo učinkovino (91, 92).

Gen *NR4A2* se je enako izražal pred in po PTA pri obeh skupinah bolnikov. Rezultati teh analiz niso popolnoma zanesljivi, saj smo tekom merjenja izražanja gena s qPCR naleteli na nekaj težav. Uporabili smo oligonukleotidne začetnike, ki so jih preizkusili v istem laboratoriju v pilotski raziskavi v letu 2008. Izbrali so jih na podlagi članka, ki ga je objavil Bonte s sodelavci (53). Kvantifikacijski cikel za ta gen je bil zelo pozen, v povprečju je bil to 35.–45. cikel ( $Ct = 35-45$ ), kar vpliva na zanesljivost določitve. Predvidevamo, da je vzrok najverjetneje v uporabljenih oligonukleotidnih začetnikih, ki so se morda slabo

vezali na komplementarne odseke matične cDNA, ali pa smo imeli prenizke koncentracije cDNA za detekcijo. Tudi v pilotski raziskavi so bili kvantifikacijski cikli zelo pozni, podobno pa so imeli težave tudi pri določitvi umeritvene krivulje. Zaradi tega smo morali izločiti 20 rezultatov, s čimer se je statistična moč testa zmanjšala.

Gen *miR568* se je izražal enako pred in po PTA v obeh skupinah bolnikov. Vloga *miR568* v povezavi s PTA še ni bila preučevana, izražanje te miRNA pa bi lahko vplivalo na izražanje številnih drugih regulatorjev procesa vnetja in napredovanja aterosklerotične bolezni, česar pa v naši raziskavi nismo mogli potrditi.

V drugem delu nas je zanimalo, ali lahko na podlagi izražanja genov pred in po PTA napovemo tveganje za razvoj restenoze. V ta namen smo podatke testirali z neparametričnim Mann-U-Whitneyevim testom za dva neodvisna vzorca. Ugotovili smo, da se izražanje gena *PECAMI* pred PTA povezuje s pogostnostjo restenoze šest mesecev po posegu. Pri razmejitveni vrednosti nad 1,0066 je bilo tveganje za restenozo skoraj 3x večje kot pod to razmejitveno vrednostjo. V dosedanjih raziskavah še niso povezovali izražanja tega gena pred posegom s tveganjem za restenozo, so pa opisovali njegovo vpletenost pri nastanku aterosklerotičnih lezij. Bonta s sodelavci je dokazal močno povezavo med *NR4A2* haplotipom in razvojem restenoze po vstavitvi žilne opornice pri perkutani koronarni intervenciji. Hkrati so v tej raziskavi dokazali izražanje proteina NR4A2 v restenoznih lezijah, prikazali njegovo protivnetno in antiproliferativno funkcijo v kultiviranih humanih gladkomišičnih celicah ter na živalskem modelu pokazali njegovo zaščitno vlogo pri nastanku z gladkomišičnimi celicami bogatimi lezijami po poškodbi arterije (53). Rezultati naše raziskave dokazujejo nasprotno, saj smo ugotovili povečano izražanje gena za NR4A2 pri bolnikih, ki bodo razvili restenozo, s čimer namigujemo na njegovo provnetno funkcijo v samem procesu restenoze. Vzroki za nasprotujoče si sklepanje o vpletenosti tega gena oziroma proteina v sam proces so lahko v tem, da smo v naši raziskavi merili izražanje gena v levkocitih, medtem ko so v zgornji raziskavi opazovali njegovo vlogo neposredno v gladkomišičnih celicah lezije. Za ta protein vemo, da uravnava izražanje drugih genov, s čimer lahko preko različnih poti posreduje različne učinke v različnih celicah oziroma tkivih. Možno je, da v levkocitih preko aktivacije določenih drugih poti povzroči povečan odziv telesa na poškodbo arterije pri posegu, s čimer pa posredno poveča tveganje za nastanek restenoze. Prav tako bi lahko bila ugotovljena povezava zgolj naključna, saj smo dobili precej mejni rezultat ( $p = 0,04$ ),

hkrati pa smo že poudarili možnost nezanesljivosti določitve izražanja tega gena zaradi težav pri izvedbi qPCR. Izražanje drugih preučevanih genov se ni povezovalo s pogostostjo restenoze. Možno je, da povezave v resnici ne obstajajo, lahko pa je bil problem v zasnovanosti analize. Bolniki, vključeni v našo raziskavo, imajo lahko druge pridružene bolezni, ki bi potencialno lahko vplivale na raven preučevanih kazalcev, ki pa jih v analizi nismo upoštevali. Če bi imeli razen starosti še druge podatke o bolnikih, bi morda lahko povečali moč testa s parjenjem podatkov. Namesto osnovnega neparnege neparometričnega testa bi uporabili parni test, ki ima večjo moč. Na moč testa vpliva tudi neenakomernost preiskovanih skupin, zato bi morda v nekaterih primerih (restenoza en mesec po posegu) potrebovali večji vzorec bolnikov z restenozo. Pomagalo bi lahko tudi določanje izražanja izbranih genov v več točkah po operaciji – merili smo ga namreč le v 2 točkah (dan pred in neposredno po PTA) – s čimer bi pridobili širšo sliko dogajanja in spreminjanja izražanja genov.

V zadnjem delu analize smo iskali še povezave polimorfizmov v izbranih genih z izražanjem relevantnega gena. Preučevali smo vpliv polimorfizmov rs12803, rs146608 in rs13428968 v genu *NR4A2*, rs668 in rs12953 v genu *PECAM1* ter rs10499563 v genu *IL6*. Na podlagi rezultatov nismo uspeli dokazati nobene povezave med polimorfizmi in izražanjem relevantnih genov. Tudi druge raziskave so preučevale vpliv teh polimorfizmov, vendar so večinoma merili koncentracijo nastalih topnih proteinov v serumu. Song je s sodelavci v raziskavi dokazal, da imajo nosilci Val/Val genotipa pri polimorfizmu rs668 višje plazemske koncentracije PECAM-1 kot tisti z Leu/Leu ali Leu/Val genotipom (93). Nasprotno Završnik s sodelavci, ki je preučeval serumske vrednosti PECAM-1 pri diabetikih z diabetično nefropatijo, ni našel povezav med polimorfizmom in količino topnega proteina (94). Koncentracijo PECAM-1 so pri bolnikih z revmatoidnim artritisom povezali z določenim genotipom rs12953 polimorfizma (95), pri bolnikih po obvodu koronarne arterije pa so polimorfizem rs10499563 z genotipom TT povezali z višjimi plazemskimi koncentracijami IL-6 (44).



## 6 SKLEP

V raziskavi smo dokazali, da PTA poveča izražanje genov *PECAMI* in *IL1B* ter zmanjša izražanje gena *IL6*. Spremenjeno izražanje vseh treh genov je značilno samo za bolnike s prehodnimi arterijami v roku enega leta po posegu. V skupini z restenozo smo dokazali spremenjeno izražanje samo gena *IL1B*, in sicer pri bolnikih, ki so v roku 6 ali 12 mesecev po posegu razvili restenozo. Pri iskanju razlik v izražanju preučevanih genov med skupinama bolnikov z restenozo in tistih s prehodnimi arterijami smo pozitiven rezultat dobili samo pri izražanju gena *PECAMI* pred posegom, kjer so bolniki v roku 6 mesecev po posegu razvili restenozo. Za oceno tveganja smo določili mejno vrednost izražanja, ki je znašala 1,0066. Razmerje obetov je pokazalo, da imajo bolniki, ki imajo pred posegom vrednost izražanja gena *PECAMI* nad 1,0066, skoraj 3x večje tveganje za razvoj restenoze 6 mesecev po posegu kot tisti, pri katerih je bil obseg izražanja *PECAMI* pod to mejno vrednostjo. V zadnjem delu, kjer smo preučevali vpliv polimorfizmov rs12803, rs146608 in rs13428968 v genu *NR4A2*, rs668 in rs12953 v genu *PECAMI* ter rs10499563 v genu *IL6*, nismo uspeli dokazati nobenega vpliva genotipa na izražanje relevantnih genov.

Upoštevajoč dejstvo, da gre za eno prvih raziskav, v okviru katere smo merili izražanje teh genov po posegu in jih povezovali z restenozo po PTA femoropoplitealne arterije, nam rezultati lahko služijo kot dobra usmeritev za nadaljnje raziskave. Zanimive ugotovitve pri bolnikih brez restenoze bi se lahko v prihodnosti izkazale za dober biološki označevalec pri ločevanju med tistimi z večjim in manjšim tveganjem za razvoj te komplikacije, hkrati pa bi mehanizmi, ki vplivajo na spremenjeno izražanje genov pri bolnikih s prehodnimi arterijami, ne pa tudi pri tistih z restenozo, lahko predstavljali celo tarčo za razvoj novih zdravil.

## 7 LITERATURA

1. Blinc A, Šurlan M, Ključevšek T, et al: Smernice za odkrivanje in zdravljenje periferne arterijske bolezni. *Zdrav Vestn.* 2004; 73: 673-80.
2. Blinc A, Kozak M, Šabovič M, et al: Priporočila za odkrivanje in zdravljenje periferne arterijske bolezni. *Zdrav Vestn.* 2017; 86: 158-74.
3. Poredoš Pavel, Poredoš Peter, Visnovič-Poredoš A: Pomen odkrivanja predkliničnih oblik ateroskleroze. *Zdrav Vestn.* 2006; 75: 475-81.
4. Blinc A, Gasparini A: Periferna arterijska bolezen nog, 1. ponatis, V skrbi za vaše zdravje, Krka, d. d., Novo mesto, 2008. Dostopno na:  
[http://www.krka.si/media/prk/dokumenti/0583\\_periferna\\_zilna\\_bolezen\\_nog.pdf](http://www.krka.si/media/prk/dokumenti/0583_periferna_zilna_bolezen_nog.pdf).
5. Norgren L, Hiatt W R, Dormandy J A, et al: Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg.* 2007 Jan; 45 Suppl S: S5-S67.
6. Norgren L, Hiatt W R, Dormandy J A, et al: The Next 10 years in the Management of Peripheral Artery Disease: Perspectives from The 'PAD 2009' Conference. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2010; 40: 375-380.
7. Velescu A, Clara A, Peñafiel J, et al: Peripheral Arterial Disease Incidence and Associated Risk Factors in a Mediterranean Population-based Cohort. The REGICOR Study. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2016; 51: 696-705.
8. Criqui M H, Langer R D, Fronek A, et al: Mortality over a period of 10 years in patients with peripheral arterial disease. *N Engl J Med.* 1992; 326: 381-386.
9. Knowles J W, Assimes T L, Li J, et al: Genetic Susceptibility to Peripheral Arterial Disease: A Dark Corner in Vascular Biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27: 2068-2078.
10. Kügler C FA, Rudofsky G: The challenges of treating peripheral arterial disease. *Vascular Medicine.* 2003; 8: 109-114.
11. Božič-Mijovski M, Boc V, Salapura V, et al: Is Restenosis/Reocclusion after Femoropopliteal Percutaneous Transluminal Angioplasty (PTA) the Consequence of Reduced Blood Flow, Inflammation, and/or Hemostasis Disturbances? *InTechOpen* 2015: <https://www.intechopen.com/books/thrombosis-atherosclerosis-and-atherothrombosis-new-insights-and-experimental-protocols/is-restenosis-reocclusion-after-femoropopliteal-percutaneous-transluminal-angioplasty-pta-the-conseq>.

12. Internetni vir: <https://www.kclj.si/dokumenti/0002a1-00043d.pdf>. Dostop: november 2017.
13. Internetni vir: <https://en.wikipedia.org/wiki/Angioplasty#/media/File:Angioplasty-scheme.svg>. Dostop: november 2017.
14. Internetni vir: <https://www.drmed.org/wp-content/uploads/2014/06/37-Perkutana-angioplastika.pdf>. Dostop: november 2017.
15. Matsi P J, Manninen H I, Vanninen R L, et al: Femoropopliteal Angioplasty in Patients with Claudication: Primary and Secondary Patency in 140 limbs with 1-3 year Follow-up. *Radiology*. 1994; 191: 727-733.
16. Salapura V, Kuhelj D, Popovič P, et al: Infrapopliteal run-off and the outcome of femoropopliteal percutaneous transluminal angioplasty. *VASA*. 2010; 39(2): 159-168.
17. Wildman R P, Muntner P, Chen J, et al: Relation of Inflammation to Peripheral Arterial Disease in the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2002. *Am J Cardiol*. 2005; 96: 1579-1583.
18. Bajrović F F, Šuput D: Temelji patološke fiziologije – ateroskleroza, 3. izdaja, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2014.
19. Glass C K, Witztum J L: Atherosclerosis: The Road Ahead. *Cell*. 2001; 104: 503-516.
20. Carmelli D, Fabsitz R R, Swan G E, et al: Contribution of Genetic and Environmental Influences to Ankle-Brachial Blood Pressure Index in the NHLBI Twin Study. *Am J Epidemiol*. 2000; 151: 452-458.
21. Kullo I J, Turner S T, Kardina S L R, et al: A genome-wide linkage scan for ankle-brachial index in African American and non-Hispanic white subjects participating in the GENOA study. *Atherosclerosis*. 2006; 187: 433-438.
22. Murabito J M, Guo C-Y, Fox C S, et al: Heritability of the Ankle-Brachial Index. The Framingham Offspring Study. *Am J Epidemiol*. 2006; 164: 963-968.
23. Hazarika S, Annex B H: Biomarkers and Genetics in Peripheral Artery Disease. *Clin Chem*. 2017; 63(1): 236-244.
24. Flex A, Gaetani E, Angelini F, et al: Pro-inflammatory genetic profiles in subjects with peripheral arterial occlusive disease and critical limb ischemia. *J Intern Med*. 2007; 262(1): 124-130.

25. Kullo I J, Leeper N J: The Genetic Basis of Peripheral Arterial Disease: Current Knowledge, Challenges, and Future Directions. *Circ Res.* 2015; 116: 1551-1560.
26. Danielsson P, Schatz P, Swartbol P, et al: Response of Inflammatory Markers to Balloon Angioplasty in Peripheral Arterial Occlusive Disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2000; 20: 550-555.
27. Marculescu R, Mlekusch W, Exner M, et al: Interleukin-1 cluster combined genotype and restenosis after balloon angioplasty. *Thromb Haemost.* 2003; 90: 491-500.
28. Exner M, Schillinger M, Minar E, et al: Interleukin-6 Promoter Genotype and Restenosis after Femoropopliteal Balloon Angioplasty: Initial Observations. *Radiology.* 2004; 231(3): 839-844.
29. Božič-Mijovski M, Bedenčič M, Stegnar M, et al: Nurr1 Haplotypes are Associated with Femoropopliteal Restenosis/Re-occlusion after Percutaneous Transluminal Angioplasty. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2012; 43: 337-338.
30. Vogel C, Marcotte E M: Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet.* 2012; 13(4): 227–232.
31. Kendrick N: A gene's mRNA level does not usually predict its protein level. Kendrick Laboratories, Inc. 2014.
32. Popović D, Nikolajević Starčević J, Šantl Letonja M, et al: PECAM-1 gene polymorphism (rs668) and subclinical markers of carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes mellitus. *Balkan J Med Genet.* 2016; 19(1): 63-70.
33. Gang L, Zong-Lin H, He-Gui D, et al: Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 gene 125C/G polymorphism is associated with deep vein thrombosis. *Molecular Medicine Reports.* 2015; 12: 2203-2210.
34. Internetni vir: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PECAM1>. Dostop: januar 2018.
35. Shalia K K, Mashru M R, Soneji S L, et al: Leucine125Valine (Leu125Val) Gene Polymorphism of Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1) and Myocardial Infarction in Indian Population. *Ind J Clin Biochem.* 2010; 25(3): 273-279.
36. Wei H, Fang L, Chowdhury S H, Gong, et al: Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 gene polymorphism and its soluble level are associated with severe

- coronary artery stenosis in Chinese Singaporean. *Clin Biochem.* 2004; 37(12): 1091-1097.
37. Fang L, Wei H, Chowdhury S H, et al: Association of Leu125Val polymorphism of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) gene & soluble level of PECAM-1 with coronary artery disease in Asian Indians. *Indian J Med Res.* 2005; 121(2): 92-99.
  38. Wei YS, Lan Y, Liu Y G, et al: Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 gene polymorphism and its soluble level are associated with ischemic stroke. *DNA Cell Biol.* 2009; 28(3): 151-158.
  39. Wen-Hsien L, Sin-Jhih H, Yeong-Seng Y, et al: Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 Gene Polymorphisms are Associated with Coronary Artery Lesions in the Chronic Stage of Kawasaki Disease. *Acta Cardiol Sin* 2017; 33(3): 273-284.
  40. Sasaoka T, Kimura A, Hohta S A, et al: Polymorphisms in the platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (pecam-1) gene, asn563ser and gly670arg, associated with myocardial infarction in the japanese. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 947: 259-269.
  41. Woods A, Brull D J, Humphries S E, et al: Genetics of inflammation and risk of coronary artery disease: the central role of interleukin-6. *European Heart Journal.* 2000; 21: 1574-1583.
  42. Reiss A B, Siegart N M, De Leon J: Interleukin-6 in atherosclerosis: atherogenic or atheroprotective? *Clinical Lipidology* 2017; 12(1): 14-23.
  43. Internetni vir: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL6>. Dostop: januar 2018.
  44. Smith A J P, D'Aiuto F, Palmén J, et al: Association of Serum Interleukin-6 Concentration with a Functional IL6 –6331T>C Polymorphism. *Clin Chem.* 2008; 54: 841-850.
  45. Flex A, Gaetani E, Pola R, et al: The –174 G/C Polymorphism of the Interleukin-6 Gene Promoter is Associated with Peripheral Artery Occlusive Disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2002; 24(3): 264-268.
  46. Isoda K, Ohsuzu F: The Effect of Interleukin—1 Receptor Antagonist on Arteries and Cholesterol Metabolism. *J Atheroscler Thromb.* 2006; 13(1): 21-30.
  47. Internetni vir: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3553>. Dostop: januar 2018.
  48. Dinarello C A, van der Meer M J W: Treating inflammation by blocking interleukin—1 in humans. *Semin Immunol.* 2013; 25(6): 469-484.

49. Van Tassel B W, Toldo S, Mezzaroma E, et al: Targeting Interleukin-1 in Heart Disease. *Circulation*. 2013; 128: 1910-1923.
50. Internetni vir: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL1B>. Dostop: januar 2018.
51. Tsimikas S, Duff G W, Berger P B, et al: Pro-Inflammatory Interleukin-1 Genotypes Potentiate the Risk of Coronary Artery Disease and Cardiovascular Events Mediated by Oxidized Phospholipids and Lipoprotein(a). *J Am Coll Cardiol*. 2014; 63(17): 1724-1734.
52. Kornman K S: Interleukin 1 genetics, inflammatory mechanisms, and nutrigenetic opportunities to modulate diseases of aging. *Am J Clin Nutr*. 2006; 83(2): 475S-483S.
53. Bonta P I, Pols T W, van Tiel C M, et al: Nuclear Receptor Nurr1 Is Expressed In and Is Associated With Human Restenosis and Inhibits Vascular Lesion Formation In Mice Involving Inhibition of Smooth Muscle Cell Proliferation and Inflammation. *Circulation*. 2010; 121(18): 2023-2032.
54. Safe S, Jin U-H, Morpurgo B, et al: Nuclear Receptor 4A (NR4A) Family – Orphans No More. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016; 157: 48-60.
55. Bonta P I, van Tiel C M, Vos M, et al: Nuclear Receptors Nur77, Nurr1, and NOR-1 Expressed in Atherosclerotic Lesion Macrophages Reduce Lipid Loading and Inflammatory Responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26(10): 2288-2294.
56. Internetni vir: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NR4A2>. Dostop: januar 2018.
57. Božič-Mijovski M, Bedenčič M, Stegnar M, et al: Nurr1 Haplotypes are Associated with Femoropopliteal Restenosis/Re-occlusion after Percutaneous Transluminal Angioplasty. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2012; 43: 337-338.
58. Internetni vir: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/693153>. Dostop: januar 2018.
59. Davis B N, Hata A: Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. *Cell Communication and Signaling*. 2009; 7: 18.
60. Ku-Chung C, Suh-Hang H J: MicroRNAs in atherosclerosis. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*. 2012; 28: 631-640.
61. Internetni vir: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR568>. Dostop: januar 2018.

62. Cakmak H A, Coskunpinar E, Ikitimur B, et al: The prognostic value of circulating microRNAs in heart failure: preliminary results from a genome-wide expression study. *J Cardiovasc Med.* 2015; 16(6): 431-437.
63. Ikitimur B, Cakmak H A, Coskunpinar E, et al: The relationship between circulating microRNAs and left ventricular mass in symptomatic heart failure patients with systolic dysfunction. *Kardiol Pol.* 2015; 73(9): 740-746.
64. Li W, Kong L B, Li J T, et al: MiR-568 inhibits the activation and function of CD4+ T cells and Treg cells by targeting NFAT5. *Int Immunol.* 2014; 26(5): 269-281.
65. Chen Y Q, Wang X X, Yao X M, et al: Abated microRNA-195 expression protected mesangial cells from apoptosis in early diabetic renal injury in mice. *J Nephrol.* 2012; 25(4): 566-576.
66. Fallah P, Amirizadeh N, Poopak B, et al: Expression pattern of key microRNAs in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Int J Lab Hematol.* 2015; 37(4): 560-568.
67. Internetni vir: [http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert\\_71/targetscan.cgi?mirg=hsa-miR-568](http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert_71/targetscan.cgi?mirg=hsa-miR-568). Dostop: junij 2018.
68. Božič-Mijovski M: Genetski kazalniki pri periferni arterijski bolezni. 6. JESENOVČEVI DNEVI, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2014: 84–91.
69. Internetni vir: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4342792>. Dostop: november 2017.
70. Internetni vir: [http://www.foodqualityandsafety.com/wp-content/uploads/springboard/image/FCU\\_JuneJuly\\_2010\\_pp21\\_t01\\_LG.jpg](http://www.foodqualityandsafety.com/wp-content/uploads/springboard/image/FCU_JuneJuly_2010_pp21_t01_LG.jpg). Dostop: november 2017.
71. Internetni vir: Agilent 2100 Bioanalyzer Expert User's Guide: [https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2946-90004\\_Vespucci\\_UG\\_eBook\\_\(NoSecPack\).pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2946-90004_Vespucci_UG_eBook_(NoSecPack).pdf). Dostop: november 2017.
72. Internetni vir: <https://www.agilent.com/cs/library/posters/Public/BioAnalyzer.PDF>. Dostop: november 2017.
73. Štrukelj B, Kos J: Biološka zdravila, Od gena do učinkovine, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007.
74. Černe D, Ostanek B: Biomedicinska analitika, Učbenik za študente laboratorijske biomedicine, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2012: 108–157.

75. Internetni vir: <http://www.sinobiological.com/taqman-probe-qpcr-method-cro-service.html>. Dostop: december 2017.
76. Keuylian Z, de Baaij J H, Gueguen M, et al: The Notch pathway attenuates interleukin 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ )-mediated induction of adenylyl cyclase 8 (AC8) expression during vascular smooth muscle cell (VSMC) trans-differentiation. *J Biol Chem*. 2012; 287(30): 24978-89.
77. Guimaraes T S, da Rocha L A, Becari C, et al: The Role of Interleukins and Inflammatory Markers in the Early Restenosis of Covered Stents in the Femoropopliteal Arterial Segment. *Ann Vasc Surg*. 2018; 50: 88-95.
78. Hage C, Grip L, Malmberg K, et al: The predictive value of inflammatory activity and markers of the adipo-insular axis on restenosis in patients with type 2 diabetes. *Diab Vasc Dis Res*. 2011; 8(2): 143-9.
79. Woodfin A, Voisin M-B, Nourshargh S: PECAM-1: A Multi-Functional Molecule in Inflammation and Vascular Biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27:2514-2523.
80. Chen Z, Tzima E: PECAM-1 Is Necessary for Flow-Induced Vascular Remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009; 29:1067-1073.
81. Tahir H, Bona-Casas C, Hoekstra A G: Modelling the Effect of a Functional Endothelium on the Development of In-Stent Restenosis. *PLoS ONE*. 2013; 8(6): e66138.
82. Nakazawa G, Granada J F, Alviar C L, et al: Anti-CD34 Antibodies Immobilized on the Surface of Sirolimus-Eluting Stents Enhance Stent Endothelialization. *JACC Interventions*. 2010; 3: 68.
83. Kerner T, Ahlers O, Reschreiter H, et al: Primary research: Adhesion molecules in different treatments of acute myocardial infarction. *Critical Care*. 2001; 5:145-150.
84. Wang X, Romanic A M, Yue T L, et al: Expression of interleukin-1beta, interleukin-1 receptor, and interleukin-1 receptor antagonist mRNA in rat carotid artery after balloon angioplasty. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 271(1): 138-43.
85. Schulze P C, Kluge E, Schuler G, et al: Periprocedural kinetics in serum levels of cytokines and adhesion molecules in elective PTCA and stent implantation: impact on restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22(12): 2105-7.



86. Tashiro H, Shimokawa H, Sadamatsu K, et al: Role of cytokines in the pathogenesis of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Coron Artery Dis.* 2001; 12(2): 107-13.
87. Hojo Y, Ikeda U, Katsuki T, et al: Interleukin 6 expression in coronary circulation after coronary angioplasty as a risk factor for restenosis. *Heart.* 2000; 84: 83-87.
88. Danielsson P, Schatz P, Swartbol P, et al: Response of Inflammatory Markers to Balloon Angioplasty in Peripheral Arterial Occlusive Disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2000; 20: 550-555.
89. Parmar J H, Aslam M, Standfield N J: Percutaneous Transluminal Angioplasty of Lower Limb Arteries Causes a Systemic Inflammatory Response. *Annals of Vascular Surgery.* 2009; 23(5): 569-576.
90. Ikeda U, Ito T, Shimada K: Interleukin-6 and acute coronary syndrome. *Clin Cardiol.* 2001; 24(11): 701-4.
91. Spreen M I, Martens J M, Knippenberg B, et al: Long-Term Follow-up of the PADI Trial: Percutaneous Transluminal Angioplasty Versus Drug-Eluting Stents for Infrapopliteal Lesions in Critical Limb Ischemia. *J Am Heart Assoc.* 2017; 6: e004877
92. Steiner S, Willfort-Ehringer A, Sievert H, et al: 12-Month Results From the First-in-Human Randomized Study of the Ranger Paclitaxel-Coated Balloon for Femoropopliteal Treatment. *JACC Cardiovasc Interv.* 2018; 11(10): 934-941.
93. Song Y, Zhao R, Long L, et al: Leu125Val polymorphism of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 is associated with atherosclerotic cerebral infarction in Chinese Han population. *Int J Clin Exp Med.* 2014; 7(12): 5808-5813.
94. Završnik M, Kariž S, Makuc J, et al: PECAM-1 Leu125Val (rs688) Polymorphism and Diabetic Nephropathy in Caucasians with Type 2 Diabetes Mellitus. *Anal Cell Pathol (Amst).* 2016; 2016: 3152967.
95. Pamuk O N, Tozki H, Uyanik M S, et al: PECAM-1 gene polymorphisms and soluble PECAM-1 level in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients: any link with clinical atherosclerotic events? *Clin Rheumatol.* 2014; 33(12): 1737-4.