

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŽIVA KIMOVEC

VPLIV ATRIJSKE FIBRILACIJE NA GENSKO IZRAŽANJE IN
SINTEZO NEVROTROFINOV V TKIVIH ČLOVEŠKEGA SRCA

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŽIVA KIMOVEC

**VPLIV ATRIJSKE FIBRILACIJE NA GENSKO IZRAŽANJE IN SINTEZO
NEVROTROFINOV V TKIVIH ČLOVEŠKEGA SRCA**

**INFLUENCE OF ATRIAL FIBRILLATION ON NEUROTROPHIN GENE
EXPRESSION AND SYNTHESIS IN HUMAN HEART TISSUE**

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom znanst. sod. dr. Damijane Mojce Jurič, univ. dipl. kem. Analizo izražanja genov so izvedli na Inštitutu za medicinsko genetiko Ginekološke klinike Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.

Zahvala

Mentorici prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec. med. biokem. se zahvaljujem za vso podporo in strokovne nasvete pri izdelavi diplomske naloge. Iskrena hvala somentorici znanst. sod. dr. Damijani Mojci Jurič, univ. dipl. kem. za vsestransko pomoč, dragoceno usmerjanje pri delu in izjemno prizadevnost. Hvaležna sem tudi svojim najbližjim za neprestano podporo in spodbudo.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom znanst. sod. dr. Damijane Mojce Jurič, univ. dipl. kem.

KAZALO

POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	IV
1 UVOD	- 1 -
1.1 ATRIJSKA FIBRILACIJA.....	- 1 -
1.1.1 Mehanizmi AF.....	- 2 -
1.1.2 Epidemiologija in klasifikacija	- 5 -
1.1.3 Zdravljenje.....	- 6 -
1.2 NEVROTROFINI.....	- 7 -
1.2.1 Biosinteza nevrotrofinov	- 7 -
1.2.2 Receptorji za nevrotrofine	- 8 -
1.2.3 Učinki nevrotrofinov v živčnem sistemu.....	- 11 -
1.2.4 Učinki nevrotrofinov v srčnožilnem sistemu.....	- 12 -
1.3 VPLETENOST NEVROTROFINOV IN ŽIVČNEGA SISTEMA V AF	- 13 -
2 NAMEN DELA	- 15 -
3 MATERIALI IN METODE	- 16 -
3.1 MATERIALI.....	- 16 -
3.1.1 Priprava vzorcev	- 16 -
3.1.2 Določanje celokupnih proteinov	- 16 -
3.1.3 Encimsko-immunske metode.....	- 16 -
3.1.4 Vzorci	- 18 -
3.2 PRIPRAVA VZORCEV	- 18 -
3.3 DOLOČANJE CELOKUPNE KONCENTRACIJE PROTEINOV	- 19 -
3.4 ENCIMSKO-IMUNSKA METODA ZA KVANTITATIVNO DOLOČEVANJE NEVROTROFINOV	- 19 -
3.4.1 Postopek določanja NGF (NGF ELISA)	- 20 -
3.4.2 Postopek določanja BDNF (BDNF ELISA).....	- 21 -
3.4.3 Postopek določanja NT-3 (NT-3 ELISA).....	- 22 -

3.4.5 Obdelava in analiza podatkov	- 22 -
3.5 IZRAŽANJE GENOV	- 23 -
3.5.1 Princip metode	- 23 -
3.5.2 Postopek izolacije molekul RNA.....	- 24 -
3.5.3 Postopek sinteze komplementarne DNA	- 24 -
3.5.4 Postopek analize izražanja genov	- 24 -
3.5.5 Obdelava in analiza podatkov	- 25 -
4 REZULTATI.....	- 26 -
4.1 PREDSTAVITEV PREISKOVANCEV	- 26 -
4.2 VREDNOSTI NEVROTROFINOV V SERUMU IN TKIVIH ATRIJEV ČLOVEŠKEGA SRCA.....	- 27 -
4.2.1 Serumske koncentracije nevrotrifinov	- 27 -
4.2.2 Vsebnost nevrotrifinov v tkivih atrijev človeškega srca.....	- 31 -
4.3 IZRAŽANJE GENOV	- 36 -
4.3.1 Izražanje nevrotrifinov in receptorjev v kontrolni skupini	- 36 -
4.3.2 Izražanje nevrotrifinov in receptorjev v atrijih bolnikov z atrijsko fibrilacijo	- 40 -
5 RAZPRAVA.....	- 45 -
5.1 SERUMSKE KONCENTRACIJE NEVROTROFINOV.....	- 46 -
5.2 VSEBNOST IN IZRAŽANJE NEVROTROFINOV IN NJIHOVIH RECEPTORJEV V TKIVIH ATRIJEV ČLOVEŠKEGA SRCA.....	- 49 -
5.2.1 Vsebnost in izražanje nevrotrifinov v tkivih atrijev človeškega srca	- 50 -
5.2.2 Izražanje nevrotrifinskih receptorjev v tkivih atrijev človeškega srca	- 53 -
5.3 OMEJITVE	- 57 -
6 SKLEP	- 58 -
7 LITERATURA	- 60 -
8 PRILOGA	- 68 -

POVZETEK

Atrijska fibrilacija (AF) je najpogostejša kronična aritmija, za katero je značilno pospešeno, neredno in neuskklajeno utripanje preddvorov. Pogosto jo sprožijo ektopična žarišča, sčasoma pa privede do električnega in strukturnega preoblikovanja atrijev, kar še olajša ohranjanje motnje. Nevrotrofini so družina nevrotrofičnih dejavnikov, ki uravnavajo preživetje in diferenciacijo razvijajočih se živčnih celic ter vzdržujejo njihove specifične povezave in funkcijo v odraslem organizmu. Vedno pomembnejša postaja njihova vloga v srčnožilnem sistemu, kjer sodelujejo pri preživetju srčnih mišičnih celic, angiogenezi in hipertrofiji.

Učinki nevrotrofinov tako v srčnožilnem sistemu kot v živčevju nakazujejo udeležnost nevrotrofinskega sistema pri pojavu AF, zato smo želeli proučiti nivoje sinteze in genskega izražanja nevrotrofinov in njihovih receptorjev v prisotnosti te motnje ritma. V ta namen smo pridobili vzorce seruma ter levega in desnega atrija 34 bolnikov z boleznimi zaklopk, od katerih je imelo 15 bolnikov reden srčni ritem, 19 bolnikov pa je imelo AF. Vsebnosti nevrotrofinov živčnega rastnega dejavnika (NGF), nevrotrofičnega dejavnika možganskega izvora (BDNF) in nevrotrofina-3 (NT-3) smo določili z encimsko-immunskimi testi, izražanje genov za NGF in NT-3 ter nevrotrofinskih receptorjev p75^{NTR}, TrkA in TrkB pa z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času.

Rezultati meritev so pokazali, da se serumske koncentracije nevrotrofinov v prisotnosti AF ne spremenijo. Bazalna vsebnost vseh treh proučevanih nevrotrofinov pri bolnikih z rednim ritmom je bila med levim in desnim atrijem primerljiva, izražanje genov za NGF in p75^{NTR} pa je bilo značilno manjše v levem atriju. Vsebnost NGF, BDNF in NT-3 pri bolnikih z motnjo ritma se ni značilno razlikovala od kontrolne skupine, prav tako nismo opazili pomembnih razlik v izražanju genov za NGF in NT-3. V prisotnosti AF pa se je močno povešalo izražanje gena za p75^{NTR} v levem atriju ter zmanjšalo izražanje gena za TrkA v desnem atriju. Značilnih sprememb v izražanju gena za TrkB nismo zaznali.

Zaključimo lahko, da atrijska fibrilacija ne vpliva na gensko izražanje in sintezo nevrotrofinov, se pa v njeni prisotnosti spremeni izražanje nevrotrofinskih receptorjev in s tem razmerje med njimi. To bi lahko pomembno spremenilo funkcijo živčevja in vplivalo na strukturno preoblikovanje tkiva atrijev človeškega srca.

ABSTRACT

Atrial fibrillation (AF) is the most common sustained arrhythmia, characterized by rapid, irregular and uncoordinated activation of the atria. It is often triggered by ectopic foci and it eventually leads to atrial electric and structural remodelling, which only further facilitates its persistence. Neurotrophins are a family of neurotrophic factors, that regulate survival and differentiation of neurons during development and maintain their specific connections and function in adulthood. Their role is becoming increasingly important in cardiovascular system, where they participate in cardiac myocyte survival, angiogenesis and hypertrophy.

Since neurotrophin actions in both cardiovascular and nervous system point to the involvement of neurotrophic system in AF occurrence, our aim was to determine the levels of synthesis and gene expression of neurotrophins and their receptors in the presence of this arrhythmia. For this purpose, we obtained serum and left and right atrial tissue samples from 34 patients with valvular disease. Among them, 19 suffered from AF and 15 of them had regular heart rhythm. We quantified nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin-3 (NT-3) levels using enzyme-linked immunosorbent assay. Gene expression of neurotrophins NGF and NT-3 and neurotrophic receptors p75^{NTR}, TrkA and TrkB was determined by real-time PCR.

As shown by the results of these measurements, serum neurotrophin levels remained unchanged in the presence of AF. Basal protein levels of the three studied neurotrophins were comparable between left and right control atrium, yet NGF and p75^{NTR} gene expression levels were significantly lower in left atrial tissue. When the arrhythmia group was compared to the control, no significant differences in atrial NGF, BDNF and NT-3 protein levels were observed. Also we found no changes in NGF and NT-3 gene expression. However, in the presence of AF p75^{NTR} gene expression highly increased in the left atrium and TrkA gene expression in the right atrium decreased. No difference in TrkB gene expression was found.

In conclusion, neurotrophin gene expression and synthesis are not influenced by atrial fibrillation. Nevertheless, the pattern of neurotrophin receptor gene expression is altered in its presence. This could notably alter the function of the nervous system and influence the structural remodelling of atrial tissue in human heart.

SEZNAM OKRAJŠAV

ACC/AHA/ESC : American College of Cardiology / American Heart Association /

European Society of Cardiology

AF : atrijska fibrilacija

Akt : serin/treonin-kinaza ali protein-kinaza B

BDNF : nevrotrofični dejavnik možganskega izvora

CRP : C-reaktivni protein

Ct : cikel praga (ang. threshold cycle)

DAAF: desni atrij skupine z atrijsko fibrilacijo

DAK : desni atrij kontrolne skupine

EC : endotelna celica

ERK : z zunajceličnim signalom regulirana kinaza (ang. extracellular signal-regulated kinase)

ERP : efektivna refraktarna doba

LAAF : levi atrij skupine z atrijsko fibrilacijo

LAK : levi atrij kontrolne skupine

MAPK : z mitogenom aktivirana protein-kinaza (ang. mitogen-activated protein kinase)

NGF : živčni rastni dejavnik

NGF : gen, ki kodira živčni rastni dejavnik

NGFR : gen, ki kodira receptor p75

NT : nevrotrofini

NT-3 : nevrotrofin-3

NT-4 : nevrotrofin-4

NTF3 : gen, ki kodira nevrotrofin-3

NTRK1 : gen, ki kodira tropomiozinu sorodni kinazni receptor A

NTRK2 : gen, ki kodira tropomiozinu sorodni kinazni receptor B

p75^{NTR} : nevrotrofinski receptor p75

PI3K : fosfatidilinozitol 3-kinaza

PLC- γ : fosfolipaza C γ

PPIA : gen, ki kodira peptidilprolil izomerazo A

SA : sinoatrialni

SD : standardni odklon

SEM : standardna napaka

Trk : tropomiozinu sorodna kinaza (ang. tropomyosin related kinase)

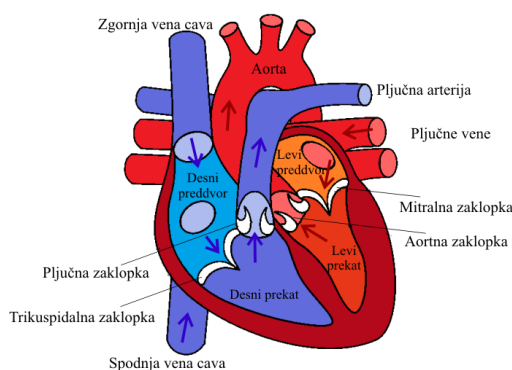
TrkA : tropomiozinu sorodna kinaza A

TrkB : tropomiozinu sorodna kinaza B

TrkC : tropomiozinu sorodna kinaza C

1 UVOD

Za oskrbo tkiv s kisikom, hranili in ostalimi pomembnimi snovmi je potrebno nenehno kroženje krvi po organizmu, ki ga zagotavlja neprestano ritmično krčenje srca. Njegov osrednji del, miokard, sestavljajo srčne mišične celice in vezivno tkivo. Večino mase miokarda sicer tvorijo srčne mišične celice, kljub temu pa približno 70% celic predstavljajo manjše celice, kot so žilne gladkomišične celice, endotelne celice in fibroblasti (1). Specializirane srčne mišične celice sposobne spontanega ritmičnega proženja akcijskih potencialov in njihovega širjenja v ostale predele oblikujejo prevodni sistem.



Slika 1: Zgradba srca in pot krvi skozenj.

Srce je oživčeno s simpatičnimi in parasimpatičnimi živčnimi vlakni, ki uravnavajo njegovo delovanje. Aktivnost simpatičnega živčevja poveča moč krčenja, srčno frekvenco in hitrost prevajanja. Učinki parasimpatične aktivnosti so nasprotni, kažejo se kot negativni kronotropni, dromotropni in predvsem v atrijih še inotropni učinek na srčno funkcijo.

1.1 Atrijska fibrilacija

Atrijska fibrilacija (AF) je nadprekatna aritmija, kjer gre za hitro, neredno in neusklajeno utripanje preddvorov. Posledica migetanja atrijev je slabše polnjenje in neredno krčenje prekatov, kar vpliva na preskrbo tkiv s kisikom.

Kaže se na zelo različne načine, od popolne odsotnosti simptomov do srčne odpovedi (2). Krajša epizoda AF povzroča palpitacije, bolečine v prsih, omotičnost, dispnejo in utrujenost (3). Zaradi izgube učinkovite kontrakcije atrijev in nerednega ter prehitrega

ritma prekatov se lahko pojavijo akutni, življenje ogrožujoči zapleti, sicer kompenziranih srčnih boleznih. Ker se atriji ne krčijo pravilno, kri v njih zastaja in tvorijo se strdki. Taki tromboemboli lahko potujejo v različne organe, a najpogosteje v možgane, kjer povzročijo najbolj nezaželen zaplet AF, možgansko kap (3). AF lahko poteka asimptomatsko in jo odkrijejo šele pri rutinskih EKG preiskavah (4).

1.1.1 Mehanizmi AF

Patofiziologija AF je zapletena, zato procesi, ki prispevajo k njenemu nastanku in napredovanju, še niso popolnoma pojasnjeni. Predlaganih je bilo veliko hipotez, trenutno pa prevladuje razlaga o treh glavnih mehanizmih pojava in ohranjanja AF. Ti se med seboj ne izključujejo, temveč lahko vplivajo na pojavljanje drug drugega. V zadnjem času odkrivamo dejavnike njihovega nastanka, skupne vplive in medsebojne povezave. Glavni mehanizmi, odgovorni za začetek ali ohranjanje AF, so hitro ektopično proženje impulzov (prožena aktivnost), enokrožno ponovno vstopanje (ang. single-circuit re-entry) in večkrožno ponovno vstopanje (ang. multiple-circuit re-entry).

Ektopično proženje impulzov

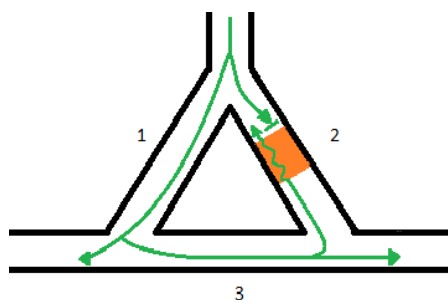
Večina prezgodnjih utripov atrijev, ki sprožijo AF, izhaja iz ektopičnih žarišč v pljučnih venah. Sproži jih lahko nenormalen, pretiran avtomatizem ali pa zgodnje ali zapoznele naknadne depolarizacije (5). Čeprav v normalnih pogojih ritem kontrolira sinoatrialni (SA) vozec, lahko avtomatizem izkazujejo tudi druge celice v srcu. Zanimivo je, da so v pljučnih venah našli specializirane celice ritmovnega tipa, podobne tistim v SA vozlu (5). Avtomatizem izven SA vozla je posledica spremenjenega ravnovesja ionskih tokov v mirovni, diastolični, fazi akcijskega potenciala. Ker prevladuje tok pozitivnih ionov v celico, se depolarizacija stopnjuje, hitreje je dosežen prazni potencial in sprožijo se ektopični impulzi (3).

Naknadne depolarizacije so povezane z odstranjevanjem Ca^{2+} ionov iz citosola, po tistem, ko njihova koncentracija med sistolično fazo akcijskega potenciala močno naraste. Padec znotrajcelične koncentracije kalcija omogočata privzem Ca^{2+} ionov nazaj v endoplazemski retikulum in izločanje Ca^{2+} iz celice z $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ izmenjevalcem. Slednji izmenja tri Na^+ ione za vsak Ca^{2+} in tako ustvarja pozitiven tok ionov v celico, kar lahko

vodi do naknadnih depolarizacij in proženja impulza. V stanjih, kjer sta povečani znotrajcelična koncentracija Ca^{2+} ali aktivnost izmenjevalca, je nastajanje naknadnih depolarizacij bolj verjetno (3).

Ponovno vstopanje impulza

Ponovni vstop (kroženje vzburjenja) (ang. re-entry) se pojavi zaradi nenormalnega širjenja impulza med različnimi predeli v tkivu (3). Obstajati mora anatomsko ali funkcionalna pot z nevzdražnim središčem, enosmernim blokom ali počasnim prevajanjem (Slika 2) (6). Ključni sta časovna uskladitev impulzov in refraktarno stanje tkiva (7). Ponovno vstopanje se lahko vzpostavi v eni krožni poti, kar povzroča hitro, a redno krčenje, ali v večih nestabilnih krožnicah, kar ustvari neredno, fibrilatorno aktivnost (3). Kroženje vzburjenja olajšujejo skrajšana refraktarna doba atrijev, upočasnjeno prevajanje in povečana masa srčnega tkiva (2).



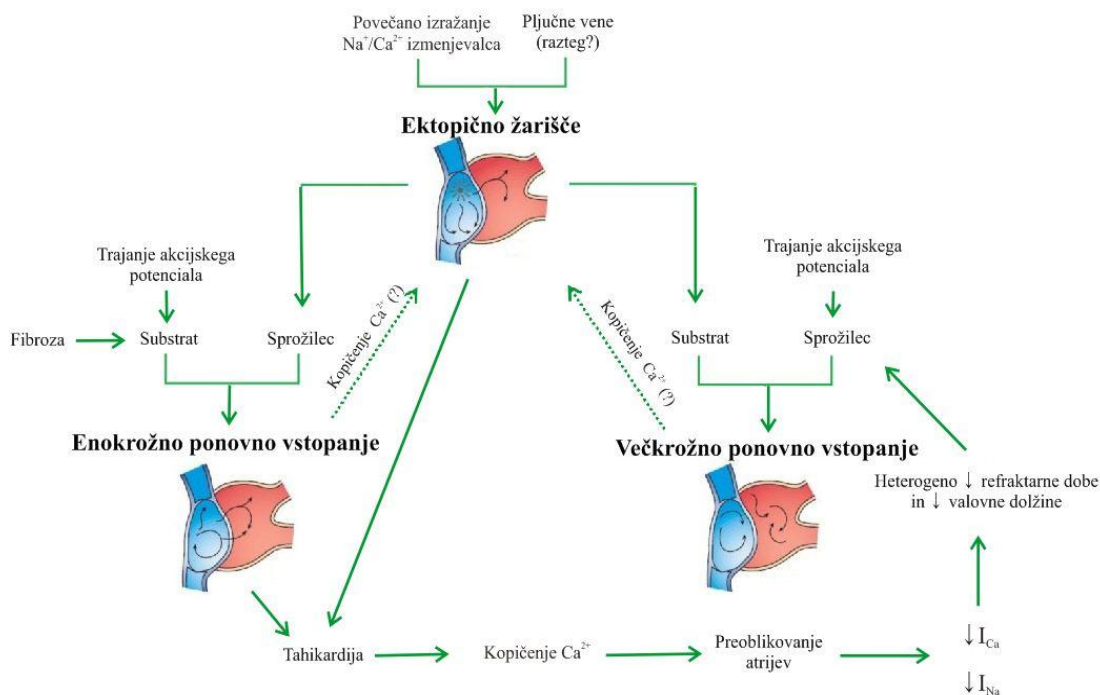
Slika 2: Mehanizem ponovnega vstopanja.

V področju 2 je prisoten enosmerni blok, kjer lahko impulz potuje le retrogradno. Akcijski potencial bo iz področja 1 potoval v področje 3 in retrogradno skozi področje 2. Če bo takrat tkivo na mestu 1 zopet vzdražljivo, bo akcijski potencial ponovno vstopil in potoval skozi to področje. Na ta način se lahko vzpostavi krožna pot impulzov, ki predstavlja vir akcijskih potencialov za širjenje skozi srce (7).

Atrijska fibrilacija povzroča električno in strukturno preoblikovanje atrijev, kar še olajšuje njeno ohranjanje. Električno preoblikovanje je posledica hitrega utripanja atrijev in vključuje spremembe v ionskih lastnostih srčnih mišičnih celic. Skrajša se učinkovita refraktarna doba (ERP) in upočasnjuje se prevajanje impulza. Zaradi visoke frekvence proženja akcijskih potencialov je povečano vstopanje Ca^{2+} v celico. Ta skuša breme zmanjšati z zaščitnimi mehanizmi, kot sta inaktivacija toka kalcijevih ionov skozi L-tip kanalov in manjše izražanje te vrste kanalčkov. Tako se skrajša tudi trajanje akcijskega

potenciala in ERP. Počasi začne upadati tudi tok skozi natrijeve kanale, kar bi lahko vplivalo na manjšo hitrost prevajanja (3, 8). Zaradi teh dogodkov se kroženje impulza lažje pojavi. Strukturno preoblikovanje se kaže kot izguba srčnih mišičnih celic in naraščanje fibroznega tkiva (3). Lahko se zgodi že pred pojavom AF kot posledica drugih bolezni (hipertenzija, kongestivna srčna odpoved) (8). Obseg električnih in strukturnih sprememb ni enak v celotnem tkivu, zato je prevajanje signala manj homogeno, kar še dodatno olajšuje AF (2, 9).

Za nastanek klinično zaznavne aritmije naj bi bili potrebni trije temelji; substrat, sprožilec in modifikator (8, 10). Sprožilec pri AF je običajno ektopična aktivnost, predvsem v pljučnih venah. Substrat ustvarijo spremembe v atrijih, ki so posledica električnega in strukturnega preoblikovanja (npr. fibroza in krajša ERP). Modifikatorji so v prvi vrsti avtonomni živčni sistem, pa tudi staranje, AF sama, pridružene bolezni srca in uporaba zdravil (2, 11).



Slika 3: Osnovni mehanizmi AF se med seboj prepletajo.

Ektopična žarišča lahko sprožijo enokrožno ali več krožno ponovno vstopanje. Slednjega omogočajo tudi s povzročanjem tahikardije in preoblikovanja atrijev. Na enak način lahko tudi enokrožno ponovno vstopanje vodi do več krožnega, obe vrsti kroženja impulza pa podpirata ektopično proženje, verjetno preko kopičenja Ca²⁺ v celici (2, 3). Čeprav lahko AF sprva ohranjajo drugi mehanizmi, sčasoma začne zaradi preoblikovanja atrijev prevladovati več krožno ponovno vstopanje (9).

1.1.2 Epidemiologija in klasifikacija

AF je najpogostejša kronična srčna aritmija v splošni populaciji, njena prevalenca pa s starostjo močno narašča (3, 12, 13). Medtem ko se AF redko pojavlja pri posameznikih v petdesetih letih (prevalenca < 1%), pa se pri populaciji osemdesetletnikov pojavlja kar v 10% (3, 12). AF je povezana z večjim tveganjem za razvoj možganske kapi, srčnega popuščanja in zapletov zaradi kroničnega jemanja zdravil, kar še povečuje njen pomen kot problem javnega zdravja (12, 13).

Številne analize so kot dejavnike tveganja izpostavile naraščujočo starost, hipertenzijo, srčno odpoved, miokardni infarkt, bolezni srčnih zaklopk, moški spol, kajenje, debelost in sladkorno bolezen (2). Zaradi visoke prevalence je hipertenzija odgovorna za več primerov AF kot katerikoli drug dejavnik tveganja (4). Čeprav se AF večinoma razvije pri posameznikih z že prisotnimi srčnimi ali drugimi boleznimi, se lahko pojavi tudi v njihovi odsotnosti.

Kardiološka združenja (American College of Cardiology / American Heart Association / European Society of Cardiology) so opisala štiri glavne kategorije AF (Tabela I). Omenjajo še druge oznake bolezni. Osamljena AF (ang. lone AF) opisuje vrsto AF pri osebah, mlajših od 60 let, brez kliničnih ali ekokardiografskih znakov, ki bi kazali na srčnopljučne bolezni. Od idiopatske AF se loči po tem, da slednja označuje nastanek iz neznanih vzrokov ne glede na bolnikovo starost ali pridružena srčnožilna patološka stanja (14). Manjši delež primerov osamljene AF predstavlja družinska oblika. Družinska AF je monogenska bolezen s pretežno avtosomno dominantnim dedovanjem. Odkrite so bile mutacije v genih za kalijeve kanale, ki povečajo njihovo aktivnost. Na ta način je skrajšano trajanje akcijskega potenciala in efektivne refraktarne dobe z znanimi posledicami na pojav kroženja impulza (13, 15).

Tabela I: Klinična klasifikacija AF po ACC/AHA/ESC smernicah (14, 16).

Prvič odkrita	Simptomatska ali asimptomatska, spontano mine ali vztraja.
Paroksizmalna	Ponavljajoča se AF, ki spontano preneha.
Perzistentna	AF, ki spontano ne preneha, za prekinitiv je potrebna uporaba zdravil ali elektrokonverzije; lahko gre za prvo epizodo ali posledico ponavljajočih epizod.
Permanentna	Dolgotrajna (ponavadi > 1 leto), kjer kardioverzija ni uspešna ali ni indicirana.

1.1.3 Zdravljenje

Trije glavni cilji terapije AF so ponovna vzpostavitev in ohranjanje sinusnega ritma, nadzor frekvence krčenja prekatov in preprečevanje tromboembolij (15). Ohranjanje sinusnega ritma pogosteje bolje odpravlja simptome, vendar je uporaba antiaritmikov povezana z večjo toksičnostjo nekaterih učinkovin in tveganjem pojava proaritmčnih učinkov (2). Antiaritmiki razredov Ia, Ic in III učinkovito ohranjajo sinusni ritem, a uporaba učinkovin iz prvih dveh razredov v zadnjem času upada. Najpogosteje uporabljana antiaritmika pri AF sta amiodaron (Cordarone, Amiokordin) in sotalol (Darob mite) iz razreda III (17). Vprašanje, katera strategija, ohranjanje sinusnega ritma ali nadzor frekvence prekatov, je bolj varna in učinkovita, je predmet številnih raziskav, trenutno pa se jeziček na tehtnici rahlo nagiba na stran nadzorovanja frekvence prekatov. AF ni prekinjena, temveč se vzdržuje tak odgovor prekatov, ki v mirovanju ohranja srčni utrip pod 80 utripi/minuto (17). V ta namen se uporabljajo nedihidripiridinski zaviralci kalcijevih kanalčkov (verapamil, diltiazem), β -antagonisti in digoksin, ki upočasnijo prevajanje skozi atrioventrikularni vozle. Sočasno je potrebno antikoagulacijsko zdravljenje za zmanjšanje tveganja možganske kapi (14, 17, 18).

Nefarmakološko zdravljenje temelji na metodah, kot so postopek Maze in njegove izpeljave, kateterska ablacija in vstavev spodbujevalnika ali defibrilatorja. Z ustvarjenimi področji onemogočenega prevajanja se prepreči širjenje kroženja impulza, ektopična žarišča pa se izolira ali z ablacijo odstrani (2, 14).

1.2 Nevrotrofini

Nevrotrofini, družina proteinov iz skupine nevrotrofičnih dejavnikov, uravnavajo različne vidike preživetja, razvoja in delovanja nevronov v osrednjem in perifernem živčnem sistemu. V času razvoja omogočajo preživetje, rast in diferenciacijo živčnih celic ter sodelujejo pri sinaptogenezi. Njihova prisotnost je potrebna tudi v odraslem živčevju, kjer ohranjajo preživetje in morfologijo nevronov ter uravnavajo delovanje sinaps in njihovo plastičnost. S preprečevanjem apoptoze in z vlogo pri regeneraciji živčnih celic so vpleteni tudi v patološka stanja, kot so poškodbe živčevja in neurodegenerativne bolezni (19).

Novejše raziskave so odkrile, da nevrotrofini učinkujejo tudi na srčnožilni sistem. Med njegovim razvojem služijo kot ključni dejavniki pri oblikovanju srca in nastanku žilja. Kasneje nadzorujejo preživetje srčnih mišičnih celic, endotelnih in žilnih gladkomišičnih celic ter uravnavajo procese angiogeneze. Ta odkritja pričajo o tem, da je pomen nevrotrofinov v srcu še toliko večji, kot bi jim ga pripisali le na podlagi njihove posredne udeležnosti pri živčnem uravnavanju srčne funkcije (20).

Pri sesalcih se izražajo štiri nevrotrofini: živčni rastni dejavnik (NGF), nevrotrofični dejavnik možganskega izvora (BDNF), nevrotrofin-3 (NT-3) in nevrotrofin-4 (NT-4 oz. NT-4/5). Med njimi obstaja visoka stopnja homologije, delijo si podobno molekulsko maso (13,2-15,9 kDa), izoelektrično točko (9-10) in 50% ujemanje v aminokislinskem zaporedju (21). Nevrotrofini običajno nastopajo kot nekovalentno povezani homodimeri (20). Skupna jim je tudi strukturna značilnost, t.i. cisteinski vozeli. To je zelo stabilen, zbit motiv, ki ga sestavljajo tri disulfidne vezi (22).

1.2.1 Biosinteza nevrotrofinov

Sintetizirajo in izločajo jih tarčni organi simpatičnega in senzoričnega živčevja in številni nevroni. Sproščeni nevrotrofini se vežejo na receptorje na živčnih končičih in lokalno regulirajo oživčenost tarče ter delovanje živčnih končičev. Po privzemu v aksone potujejo do telesa živčne celice, kjer pospešujejo njeno preživetje in diferenciacijo. Poleg retrogradnega transporta v telesa živčnih celic lahko delujejo tudi anterogradno, avtokrino in parakrino (19, 20, 23).

Njihovo izražanje je kontrolirano s celičnimi interakcijami v tkivih, ki določajo mesto in raven izražanja njihovih genov. Vsakega od genov za NT uravnavajo številni promotorji. Čeprav je znanih veliko transkripcijskih dejavnikov, vpletenih v izražanje NT genov, njihovi medsebojni vplivi še niso popolnoma pojasnjeni. Ali se NT izločajo pretežno konstitutivno ali po regulirani poti, se razlikuje glede na vrsto celic (19). Njihova sinteza v nevronih je odvisna od nevrnske aktivnosti, saj izražanje posameznih nevrotrofinov uravnavajo številni nevrotrofitransmiterji. Ti so udeleženi tudi pri sintezi nevrotrofinov v neživčnih (glijalnih) celicah. Na izražanje nevrotrofinov vplivajo tudi hormoni, glukokortikoidi, mineralokortikoidi in citokini (19, 24, 25).

Rezultat transkripcije in translacije so 30-35 kDa prepronevrotrofini, po odcepitvi preprodome in prodome pa nastanejo zrele oblike s približno 120 aminokislinami (20, 26). Prodomena ni vpletena le v zvijanje in regulacijo izločanja proteina, temveč imajo pronevrotrofini tudi biološko delovanje, ki se razlikuje od delovanja zrele oblike. Prodomena vpliva še na konformacijo pro-oblike in na ta način onemogoča interakcijo s Trk receptorji (20). Zrele oblike nastajajo s pomočjo furina in drugih konvertaz v Golgijevem aparatu (19). Znotrajcelična pretvorba pronevrotrofinov ni vedno popolna, zato celice poleg nekovalentno povezanih homodimerov zrelih nevrotrofinov izločajo tudi pronevrotrofine (19, 20). Izvencelične proteaze, med njimi tudi plazmin, jih nato pretvorijo v zrele proteine (20). Regulacija zorenja nevrotrofinov je pomembna post-transkripcijska kontrolna točka, ki določa obseg in specifičnost njihovih učinkov (19). Ali srčnožilne celice izločajo pronevrotrofine in ali ti nanje učinkujejo, še ni znano (20).

1.2.2 Receptorji za nevrotrofine

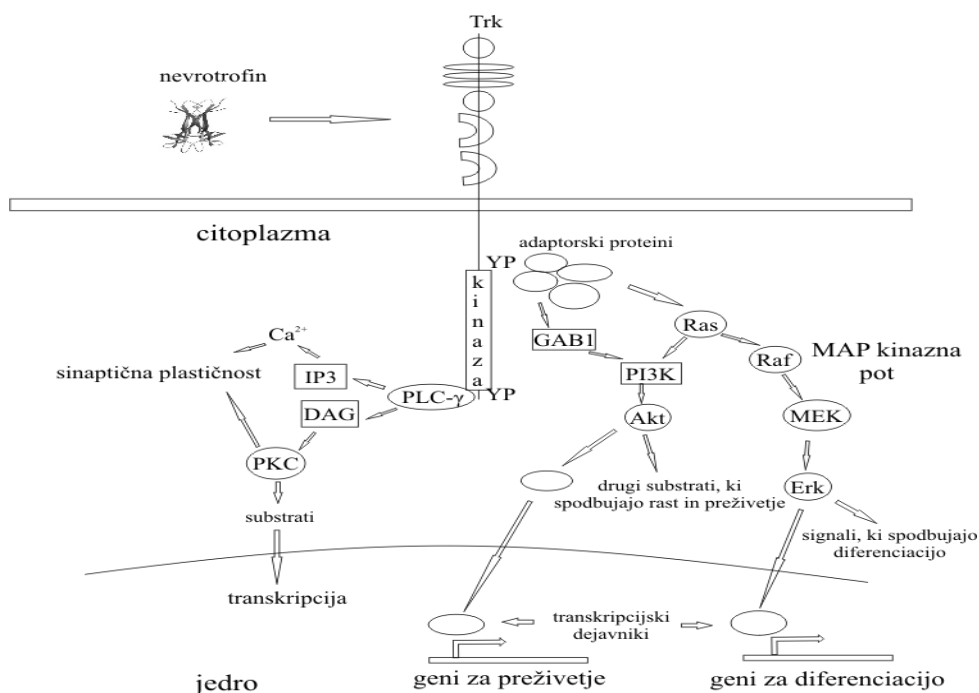
Nevrotrofini izkazujejo svoje učinke preko dveh vrst receptorjev, tropomiozinu sorodnih kinaz (Trk) in nevrotrofinskega receptorja p75 ($p75^{NTR}$). V družino Trk receptorjev sodijo trije tirozin-kinazni receptorji (TrkA, TrkB, TrkC), na katere se z visoko afiniteto ($K_d \approx 10^{-11}$ M) specifično vežejo posamezni nevrotrofini. Receptor p75 iz naddružine receptorjev tumor nekrotizirajočega faktorja aktivirajo vsi nevrotrofini, a z nižjo afiniteto ($K_d \approx 10^{-9}$ M) (19, 27, 28).

Trk receptorji

Sprva je veljalo, da se na posamezne Trk receptorje vežejo določeni nevrotrufini; NGF na TrkA, BDNF in NT-4 na TrkB in NT-3 na TrkC, vendar so kasneje ugotovili, da NT-3 lahko aktivira tudi TrkA in TrkB, a manj učinkovito (19). Na specifičnost vezave liganda vplivajo razlike v zunajcelični domeni receptorja, ki so posledica različnega izrezovanja intronov (ang. splicing). Nekatere izooblike Trk receptorjev, ki vsebujejo dodatno kratko aminokislinsko zaporedje, vežejo tudi druge, neprednostne NT. Razlike v izrezovanju vplivajo tudi na posredovanje signala, saj povzročijo nastanek izooblik brez tirozin-kinazne domene (19, 20).

Zunajcelično domeno receptorja sestavljajo s cisteinom bogati skupek, tri z levcinom bogate ponovitve, še en cisteinski skupek in dve imunoglobulinom podobni področji. Sledita transmembranska regija in znotrajcelična, tirozin-kinazna domena. Slednje so si pri posameznih receptorjih iz družine Trk precej podobne (~ 80% homologije), medtem ko se zunajcelične domene bolj razlikujejo. Interakcija z nevrotrufini poteka pretežno preko imunoglobulinom podobnega področja (19, 20).

Trk receptorji se nahajajo na živčnih in srčnih mišičnih celicah ter žilnih endotelnih in gladkomišičnih celicah (20). Po vezavi nevrotrufina Trk receptor dimerizira, poteče transfosforilacija tirozinskih ostankov, na katere se nato vežejo intermediati v signalnih kaskadah. V citoplazemski domeni je prisotnih več tirozinov, ki so ključni za posredovanje signala (19, 20). Najpomembnejše signalne poti, ki jih aktivirajo Trk receptorji, predstavlja naslednja shema.



Slika 4: Posredovanje signala preko Trk receptorjev (19).

Po vezavi nevrotrofina na Trk receptor se sprožijo tri glavne signalne poti. Aktivacija proteina Ras sproži z mitogenom aktivirano protein (MAP) kinazno kaskado, ki spodbuja diferenciacijo nevronov. Preko Ras ali GAB1 aktivirana PI3K posreduje signale za preživetje in rast nevronov in drugih celic. Aktivacija PLC- γ povzroči aktivacijo s Ca^{2+} in PKC uravnanih poti, ki spodbujajo sinaptično plastičnost. Vsaka izmed teh signalnih poti uravnava tudi transkripcijo genov (19). YP – fosforiliran tirozin; PLC- γ – fosfolipaza C γ ; IP3 – inozitol trifosfat; DAG – diacilglicerol; PKC – protein-kinaza C; GAB1 – z GRB2 povezan vezavni protein 1; PI3K – fosfatidilinozitol 3-kinaza; Akt – serin/treonin-kinaza ali protein-kinaza B; Ras – majhna GTPaza; Raf – vrsta serin/treonin specifičnih proteinskih kinaz; MEK – kinaza z mitogenom aktivirane protein-kinaze; Erk – z zunajceličnim signalom regulirana kinaza

Pronevrotrofini ne aktivirajo Trk receptorjev, zato proteaze, ki pretvarjajo pronevrotrofine v zrele oblike, vplivajo tudi na odzivanje teh receptorjev (19). Posredovanje signala za preživetje je pretežno povezano z aktivacijo Trk, medtem ko ima p75^{NTR}, z nekaj izjemami, ključno vlogo pri apoptozi (20).

Receptor p75

Receptor p75^{NTR} je 75 kDa velik glikoprotein, sestavljen iz štirih s cisteinom bogatih motivov na zunajcelični strani, transmembranske regije in citoplazemske domene smrti. Ne vsebuje katalitične domene, a kljub temu interagira s številnimi proteini, s pomočjo katerih se prenašajo signali (19, 22, 29). Preko aktivacije jedrnega faktorja κ B (NF- κ B) sproži transkripcijo številnih genov, ki prispevajo k preživetju celic. Z uravnavanjem aktivnosti GTPaz Rho vpliva na rast aksonov, aktivacija Jun kinazne poti pa je povezana z apoptozo. Delovanje p75^{NTR} je odvisno od celičnega mikrookolja, v katerem se receptor nahaja. Kadar se p75^{NTR} izraža hkrati s Trk, se povečata afiniteta in specifičnost vezave nevrotrofinov na Trk (20, 27, 30). V prisotnosti koreceptorja sortilina se na p75^{NTR} z visoko afiniteto vežejo pronevrotrofini in sprožijo celično smrt (19, 20, 27). Receptor p75 je prisoten v živčnih in drugih celicah. Na endotelnih (EC) in žilnih gladkomišičnih celicah se normalno redko pojavlja, njegovo izražanje se poveča v patoloških pogojih (20, 29, 30). V EC posreduje proapoptotičen učinek in onemogoča angiogenezo (29).

Signalne poti, ki jih sprožita obe vrsti receptorjev, se na več mestih prepletajo. Aktivacija Trk na različne načine prepreči proapoptotično signalizacijo p75^{NTR}. Jun kinazna kaskada je prekinjena zaradi inhibicije nekaterih intermediatov, kar je posledica aktivacije fosfatidilinozitol-3 kinazne (PI3K) signalne poti. Prepletanje signalnih poti je dodatno omogočeno s tvorbo multiproteinskih kompleksov, kjer določeni proteini hkrati interagirajo z obema receptorjema (19).

1.2.3 Učinki nevrotrofinov v živčnem sistemu

Nevrotrofini učinkujejo na različne populacije živčnih celic in imajo ključno vlogo pri razvoju in ohranjanju delovanja osrednjega in perifernega živčevja. Skrbijo za preživetje, diferenciacijo in migracijo razvijajočih se nevronov ter rast njihovih izrastkov (22). V tem času živčne celice tekmujejo za omejene količine nevrotrofičnih dejavnikov, ki jih izločajo tarčna tkiva. Nevroni, ki si zagotovijo zadostno količino potrebnega nevrotrofina, preživijo, ostali pa v procesu apoptoze odmrejo. Na ta način je zagotovljena tudi ustrezna gostota oživčenosti tarčnega tkiva (19). Obseg izražanja NGF v oživčenem tkivu se v

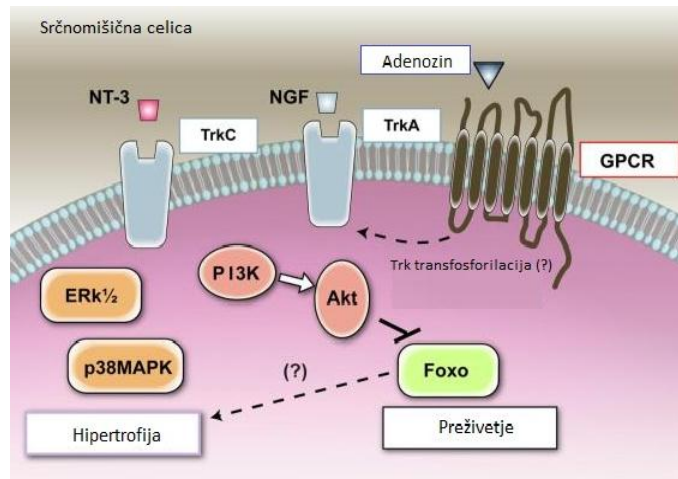
grobem ujema z gostoto oživčenosti, vendar njegovo povečano izražanje povzroča simpatično hiperinervacijo, ki bi bila lahko udeležena pri atrijski fibrilaciji (31, 32, 33, 34).

Vpliv na preživetje, morfologijo in diferenciacijo nevronov se v odrasli dobi nadaljuje in se razširi na procese sinaptične plastičnosti. Nevrotrofini uravnavajo učinkovitost sinaptičnega prenosa, saj lahko sprožijo presinaptično sproščanje neurotransmiterjev (35). V kulturah simpatičnih nevronov in srčnih mišičnih celic NGF poveča sproščanje noradrenalina, BDNF pa sproščanje acetilholina (28). Tudi z uravnavanjem izražanja ionskih kanalov, encimov za biosintezo neurotransmiterjev in drugih proteinov nevrotrufini ohranjajo normalno delovanje živčevja (19).

1.2.4 Učinki nevrotrufinov v srčnožilnem sistemu

Tako kot pri razvoju živčevja so nevrotrufini udeleženi tudi pri oblikovanju srčnožilnega sistema. Razvijajoče celice srca in žilja izražajo nevrotrufine in njihove receptorje. BDNF spodbuja diferenciacijo v endotelne in srčne mišične celice. Če ga med razvojem primanjkuje, stiki med endotelnimi celicami oslabijo, kar vodi do krvavitav prekatne stene in manjše sposobnosti krčenja srca. Nevrotrofin-3 uravnava proliferacijo zarodnih srčnih mišičnih celic, njegovo pomanjkanje pa povzroči okvare srčnega pretina in zaklopk ter oteži oblikovanje srca. Ker se nekatere razvojne napake pojavijo, še preden se v organu oblikuje živčevje, je verjetno, da nevrotrufini neposredno nadzorujejo razvoj srčnožilnega sistema (20, 30, 36).

Svojo vlogo pri vzdrževanju delovanja srca in žilja ohranijo tudi v odraslem organizmu. NGF je pomemben dejavnik angiogeneze, saj sodeluje pri številnih procesih, ki se tekom nje odvijajo. Po vezavi na TrkA signal za preživetje in invazijo endotelnih celic posreduje PI3K/Akt (serin/treonin-kinaza ali protein-kinaza B) signalna pot, preko ERK1/2 pa se sprožita proliferacija in migracija (20, 36). S spodbujanjem teh procesov k angiogenezi prispeva tudi NT-3, pri čemer naj bi bila prav tako udeležena PI3K/Akt (36). Oba nevrotrufina spodbujata še migracijo žilnih gladkomišičnih celic (20, 36). Tudi BDNF ugodno vpliva na preživetje endotelnih celic in angiogenezo. Nanjo verjetno učinkuje na dva načina: z aktivacijo TrkB receptorjev na EC, ki lokalno sprožijo nastanek novih žilic in s kemotaktičnim delovanjem na progenitorske celice iz kostnega mozga (30). V srčnih mišičnih celicah NGF preko avtokrinega mehanizma preprečuje apoptozo, NT-3 pa je povezan z njihovo hipertrofijo (Slika 5) (37, 38).



Slika 5: Učinki nevrotrofinov na srčne mišične celice (20).

NGF z aktivacijo TrkA preko PI3K povzroči fosforilacijo Akt. Sledijo fosforilacija proapoptotičnih transkripcijskih dejavnikov Foxo, njihova izločitev iz jedra in inaktivacija. Z G-proteinom sklopljeni receptorji (GPCR) bi lahko navzkrižno aktivirali Trk, kot se dogaja v živčnih celicah. NT-3 z aktivacijo p38 MAPK in ERK1/2 sproži hipertrofijo (20). ERK1/2 – z zunajceličnim signalom regulirana kinaza 1 in 2; p38 MAPK – p38 z mitogenom aktivirana protein-kinaza; PI3K – fosfatidilinozitol 3-kinaza; Akt – serin/treonin-kinaza oz. protein-kinaza B

1.3 Vpletenost nevrotrofinov in živčnega sistema v AF

Delovanje srca je močno odvisno od navodil živčnega sistema, zato je tudi njegova oživčenost strogo nadzorovana. Nevrotrofini sodelujejo pri oblikovanju živčevja in vplivajo na njegove funkcionalne lastnosti. Izražanje NT se glede na fiziološko in patološko stanje organizma razlikuje, vendar obseg in posledice teh sprememb pri posameznih boleznih srca še niso jasno opredeljeni (28).

Zaradi bolezni gostota oživčenosti v srcih naraste ali upade, kar lahko vodi do neuravnotežene aktivacije živčevja in aritmij (39). Pri bolnikih s perzistentno AF so opazili višjo stopnjo simpatične oživčenosti atrijskih. Tudi nekatere študije na živalih kažejo na to, da je heterogeno povečanje simpatične oživčenosti lahko osnova za razvoj AF (34). Neravnovesje v aktivnosti avtonomnega živčnega sistema lahko povzroči pomembne spremembe elektrofizioloških lastnosti atrijskih, ki olajšajo nastop AF. Vagalna stimulacija skrajša efektivno refraktarno dobo. Na drugi strani tudi povečan simpatični tonus olajšuje razvoj AF, saj kateholamini vplivajo na vse elektrofiziološke mehanizme njenega začetka

in ohranjanja (5, 8). Sprožijo lahko nihanje membranskega potenciala, značilnega za naknadne depolarizacije ali povečajo avtomatizem. S spreminjanjem vzdražnosti ali prevajanja vplivajo na kroženje impulza (5). Raziskovalci so s stimulacijo avtonomnega živčnega sistema izzvali proženje impulzov v pljučnih venah (40). Na tem mestu je možen vpliv nevrotrofinov, saj so ugotovili, da NGF v kulturah simpatičnih nevronov in srčnih mišičnih celic s presinaptičnim delovanjem na TrkA poveča sproščanje noradrenalina in okrepi ekscitatorni prenos (28). Poleg tega spodbuja tudi izražanje tirozin hidroksilaze, encima udeleženega pri biosintezi noradrenalina. Na drugi strani BDNF sproži sproščanje acetilholina in presinaptično spodbuja inhibitorni prenos. Nevrotrofini uravnajo tudi delovanje ionskih kanalov in tako vplivajo na vzdražnost in značilnosti proženja impulzov simpatičnih nevronov (28). Z učinkom na vse te procese bi spremenjena nevrotrofična signalizacija lahko vplivala na stopnjo simpatičnega prenosa v srcu in prispevala k pojavu aritmij, saj so le-te že povezali s spremembami v simpatičnem prenosu (28).

Poleg vpliva na razvoj in delovanje živčevja bi bili lahko nevrotrofini z AF povezani tudi preko neposrednega učinka na srčne mišične celice. NT-3 je eden izmed dejavnikov hipertrofije, pri AF pa so opazili prav povečanje atrijskih (38, 41). Zanimivo bi bilo proučiti, ali tako kot v nevronih tudi v srčnih mišičnih celicah nevrotrofini vplivajo na lastnosti ionskih kanalov in v kakšnem odnosu so morebitne spremembe s pojavom AF. Zaradi vpletenosti nevrotrofinov v številne procese, ki bi bili lahko udeleženi pri AF, se odpira vprašanje, ali je raven nevrotrofinov povezana s to motnjo ritma.

2 NAMEN DELA

V diplomskem delu bomo proučevali povezanost atrijske fibrilacije z izražanjem in sintezo nevrotrofinov in njihovih receptorjev v tkivih atrijskega človeškega srca. Morebitna vpletenost in vloga NT pri AF še ni pojasnjena, vendar učinki nevrotrofinov na živčne in srčnožilne celice nakazujejo to možnost. Atrijska fibrilacija je povezana z delovanjem živčevja, živčno funkcijo pa uravnavajo tudi nevrotrofini. Spremenjene vrednosti nevrotrofinov spremljajo nekatera srčna obolenja, ki hkrati predstavljajo dejavnike tveganja za AF, zato želimo ugotoviti, ali lahko spremenjeno nevrotrofinsko aktivnost opazimo tudi pri bolnikih z atrijsko fibrilacijo (42, 43, 44).

K sodelovanju v raziskavi bomo povabili bolnike, pri katerih je predviden operativni poseg zaradi bolezni srčnih zaklopk. Razdelili jih bomo v dve skupini: na bolnike, kjer je poleg bolezni zaklopk pridružena še atrijska fibrilacija in na bolnike z rednim ritmom srca. Med operacijo bodo sodelujočim odvzeli vzorce levega in desnega atrija.

Da bi ugotovili, ali obstaja povezava med ravniyo nevrotrofinov in AF, bomo z encimsko-imunsko metodo (ELISA) v serumskih in atrijskih vzorcih bolnikov obeh skupin določili koncentracije živčnega rastnega dejavnika, nevrotrofičnega dejavnika možganskega izvora in nevrotrofina-3. Nivoje proteinov bomo primerjali s stopnjo izražanja genov za nevrotrofine in njihove receptorje v tkivih atrijskega srca. Analizo genskega izražanja bodo izvedli v laboratoriju Inštituta za medicinsko genetiko Ginekološke klinike v Ljubljani z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času.

Podatke bomo statistično obdelali in preverili, ali obstajajo razlike med skupinama. Predvidevamo, da se bodo koncentracije nevrotrofinov in stopnje izražanja njihovih genov pri bolnikih z atrijsko fibrilacijo razlikovale od vrednosti pri kontrolni skupini bolnikov.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Priprava vzorcev

- ◆ natrijev klorid (NaCl)
- ◆ kalcijev klorid (CaCl₂)
- ◆ Triton X-100
- ◆ natrijev azid (NaN₃)
- ◆ fenilmetil-sulfonil fluorid (PMSF)
- ◆ N-etilmaleimid (NEM)
- ◆ goveji serumski albumin (BSA) (vse Sigma-Aldrich, ZDA)
- ◆ tris-(hidroksimetil)-metilamonijev klorid (Tris/Cl)
- ◆ etilendiamintetraocetna kislina (EDTA) (oboje Koch-Light Laboratories Ltd, Velika Britanija)
- ◆ prečiščena voda

Sestava raztopin:

- ◆ puferna raztopina A (*SSC brez BSA*): 50 mM Tris/Cl pH 7,0; 200 mM NaCl; 10 mM CaCl₂; 0,1% (v/v) Triton X-100; 0,05% (ut/v) NaN₃ v H₂O
- ◆ puferna raztopina B (ekstrakcijski pufer): 50 mM Tris/Cl pH 7,0; 200 mM NaCl; 10 mM CaCl₂; 0,1% (v/v) Triton X-100; 0,05% (ut/v) NaN₃; 10% BSA; 10 mM EDTA; 10 mM PMSF; 10mM NEM v H₂O

3.1.2 Določanje celokupnih proteinov

- ◆ Bio-Rad testni komplet za določanje proteinov (Bio-Rad Laboratories, Nemčija)

3.1.3 Encimsko-immunske metode

- ◆ s fosfatnim pufrom pufrana fiziološka raztopina, pH 7,4 (10x PBS) (Gibco BRL, Life Technologies, Velika Britanija)
- ◆ prečiščena voda

- ◆ Tween20[®] (Promega Corporation, ZDA)
- ◆ goveji serumski albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, ZDA)
- ◆ s streptavidinom konjugirana hrenova peroksidaza (R&D Systems, ZDA)
- ◆ stabilizirana raztopina peroksida (reagent A)
- ◆ stabilizirana raztopina kromogena tetrametilbenzidina (reagent B) (oboje R&D Systems, ZDA)
- ◆ žveplova IV kislina (H₂SO₄) (Merck KGaA, Nemčija)
- ◆ Trizma[®] baza (Tris[hidroksimetil]aminometan)
- ◆ natrijev klorid (NaCl)
- ◆ kalcijev klorid (CaCl₂)
- ◆ Triton X-100
- ◆ saharoza
- ◆ natrijev azid (NaN₃) (vse Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA)
- ◆ tris-(hidroksimetil)-metilamonijev klorid (Tris/Cl) (Koch-Light Laboratories Ltd, Velika Britanija)
- ◆ standard NGF : rekombinantni humani beta-NGF
- ◆ primarno protitelo proti humanemu NGF
- ◆ sekundarno biotinitirano protitelo proti humanemu NGF
- ◆ standard BDNF: rekombinantni humani BDNF
- ◆ primarno protitelo proti humanemu BDNF
- ◆ sekundarno biotinitirano protitelo proti humanemu BDNF
- ◆ standard NT-3: rekombinantni humani NT-3
- ◆ primarno protitelo proti humanemu NT-3
- ◆ sekundarno biotinitirano protitelo proti humanemu NT-3 (vse R&D Systems, ZDA)

Sestava raztopin:

- ◆ raztopina C (PBS): 0,144 g/L KH₂PO₄; 9 g/L NaCl; 0,795 g/L Na₂HPO₄·7H₂O v H₂O, pH 7,4
- ◆ raztopina D (pufer za spiranje): 0,05% (v/v) Tween20[®] v PBS, pH 7,4
- ◆ raztopina E: 1% (ut/v) BSA v PBS

- ◆ raztopina encima: 0,5% (v/v) s streptavidinom konjugirana hrenova peroksidaza v raztopini E
- ◆ raztopina encimskega substrata: raztopini peroksida in kromogena v razmerju 1:1
- ◆ stop raztopina: 1 M H₂SO₄
- ◆ raztopina F: 1% (ut/v) BSA, 5% (ut/v) saharoza, 0,05% (ut/v) NaN₃ v PBS
- ◆ raztopina G: 50 mM Tris/Cl, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 0,1% (v/v) Triton X-100, 0,05% (ut/v) NaN₃, 1% BSA v H₂O
- ◆ raztopina H: 0,1% BSA, 0,05% Tween 20[®] v s trisom pufrani fiziološki raztopini pH 7,3 (20 mM Trizma[®] baza, 150 mM NaCl v H₂O)
- ◆ raztopina H: 0,1% BSA, 0,05% (v/v) Tween 20[®], 0,02% (ut/v) NaN₃ v PBS

3.1.4 Vzorci

V raziskavo smo vključili bolnike, ki so bili v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana operirani zaradi bolezni zaklopk. Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko je raziskavo odobrila pod številko 186/12/08 (Priloga 1). Med operacijo sta bila bolnikom odvzeta vzorec levega in desnega atrija. Vzorci, namenjeni določanju koncentracij nevrotrofinov so bili do analize zamrznjeni na -70°C, vzorci za izražanje genov pa so bili takoj po odvzemu potopljeni v RNAlater[®] Solution (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, ZDA) in naslednji dan zamrznjeni na -20°C. V okviru predoperativnih preiskav so sodelujočim odvzeli tudi vzorce krvi. Koncentracije nevrotrofinov smo določili v serumu.

V raziskavi je sodelovalo 34 bolnikov, razdeljenih v dve skupini. Prvo skupino je sestavljalo 19 bolnikov s paroksizmalno ali kronično atrijsko fibrilacijo. V kontrolni skupini je bilo 15 bolnikov, ki niso imeli te motnje ritma. Bolniki z ishemično boleznijo srca v raziskavo niso bili vključeni.

3.2 Priprava vzorcev

Vzorci atrijev smo za določitev vsebnosti nevrotrofinov pripravili po protokolu, ki smo ga pripravili s pomočjo protokolov, opisanih v Zhang s sod. (2001) in Miklič s sod. (2004) (25, 45). Približno natančno smo natehtali 0,08 g tkiva in v razmerju 1:25 dodali raztopino

A. S homogenizatorjem Ultra Turrax T45 smo vzorce homogenizirali petkrat po 15 sekund pri maksimalni hitrosti. Sledila je še 10 sekundna sonikacija z ultrazvočnim razbijalcem. Iz homogenizata smo odvzeli vzorce za določanje proteinov. Preostalemu delu smo glede na volumen raztopine A dodali raztopino B (110,4 μL raztopine B za vsak mL raztopine A), ki je služila kot ekstrakcijski pufer. Vsebovala je tudi inhibitorje proteaz, ki so preprečili razgradnjo naših analitov. Vzorce smo vseskozi hranili na ledu. Za konec smo vzorce centrifugirali 30 min pri 46000g in 4°C in supernatant prenesli v Eppendorfovo epruveto. Tako pripravljene vzorce smo do analize hranili v zamrzovalniku pri -70°C.

3.3 Določanje celokupne koncentracije proteinov

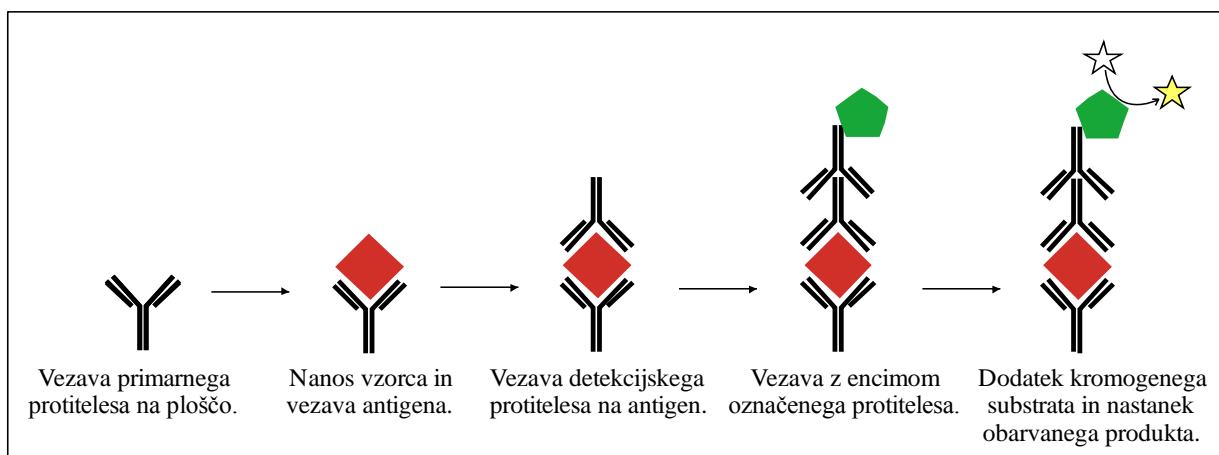
Za določanje celokupne koncentracije proteinov v vzorcih smo uporabili metodo Bio-Rad, ki temelji na Bradfordovi metodi določanja proteinov (46). Umeritveno krivuljo smo izdelali s pomočjo standardne raztopine govejega serumskega albumina v koncentracijah od 2,5 - 75 $\mu\text{g/mL}$. Slepri vzorec je predstavljala prečiščena voda. Na mikrotitrski plošče smo v dveh paralelkah nanesti po 160 μL slepega vzorca in standardnih raztopin ter po 8 μL vzorcev odvzetih po homogenizaciji. Slednjim smo dodali še 152 μL prečiščene vode, da je bil volumen v vseh vdolbinicah enak. Nato smo dodali 40 μL barvnega reagenta, 30 min inkubirali na sobni temperaturi in izmerili absorbanco pri 595 nm s čitalcem za mikrotitrski plošče (Synergy HT, BioTeck, ZDA).

Parametre umeritvene krivulje in koncentracije celokupnih proteinov v vdolbinici smo izračunali z računalniškim programom GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Prism Software, ZDA). Dobljeno koncentracijo smo še preračunali glede na začetni volumen vzorca in jo izrazili v mg.

3.4 Encimsko-imunska metoda za kvantitativno določevanje nevtrofinov

Nivoje nevtrofinov v vzorcih atrijev in seruma smo določili s pomočjo encimsko-imunskih metod (ELISA), ki so jih razvili v Laboratoriju za molekularno in celično farmakologijo in so opisane v Miklič s sod. (2004) in Mele s sod. (2010) (25, 47). Uporabili smo parne sisteme protiteles in standarde proizvajalca R&D Systems, ZDA, ki so omogočili specifično in kvantitativno določitev NGF, BDNF in NT-3 proteinov v

vzorcih. Metode so bile ovrednotene s predstavitvijo reprezentativne umeritvene krivulje, oceno občutljivosti, meje zaznavnosti, kvantitativne določitve, specifičnosti, statistično analizo ponovljivosti znotraj testa in ponovljivosti med testi ter izkoristka z metodo standardnega dodatka (25, 47). Princip metode predstavlja Slika 6.



Slika 6: Princip direktnega ELISA testa.

3.4.1 Postopek določanja NGF (NGF ELISA)

Vse uporabljene pufre smo pred začetkom dela prenesli na sobno temperaturo. Mikrotitrne plošče s 96 vdolbinicami (Nunc, Danska) smo za analizo pripravili tako, da smo v vdolbinice odpipetirali po 100 μL raztopine primarnega protitelesa v raztopini C s koncentracijo 0,4 $\mu\text{g/mL}$, ploščo prekrili s samolepilnim pokrovom in jo inkubirali čez noč pri sobni temperaturi. Na dan analize smo z ročnim spiralcem (Nunc-Immunowash 12, Danska) iz vdolbinic izsesali raztopino primarnega (lovilnega) protitelesa in jih trikrat sprali z raztopino D (puferna raztopina za spiranje). V vdolbinice smo nato odpipetirali po 300 μL raztopine E in s pokrovom prekrito ploščo 1 uro inkubirali pri sobni temperaturi, da so molekule govejega serumskega albumina zasedle nespecifična vezavna mesta na primarnem protitelesu. Zatem smo raztopino E odstranili, ploščo trikrat sprali z raztopino D in jo osušili.

Pripravili smo slepi vzorec in raztopine standarda NGF (1,9 - 250 pg NGF/mL) v raztopini E. Na ploščo smo v dveh paralelkah nanesti po 100 μL standardov, vzorce levega in desnega atrija ter seruma in njegove redčitve. Po 90 minutni inkubaciji pri 37°C smo plošče sprali z raztopino D, jih osušili in nanje odpipetirali po 100 μL sekundarnega

(detekcijskega) protitelesa (200 ng/mL). Ploščo smo inkubirali 2 uri pri sobni temperaturi, jo trikrat sprali in osušili. Pripravili smo raztopino encima (s streptavidinom konjugirana hrenova peroksidaza) v raztopini E s koncentracijo 1,25 mg/mL. V vsako vdolbinico smo nanegli 100 µL pripravljene raztopine in ploščo 20 min inkubirali pri sobni temperaturi ter zaščiteno pred svetlobo. Ploščo smo spet trikrat sprali in osušili. Raztopino encimskega substrata smo tik pred uporabo pripravili tako, da smo v enakem razmerju zmešali raztopini peroksida in kromogena. V vsako vdolbinico smo je odpipetirali po 100 µL. Ploščo smo inkubirali na sobni temperaturi, zaščiteno pred svetlobo 20 - 30 minut, dokler se ni razvila dovolj intenzivna barva. Brez spiranja smo v vdolbinice dodali še po 50 µL 1 M H₂SO₄, in prekinili nadaljnji potek barvne reakcije.

Absorbanco standardov in vzorcev smo spektrofotometrično določili s čitalcem za mikrotitrsko ploščo (Synergy HT, BioTeck, ZDA) pri valovni dolžini 450 nm in izvedli korekcijo pri 540 in 570 nm, da bi omejili vpliv optičnih nepravilnosti mikrotitrskih plošč. Iz umeritvene krivulje smo s programom GraphPad Prism 4.0 izračunali koncentracijo NGF v vdolbinici in jo preračunali na začetni volumen vzorca (dodani volumen raztopine A). Količino nevrotrofina smo izrazili glede na celokupno količino proteinov, kot pg nevrotrofina/mg proteinov.

3.4.2 Postopek določanja BDNF (BDNF ELISA)

Postopek za kvantitativno določitev BDNF proteina v preiskovanih vzorcih je bil enak, kot je opisano za določitev NGF, le da smo uporabili protitelesa proti BDNF. Na mikrotitrsko ploščo smo nanegli po 100 µL raztopine primarnega protitelesa proti BDNF, raztopljenega v raztopini C s koncentracijo 2 µg/mL. Standarde BDNF smo v raztopini G pripravili v koncentracijah od 5,85 do 375 pg BDNF/mL. Prav tako smo v raztopini G razredčili še vzorce seruma v razmerju 1:10. Po inkubaciji standardov in vzorcev smo na mikrotitrsko ploščo nanegli po 100 µL raztopine sekundarnega protitelesa proti BDNF v raztopini H s koncentracijo 100 ng/mL. Ploščo smo inkubirali 2 uri pri sobni temperaturi, jo nato trikrat sprali in osušili. Zadnje stopnje postopka, tj. vezavo encima, dodatek raztopine substrata, prekinitvev poteka barvne reakcije in merjenje absorbance smo izvedli tako, kot je opisano pri postopku za določanje NGF. Količino BDNF smo izračunali s pomočjo programa GraphPad Prism 4.0, na enak način kot smo to storili pri NGF.

3.4.3 Postopek določanja NT-3 (NT-3 ELISA)

Tudi NT-3 protein smo v preiskovanih vzorcih kvantitativno določili po enakem postopku kot NGF, le da smo uporabili protitelesa proti NT-3. Pripravili smo raztopino primarnega protitelesa proti NT-3 v raztopini C s koncentracijo 1 µg/mL in jo nanesli na ploščo (po 100 µL). Standarde NT-3 smo raztopili v raztopini G v koncentracijah od 5,85 do 375 pg NT-3/mL. Serumov tokrat nismo redčili, saj v vzorcih nismo pričakovali visokih vrednosti NT-3. Po inkubaciji standarov in vzorcev smo na mikrotitrne plošče nanesli po 100 µL raztopine sekundarnega protitelesa proti NT-3 v raztopini H s koncentracijo 200 ng/mL. Sledila je še dveurna inkubacija pri sobni temperaturi, trikratno spiranje in osušitev. Zadnje stopnje postopka smo izvedli tako, kot je opisano pri postopku za določanje NGF. S pomočjo programa GraphPad Prism 4.0 smo tudi količino NT-3 izračunali na enak način, kot je bil uporabljen pri NGF.

3.4.5 Obdelava in analiza podatkov

Koncentracije celokupnih celičnih proteinov in vrednosti proteinov NGF, BDNF in NT-3 v homogenatih atrijev in v serumu smo izračunali iz umeritvenih krivulj ustreznih metod s pomočjo računalniškega programa GraphPad Prism verzija 4.0 za Windows okolje (GraphPad Prism Software, ZDA). Rezultati so predstavljeni s srednjo vrednostjo in standardno napako ($x \pm SEM$). Podatke smo statistično obdelali s programom GraphPad Prism 5.0. Primerjali smo vrednosti nevrotrofinov v levem in desnem atriju pri kontrolni skupini in vrednosti v posameznem atriju in serumu med skupinama. Porazdelitev podatkov smo analizirali z D'Agostino-Pearsonovim testom normalnosti. V primeru, da so vrednosti v obeh primerjanih skupinah ustrezale normalni porazdelitvi, smo primerjavo izvedli s Studentovim t-testom za neodvisna vzorca. Kadar se je porazdelitev v eni ali v obeh skupinah značilno razlikovala od normalne, smo uporabili Mann-Whitneyev test. Za raven statistične značilnosti smo izbrali standardno vrednost vsaj 95 % intervala zaupanja ($p < 0.05$).

3.5 Izražanje genov

Podatke o izražanju genov smo pridobili v sodelovanju z Jasmino Živo Černe, mag. farm. z Inštituta za medicinsko genetiko Ginekološke klinike Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, kjer so analizo vzorcev tudi izvedli. V vzorcih levega in desnega atrija so z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času proučili izražanje genov za nevrotrofina NGF (*NGF*) in nevrotrofin-3 (*NTF3*) ter za nevrotrofinske receptorje p75^{NTR} (*NGFR*), TrkA (*NTRK1*), TrkB (*NTRK2*).

3.5.1 Princip metode

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času je zelo občutljiva metoda, ki omogoča eksponentno pomnoževanje odsekov DNA s hkratnim merjenjem količine produkta v vzorcu. S predhodnjim postopkom reverzne transkripcije pa je metoda široko uporabna tudi pri določanju izražanja genov.

Molekule mRNA so slabše stabilne in zelo občutljive na delovanje RNaz, zato jih po izolaciji iz tkiva pred nadaljno analizo s pomočjo reverzne transkriptaze prepíšemo v komplementarno DNA zaporedje. Izvedba PCR poteka s cikličnim spreminjanjem temperature in ponavljanjem treh korakov, ki jih v grobem sestavljajo denaturacija dvojne vijačnice, prileganje začetnih oligonukleotidov na enojne verige in sinteza komplementarne verige s termostabilno DNA polimerazo. Določevanje količine produkta tekom reakcije je v našem primeru omogočila uporaba TaqMan[®] sond. Gre za specifične oligonukleotide, ki se prilegajo na proučevano zaporedje DNA in imajo na 5'-koncu vezano reportersko barvilo, na 3'-koncu pa nefluorescentni dušilec. Dokler je sonda nedotaknjena, dušilec preprečuje fluorescenco barvila. Pri podaljševanju novo nastale verige, DNA polimeraza naleti na sondo, hibridizirano na matrično zaporedje, in reportersko barvilo odcepi. Ker se razdalja med barvilom in dušilcem poveča, slednji fluorescence ne duši več in to zaznamo kot njen porast.

3.5.2 Postopek izolacije molekul RNA

Za izolacijo mRNA iz tkiva atrijev so uporabili komplet RNAqueous®-4PCR Kit (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, ZDA) (48). Izolacija je potekala po naslednjih korakih:

Vzorcu (75 mg) so dodali 700 µl lizirajoče raztopine, ki vsebuje gvanidinijev tiocianat za lizo celičnih membran in inaktivacijo ribonukleaz ter ga homogenizirali s homogenizatorjem TissueLyser LT (Roche Diagnostics GmbH, Nemčija). Dodali so enak volumen 64% etanola in raztopino prenesli na filtrirno kolono. Med centrifugiranjem je raztopina stekla skozi filter in molekule mRNA so se vezale na membrano. Na enak način je sledilo spiranje, najprej s 700 µl raztopine 1 in zatem dvakrat s 500 µl raztopine 2/3. Molekule RNA so eluirali s 70 µl elucijske raztopine, ogrete na 80 °C (48).

3.5.3 Postopek sinteze komplementarne DNA

Molekule mRNA so v cDNA prepisali s pomočjo kompleta High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, ZDA) (49). V vdolbinice na mikrotitrski plošči so najprej nanесли raztopino, ki je vsebovala pufer, mešanico deoksinukleotidov (dNTP), oligonukleotidne začetnike, reverzno transkriptazo MultiScribe™, RNazni inhibitor in vodo brez nukleaz, nato pa še vzorce mRNA. Transkripcija je potekala pod pogoji, kot so navedeni v protokolu proizvajalca (49).

3.5.4 Postopek analize izražanja genov

Izražanje genov so analizirali z uporabo TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, ZDA) (50). Na ploščo s 384 vdolbinicami so nanесли po 10 µl reakcijske mešanice, ki je vsebovala:

- oligonukleotidne začetnike in sonde: ustrezen TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, ZDA),
- primerno redčeno raztopino cDNA in
- mešanico DNA polimeraze, reakcijskega pufra, deoksinukleotidov in MgCl₂: LightCycler® 480 Probes Master (Roche Diagnostics GmbH, Nemčija).

Endogeno kontrolo je predstavljal hišni gen za peptidilprolil izomerazo A (*PPIA*) (51). Analiza je potekala v napravi LightCycler[®] 480 System (Roche Diagnostics GmbH, Nemčija).

3.5.5 Obdelava in analiza podatkov

Rezultate RT-PCR analize smo obdelali z metodo relativne kvantifikacije, imenovane tudi metoda $2^{-\Delta\Delta C_T}$, ki izražanje proučevanega gena opiše normalizirano na notranji kontrolni gen in relativno na izbrano referenčno skupino (52). Dobljene vrednosti Ct (število ciklov, pri katerem fluorescenca doseže prazno vrednost) za proučevani gen smo normalizirali na vrednosti Ct endogenega kontrolnega gena in jih izrazili kot ΔC_T . Notranjo kontrolo je predstavljal hišni gen *PPIA* (51). Izražanje gena smo nato izrazili še relativno glede na referenčno skupino, kot $2^{-\Delta\Delta C_T}$, kjer $\Delta\Delta C_T$ predstavlja razliko med vrednostmi ΔC_T za izbrani in referenčni vzorec. Izražanje genov pri osebah z rednim ritmom smo izrazili relativno glede na desni atrij te skupine. Pri določanju genskega izražanja v levem in desnem atriju oseb z AF smo za referenčno skupino izbrali odgovarjajoči atrij kontrolne skupine. Rezultate smo predstavili s srednjo vrednostjo in standardno napako ($x \pm SEM$) in jih statistično obdelali s pomočjo programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Prism Software, ZDA). Za primerjavo skupin smo uporabili Studentov t-test in kot statistično pomemben rezultat izbrali vrednosti $p < 0,05$. Primerjali smo izražanje genov med atrijema v kontrolni skupini in izražanje v posameznem atriju med skupinama.

4 REZULTATI

4.1 Predstavitev preiskovancev

V pričujoči raziskavi je sodelovalo 34 bolnikov, ki smo jih razdelili v dve skupini. V kontrolno skupino smo vključili 15 bolnikov z rednim ritmom, v skupino z motnjo ritma (z atrijsko fibrilacijo - AF) pa smo uvrstili 19 bolnikov. Podatke o njihovem spolu in starosti podajamo v Tabeli II.

Tabela II: Demografski podatki o preiskovancih.

Skupina	Spol		Starost v letih \pm SD
	Moški	Ženske	
Kontrola (K)	10	5	65 \pm 14
Atrijska fibrilacija (AF)	10	9	73 \pm 9

V okviru predoperativnih priprav so bolnikom odvzeli kri in izvedli laboratorijske preiskave nekaterih elektrolitov, neproteinskih dušikovih spojin, označevalcev vnetja in krvnega sladkorja. Rezultate smo statistično obdelali in jih v obliki povprečnih vrednosti in standardnih odklonov (SD) predstavljamo v Tabeli III. Statistično značilnost razlike med vzorci bolnikov z rednim ritmom in bolnikov z atrijsko fibrilacijo smo preverili s Studentovim t-testom.

Povprečne vrednosti večine preiskav so v mejah referenčnih vrednosti (53), navzgor odstopajo povprečne vrednosti sečnine pri skupini z AF, klorida in glukoze pri obeh skupinah ter C-reaktivnega proteina pri kontrolni skupini. Statistično značilno razliko ($p = 0,02$) med skupinama smo ugotovili pri koncentraciji sečnine, saj je le-ta pri bolnikih v kontrolni skupini dosegla vrednost $5,89 \pm 1,94$ mmol/L, pri bolnikih z motnjo ritma pa $8,04 \pm 2,47$ mmol/L. Pri rezultatih ostalih laboratorijskih preiskav nismo ugotovili statistično pomembnih razlik med preiskovanima skupinama (Tabela III).

Tabela III: Rezultati predoperativnih laboratorijskih preiskav s statistično primerjavo skupin.

Preiskava	Referenčne vrednosti (53)	Kontrolna skupina		Atrijska fibrilacija		K : AF
		povprečna vrednost	SD	povprečna vrednost	SD	p vrednost [§]
S-glukoza [mmol/L]	3,6 - 6,1	7,54	2,02	7,40	2,78	0,92
S-sečnina [mmol/L]	2,8 - 7,5	5,98	1,94	8,04	2,47	0,02
S-kreatinin [μ mol/L]	44 - 97	74,8	30,02	89,56	24,95	0,20
S-kalij [mmol/L]	3,8 - 5,5	4,28	0,37	4,36	0,41	0,61
S-natrij [mmol/L]	135 - 145	143,18	2,36	142,69	2,41	0,60
S-klorid [mmol/L]	95 - 105	110,45	5,73	109,63	6,78	0,73
S-CRP [mg/L]	do 5	7,43	11,72	4,00	2,89	0,47
Kri-Levkociti [$10^9/L$]	4,0 - 10,0	8,62	3,56	7,60	2,38	0,43

K – kontrola; AF – atrijska fibrilacija; SD – standardni odklon; S – serum; [§]Studentov t-test

4.2 Vrednosti nevrotrofinov v serumu in tkivih atrijev človeškega srca

V prvem delu študije smo proučevali nivoje nevrotrofinov (NT) v vzorcih seruma in tkivih atrijev človeškega srca bolnikov obeh skupin. S pomočjo encimsko-immunske metode (ELISA) smo izmerili koncentracije živčnega rastnega dejavnika (NGF), nevrotrofičnega dejavnika možganskega izvora (BDNF) in nevrotrofina-3 (NT-3) v serumu ter vsebnost vseh treh nevrotrofinov v levem in desnem atriju bolnikov z rednim ritmom in bolnikov z atrijsko fibrilacijo. Rezultate smo statistično obdelali, za primerjavo skupin pa smo odvisno od porazdelitve podatkov uporabili Studentov t-test neodvisnih vzorcev ali Mann-Whitneyev test.

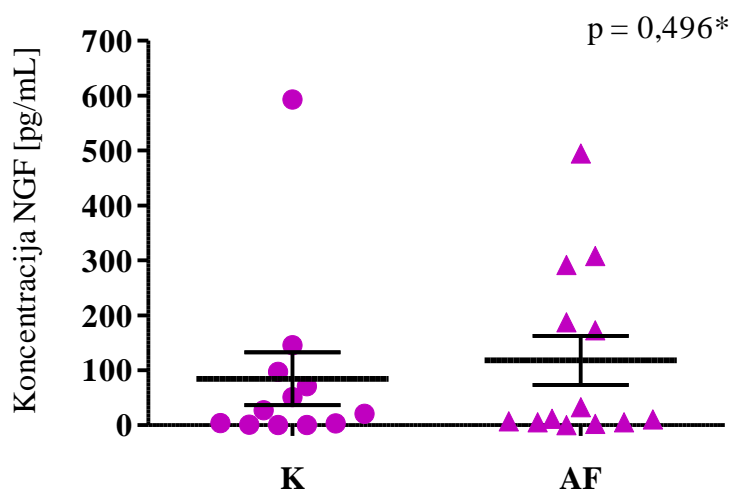
4.2.1 Serumske koncentracije nevrotrofinov

Podatki v literaturi kažejo, da se serumski nivoji nevrotrofinov v primeru nekaterih bolezenskih stanj ali motenj pomembno spremenijo (44, 54, 55). S proučevanjem nivojev nevrotrofinov v serumih bolnikov z rednim ritmom in tistih z motnjo ritma ter njihovo

primerjavo smo želeli ugotoviti, ali to velja tudi za AF, saj bi v slednjem primeru zaradi dostopnosti vzorca serumske koncentracije nevrotrofinov lahko služile kot napovedni dejavnik.

Serumska koncentracija NGF

Nivoji NGF, izmerjeni v serumskih vzorcih kontrolne skupine, so se nahajali v širokem koncentracijskem območju, od 0 do 592,7 pg/mL, vendar so bile vse vrednosti, z izjemo najvišje, nižje od 150 pg/mL (Slika 7). Opazili smo tudi, da je bila pri 25% bolnikov raven serumskega NGF nižja od meje detekcije ELISE ($< 1,5$ pg NGF/mL). Povprečna vrednost vseh meritev v kontrolni skupini je znašala $84,4 \pm 48,1$ pg/mL. Mediana vrednost NGF v kontrolni skupini je znašala 23,9 pg/mL (s spodnjo kvartilom 1,5 in z zgornjo kvartilom 90,4 pg/mL). Tudi v skupini bolnikov z AF je bil razpon izmerjenih koncentracij NGF širok, z vrednostmi v območju od 0 - 495,1 pg/mL, povprečna vrednost pa je znašala $117,9 \pm 44,7$ pg/mL (Slika 7). Mediana koncentracije NGF v skupini bolnikov z AF je bila nižja od kontrolne skupine in je znašala 11,7 pg/mL (s spodnjim kvartilom 5,5 in z zgornjim kvartilom 239,6 pg/mL).



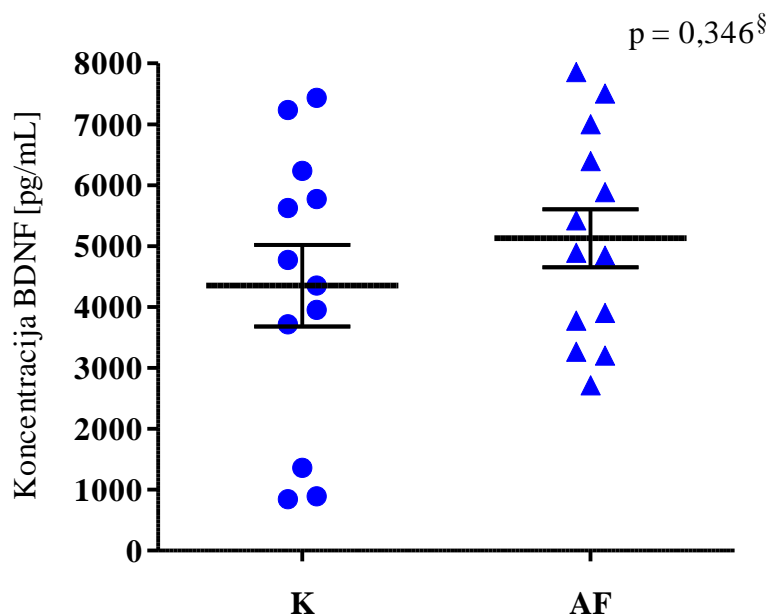
Slika 7: Serumske koncentracije živčnega rastnega dejavnika (NGF).

Točke predstavljajo vrednosti meritve posameznega vzorca, oznake pa povprečno vrednost \pm SEM. K - kontrolna skupina; AF - skupina z atrijsko fibrilacijo; *Mann-Whitneyev test

Statistična analiza podatkov je pokazala, da se merjene koncentracije NGF v obeh proučevanih skupinah bolnikov značilno razlikujejo od normalne porazdelitve (D'Agostino-Pearsonov test normalnosti; $p < 0,0001$). Skupini smo zato primerjali z neparametričnim Mann-Whitneyevim testom, ki je pokazal, da se serumski nivoji NGF pri bolnikih z atrijsko fibrilacijo ne razlikujejo značilno od nivojev NGF pri bolnikih z rednim ritmom ($p = 0,496$).

Serumska koncentracija BDNF

Izmerjene koncentracije serumskega BDNF so bile v naši raziskavi veliko višje od koncentracij ostalih dveh proučevanih nevrotrofinov. Vrednosti BDNF v serumu bolnikov z rednim ritmom so se gibale med 846,4 in 7432,7 pg/mL. Povprečna vrednost serumskega BDNF v kontrolni skupini je tako znašala $4349,8 \pm 668,4$ pg/mL (Slika 8). Razpon serumskih koncentracij BDNF v skupini bolnikov z AF je bil nekoliko ožji, z mejnima vrednostima 2715,6 in 7860,7 pg/mL ter s povprečno vrednostjo $5130,2 \pm 476,0$ pg/mL (Slika 8).

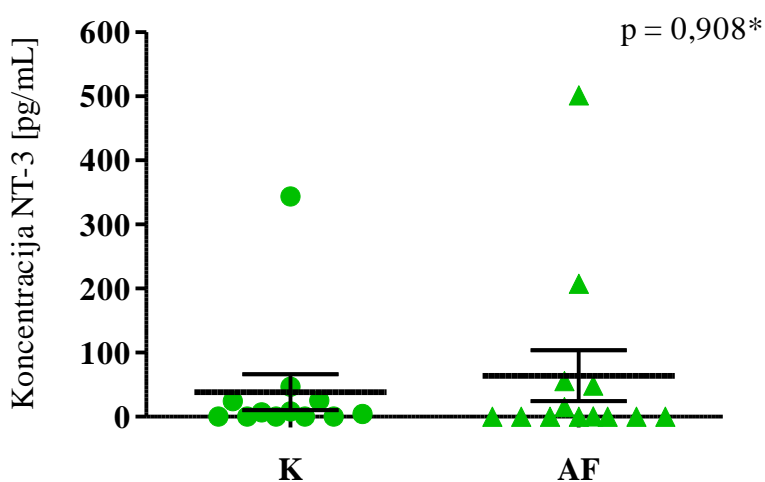


Slika 8: Serumske koncentracije nevrotrofičnega dejavnika možganskega izvora (BDNF). Točke predstavljajo vrednosti meritve posameznega vzorca, oznake pa povprečno vrednost \pm SEM. K - kontrolna skupina; AF - skupina z atrijsko fibrilacijo; [§]Studentov t test

Statistična analiza podatkov je pokazala, da so merjene koncentracije BDNF v obeh proučevanih skupinah bolnikov normalno porazdeljene (D'Agostino-Pearsonov test normalnosti; $p > 0,3$). Skupini smo primerjali s parametričnim Studentovim t testom, ki je pokazal, da se serumski nivoji BDNF pri bolnikih z atrijsko fibrilacijo ne razlikujejo značilno od nivojev BDNF pri bolnikih z rednim ritmom ($p = 0,346$) (Slika 8).

Serumska koncentracija NT-3

Rezultati merjenja serumskega NT-3 so pokazali, da so bile koncentracije tega nevrotrofina pri številnih preiskovancih zelo nizke. V kontrolni skupini smo sicer izmerili vrednosti NT-3 v območju od 0 – 343,9 pg/mL, a je bila večina izmerjenih koncentracij nižja od 50 pg/mL (povprečna vrednost: $38,2 \pm 28,1$ pg/mL) (Slika 9). Podobno smo opazili tudi pri bolnikih z atrijsko fibrilacijo, kjer sta bili najnižja in najvišja meritev 0 in 501,9 pg/mL (povprečna vrednost: $63,9 \pm 39,9$ pg/mL).



Slika 9: Serumske koncentracije nevrotrofina-3 (NT-3).

Točke predstavljajo vrednosti meritve posameznega vzorca, oznake pa povprečno vrednost \pm SEM. K - kontrolna skupina; AF - skupina z atrijsko fibrilacijo; *Mann-Whitneyev test

V kontrolni skupini je bila pri 41,7% bolnikov raven serumskega NT-3 nižja od meje detekcije ELISE ($< 2,9$ pg/mL), v skupini bolnikov z AF pa je bil delež takih vzorcev še višji in je znašal 61,5%. Mediana koncentracije NT-3 v kontrolni skupini je znašala 5,3

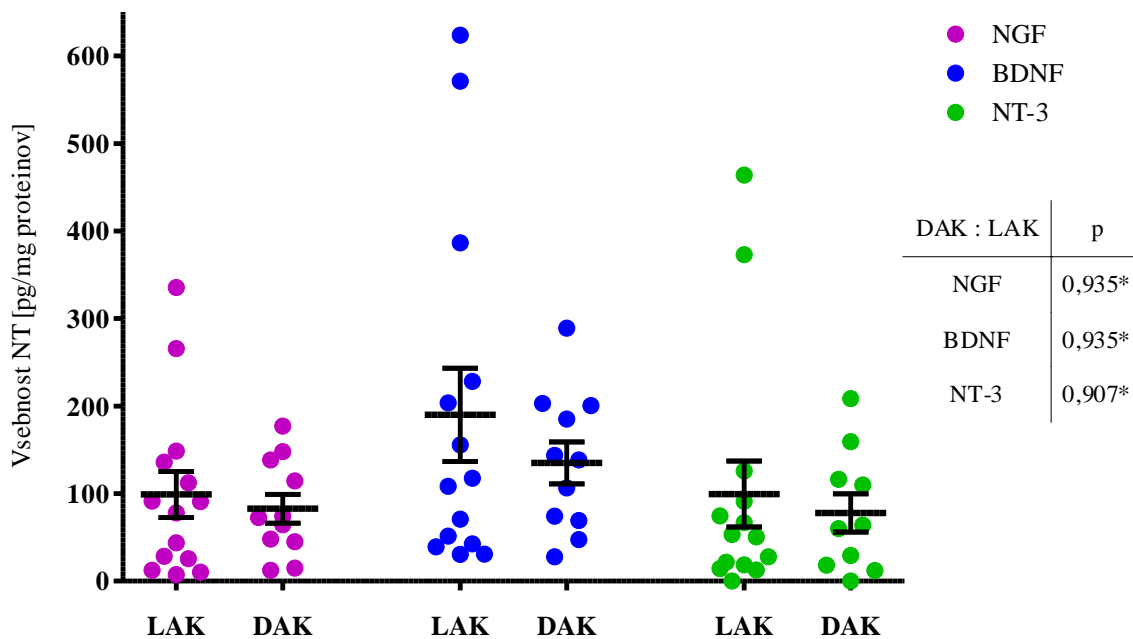
pg/mL (s spodnjim kvartilom 0 in z zgornjim kvartilom 25,0 pg/mL), v skupini bolnikov z AF pa je bila 0 pg/mL (z zgornjim kvartilom 52,4 pg/mL) (Slika 9). Skupini smo primerjali z neparametričnim Mann-Whitneyevim testom, ki je pokazal, da se serumski nivoji NT-3 pri bolnikih z atrijsko fibrilacijo ne razlikujejo značilno od nivojev NT-3 pri bolnikih z rednim ritmom ($p = 0,908$) (Slika 9).

4.2.2 Vsebnost nevrotrofinov v tkivih atrijev človeškega srca

V okviru raziskave smo določali vsebnost nevrotrofinov tudi v tkivih atrijev človeškega srca. V literaturi ni podatkov o koncentraciji nevrotrofinov v atrijih, poleg tega pa smo želeli pridobiti vpogled v morebiten vpliv motnje ritma srca na vrednosti NT, saj raven določene snovi v serumu ne odraža nujno stanja v posameznem tkivu. Pri bolnikih v kontrolni skupini in bolnikih z AF smo v vzorcih levega in desnega atrija določili vsebnost nevrotrofinov ter opravili primerjave znotraj posamezne skupine in med njima.

Bazalni nivoji nevrotrofinov v tkivih atrijev

Naše meritve so potrdile prisotnost vseh treh nevrotrofinov v homogenatih človeških atrijev v merljivih koncentracijah. NGF smo izmerili v koncentracijskem območju od 7,5 do 335,5 pg/mg proteinov v levem atriju (povprečna vrednost: $99,1 \pm 26,3$ pg/mg proteinov) in od 12,4 do 177,3 pg/mg proteinov v desnem atriju bolnikov iz kontrolne skupine (povprečna vrednost: $82,7 \pm 16,5$ pg/mg proteinov) (Slika 10). Izmerjeni nivoji BDNF so se v levem atriju gibali med 30,6 in 623,7 pg/mg proteinov (povprečna vrednost: $190,0 \pm 53,2$ pg/mg proteinov), v desnem atriju pa med 27,8 in 289,0 pg/mg proteinov (povprečna vrednost: $135,0 \pm 24,0$ pg/mg proteinov) (Slika 10). Koncentracije NT-3 so se v levem atriju gibale v območju od 0 do 463,9 pg/mg proteinov (povprečna vrednost: $99,6 \pm 37,6$ pg/mg proteinov) in od 0 do 208,5 pg/mg proteinov v desnem atriju kontrolne skupine bolnikov (povprečna vrednost: $77,8 \pm 21,9$ pg/mg proteinov) (Slika 10). Vzorca levega atrija, kjer smo v primeru vseh treh nevrotrofinov izmerili najvišjo ter drugo najvišjo vrednost, sta pripadala istima dvema osebam.



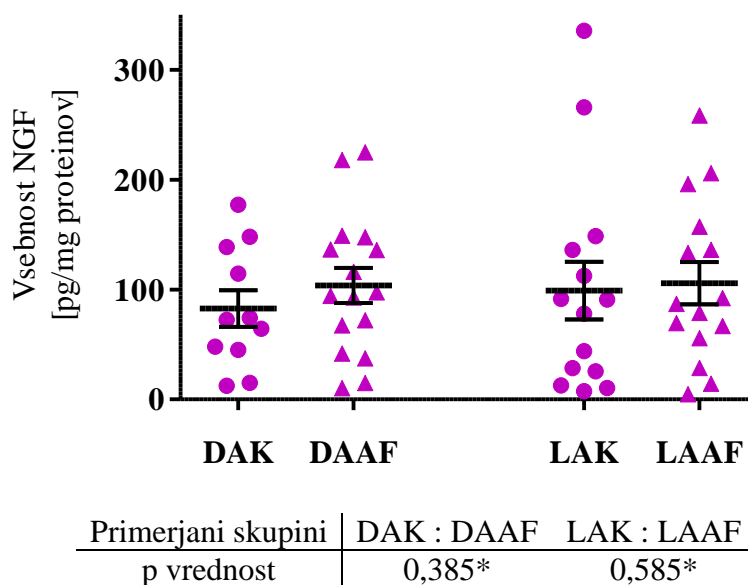
Slika 10: Bazalne vrednosti nevrotrofinov v atrijih bolnikov kontrolne skupine.

Točke predstavljajo vrednosti meritve posameznega vzorca, oznake pa povprečno vrednost \pm SEM. LAK - levi atrij kontrolne skupine; DAK – desni atrij kontrolne skupine; *Mann-Whitneyev test

Statistična analiza podatkov je pokazala, da se merjene koncentracije nevrotrofinov v levem atriju bolnikov v kontrolni skupini značilno razlikujejo od normalne porazdelitve (D'Agostino-Pearsonov test normalnosti; $p = 0,007 - 0,047$), medtem ko so vrednosti v desnem atriju normalno porazdeljene (D'Agostino-Pearsonov test normalnosti; $p = 0,534 - 0,757$). Opazili smo, da so nivoji proučevanih nevrotrofinov v desnem atriju nižji, vendar razlika med levim in desnim atrijem ni statistično značilna (Mann-Whitneyev test, p vrednosti podane v tabeli na Sliki 10).

Nivoji nevrotrofinov v tkivih atrijev človeškega srca po atrijski fibrilaciji

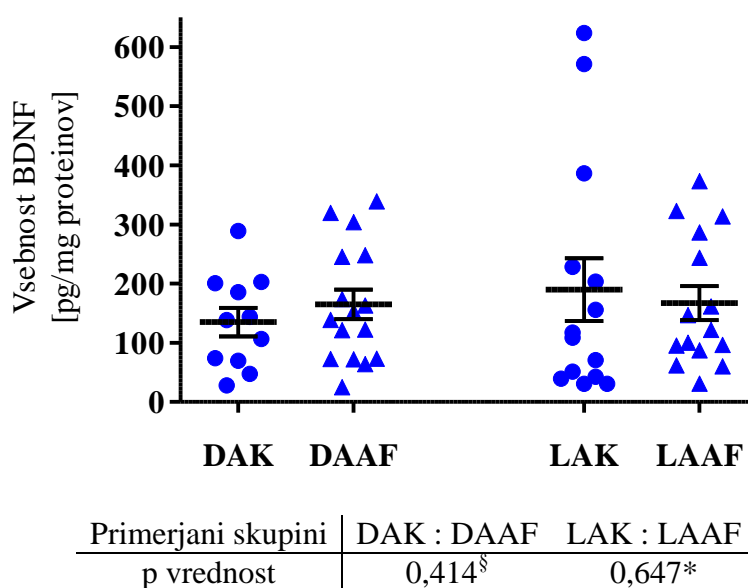
V homogenatih atrijev bolnikov z AF smo izmerili NGF v koncentracijskem območju od 4,7 do 258,6 pg/mg proteinov v levem atriju (povprečna vrednost: $105,7 \pm 19,2$ pg/mg proteinov) in od 10,2 do 225,0 pg/mg proteinov v desnem atriju (povprečna vrednost: $103,6 \pm 16,0$ pg/mg proteinov) (Slika 11). Raven NGF v desnem atriju je bila pri bolnikih z motnjo ritma 25,3% višja kot pri bolnikih v kontrolni skupini, vendar razlika ni bila statistično pomembna. V levem atriju se nivoji NGF niso razlikovali od vrednosti pri bolnikih v kontrolni skupini (tabela na Sliki 11).



Slika 11: Primerjava vsebnosti NGF v atrijih bolnikov z rednim ritmom in bolnikov z atrijsko fibrilacijo.

Točke predstavljajo vrednosti meritve posameznega vzorca, oznake pa povprečno vrednost \pm SEM. DAK – desni atrij kontrolne skupine; DAAF – desni atrij skupine z atrijsko fibrilacijo; LAK – levi atrij kontrolne skupine; LAAF – levi atrij skupine z atrijsko fibrilacijo; *Mann-Whitneyev test

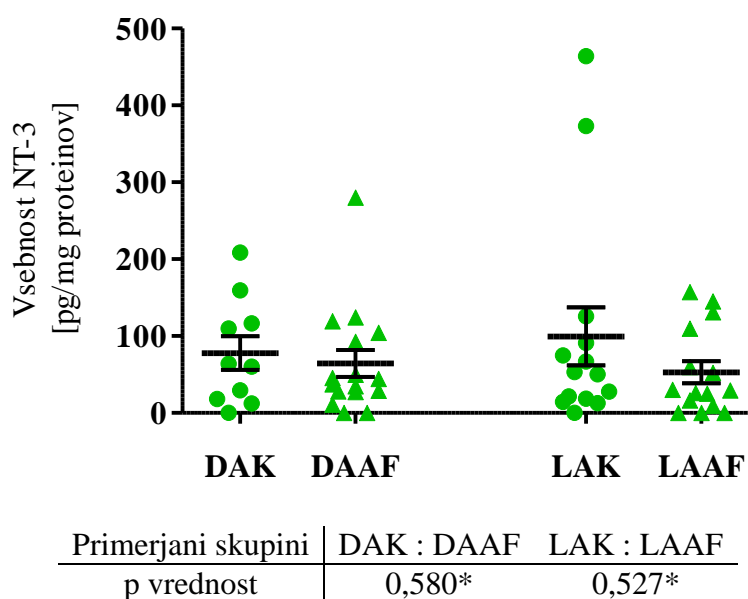
Koncentracije BDNF smo v vzorcih bolnikov z motnjo ritma izmerili v območju od 31,4 do 373,3 pg/mg proteinov v levem atriju (povprečna vrednost: $167,1 \pm 28,7$ pg/mg proteinov) in od 24,9 do 339,5 pg/mg proteinov v desnem atriju (povprečna vrednost: $164,9 \pm 24,8$ pg/mg proteinov) (Slika 12). Tako kot pri NGF smo tudi tu opazili 22,1% višji nivo BDNF v desnem atriju po atrijski fibrilaciji, a razlika ni bila značilna (tabela na Sliki 12). Prav tako ni bil statistično pomemben 12,1% padec nivojev BDNF v levem atriju po AF glede na vrednosti v kontrolnem atriju (tabela na Sliki 12).



Slika 12: Primerjava vsebnosti BDNF v atrijih bolnikov z rednim ritmom in bolnikov z atrijsko fibrilacijo.

Točke predstavljajo vrednosti meritve posameznega vzorca, oznake pa povprečno vrednost \pm SEM. DAK – desni atrij kontrolne skupine; DAAF – desni atrij skupine z atrijsko fibrilacijo; LAK – levi atrij kontrolne skupine; LAUF – levi atrij skupine z atrijsko fibrilacijo; [§]Studentov t test; *Mann-Whitneyev test

Raven NT-3 v homogenatu levega atrija bolnikov z motnjo ritma je bila v območju med 0 in 157,2 pg/mg proteinov (povprečna vrednost: $52,8 \pm 14,3$ pg/mg proteinov), v homogenatih desnega atrija pa v koncentracijskem območju med 0 in 280,3 pg/mg proteinov (povprečna vrednost $64,3 \pm 17,5$ pg/mg proteinov) (Slika 13). Rezultati so tako pokazali 17,3% padec vrednosti NT-3 v desnem atriju po atrijski fibrilaciji in kar 46,9% padec vsebnosti NT-3 v levem atriju po atrijski fibrilaciji v primerjavi s kontrolnimi atriji, vendar statistične značilnosti teh razlik nismo mogli potrditi (tabela na Sliki 13).



Slika 13: Primerjava vsebnosti NT-3 v atrijih bolnikov z rednim ritmom in bolnikov z atrijsko fibrilacijo.

Točke predstavljajo vrednosti meritve posameznega vzorca, oznake pa povprečno vrednost \pm SEM. DAK – desni atrij kontrolne skupine; DAAF – desni atrij skupine z atrijsko fibrilacijo; LAK – levi atrij kontrolne skupine; LAAF – levi atrij skupine z atrijsko fibrilacijo; *Mann-Whitneyev test

Rezultati prvega dela raziskave so pokazali, da motnja ritma nima pomembnega vpliva na bazalne vrednosti nevrotrofinov v serumu, saj v nobenem primeru nismo opazili statistično značilne razlike v primerjavi z bolniki z rednim ritmom. Prav tako se v prisotnosti atrijske fibrilacije ne spremeni vsebnost nevrotrofinov v tkivih atrijev človeškega srca.

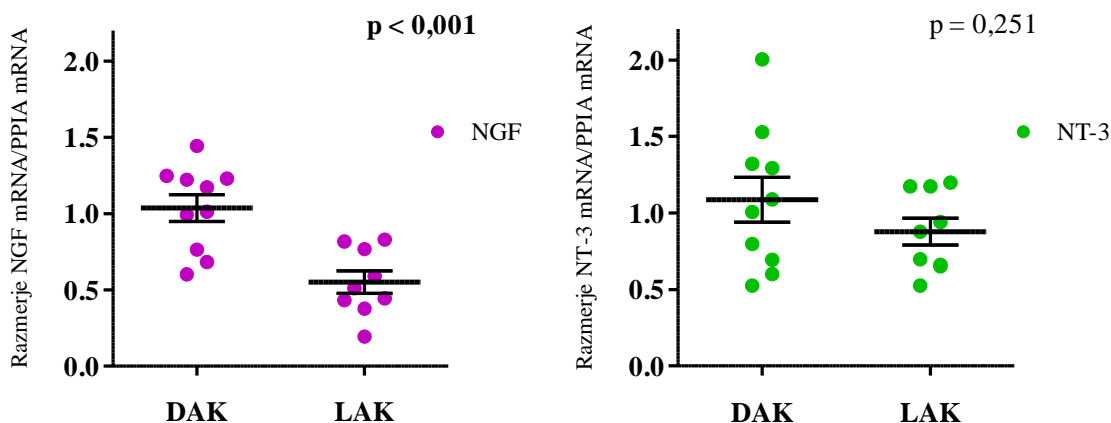
4.3 Izražanje genov

V literaturi ni podatkov o izražanju nevrotrofinov in njihovih receptorjev v tkivih atrijev človeškega srca, poleg tega tudi ni jasnega morebitnega vpliva motnje ritma srca na izražanje nevrotrofinskega sistema. V drugem delu raziskave smo zato v vzorcih levega in desnega atrija obeh proučevanih skupin z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) v realnem času proučevali nivoje izražanja genov za NGF in NT-3 ter za nevrotrofinske receptorje p75^{NTR}, TrkA in TrkB. Rezultate smo statistično obdelali, za primerjavo skupin pa smo uporabili Studentov t-test neodvisnih vzorcev.

4.3.1 Izražanje nevrotrofinov in receptorjev v kontrolni skupini

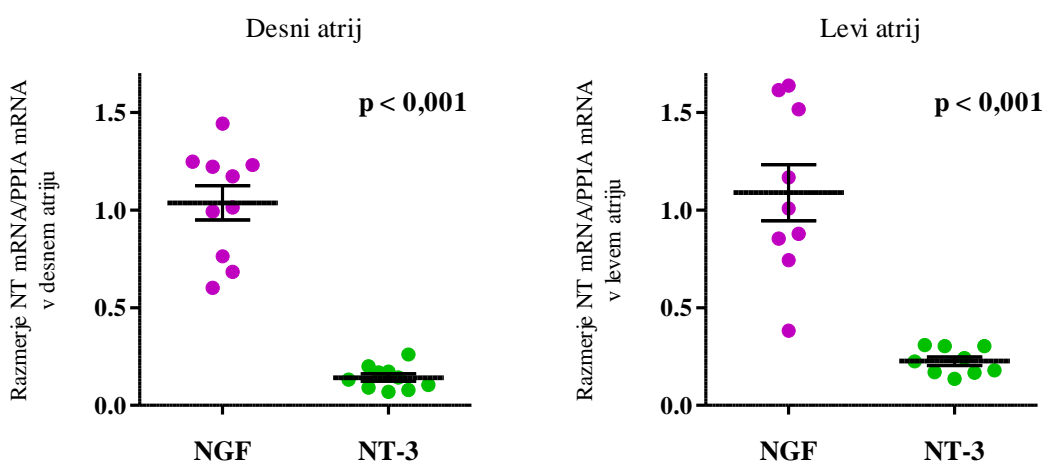
Naše meritve so potrdile izražanje genov, ki kodirajo nekatere nevrotrofine in nevrotrofinske receptorje v človeških atrijih. Rezultate meritev v atrijih bolnikov z rednim ritmom predstavljamo relativno glede na izbrano referenčno skupino, t.j. desni atrij.

Kvantitativna analiza je pokazala statistično pomembno (p < 0,001), 46,8% nižji nivo relativnega izražanja gena za NGF v levem atriju glede na desni atrij (Slika 14). Tudi izražanje gena za NT-3 je bilo za 19,1% nižje v levem atriju, vendar razlika med atrijema, tako kot pri vsebnosti proteina (Slika 10), ni bila značilna (Slika 14). Primerjava ravni izražanja obeh genov v levem ali desnem atriju bolnikov z rednim ritmom je pokazala statistično pomembno razliko (p < 0,001) med nivoji NGF mRNA in NT-3 mRNA v posameznem atriju (Slika 15). Zanimivo je, da te razlike ni bilo opaziti pri bazalni vrednosti proteinov v kontrolnih atrijih (Slika 10), kar kaže na pomembne razlike v regulaciji transkripcije in translacije obeh nevrotrofinov.



Slika 14: Izražanje gena za NGF in NT-3 v atrijih bolnikov z rednim ritmom.

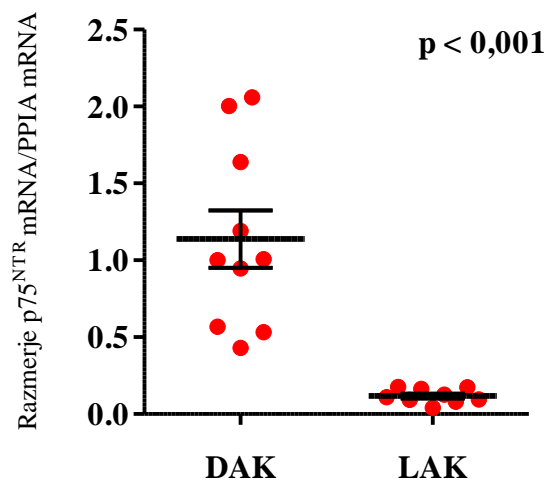
Točke predstavljajo relativne nivoje izražanja NGF mRNA in NT-3 mRNA glede na nivoje PPIA mRNA v posameznem vzorcu, oznake predstavljajo povprečno vrednost \pm SEM. DAK – desni atrij kontrolne skupine; LAK – levi atrij kontrolne skupine



Slika 15: Primerjava izražanja genov za NGF in NT-3 v atrijih kontrolne skupine.

Točke predstavljajo relativne nivoje izražanja NGF mRNA in NT-3 mRNA glede na nivoje PPIA mRNA v posameznem vzorcu, oznake predstavljajo povprečno vrednost \pm SEM. Meritve so prikazane relativno glede na izražanje gena za NGF.

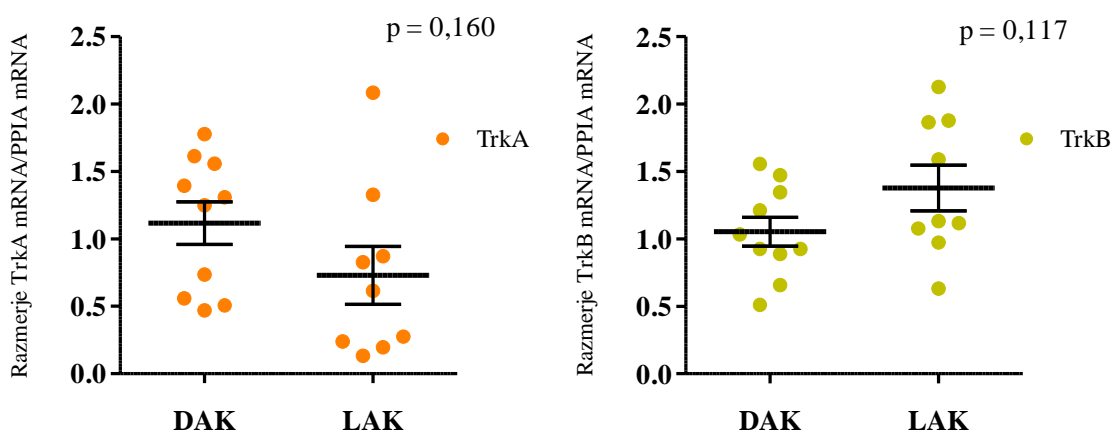
Kvantitativna analiza izražanja nevrotrofinskega receptorja p75^{NTR} je pokazala statistično značilno ($p < 0,001$), desetkrat nižjo vrednost v levem atriju kontrolne skupine glede na desni atrij (Slika 16).



Slika 16: Izražanje gena za p75^{NTR} v atrijih bolnikov z rednim ritmom.

Točke predstavljajo relativne nivoje izražanja p75^{NTR} mRNA glede na nivoje PPIA mRNA v posameznem vzorcu, oznake predstavljajo povprečno vrednost \pm SEM. DAK – desni atrij kontrolne skupine; LAK – levi atrij kontrolne skupine

Gen za receptor TrkA se je v manjši meri izražal v levem atriju, kjer je bilo izražanje za tretjino (34,6%) nižje kot v desnem atriju, vendar je statistična primerjava pokazala, da razlika ni bila značilna (Slika 17). V nasprotju z ostalimi proučevanimi geni se je *NTRK2*, gen, ki kodira TrkB, obsežneje izražal v levem atriju. Izražanje je bilo za 30,7% višje od tistega v desnem atriju, a tudi v tem primeru nismo ugotovili statistično pomembne razlike med atrijema (Slika 17).



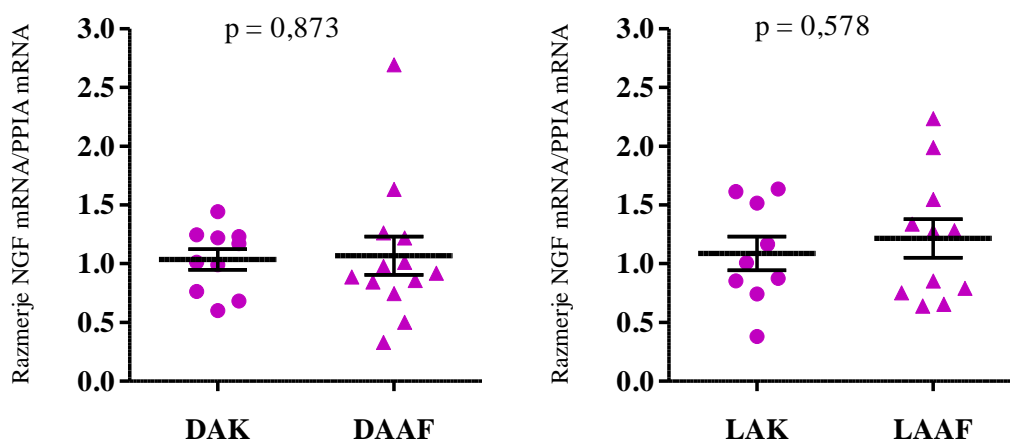
Slika 17: Izražanje genov za TrkA in TrkB v atrijih bolnikov z rednim ritmom.

Točke predstavljajo relativne nivoje izražanja TrkA mRNA in TrkB mRNA glede na nivoje PPIA mRNA v posameznem vzorcu, oznake predstavljajo povprečno vrednost \pm SEM. DAK – desni atrij kontrolne skupine; LAK – levi atrij kontrolne skupine

4.3.2 Izražanje nevrotrofinov in receptorjev v atrijih bolnikov z atrijsko fibrilacijo

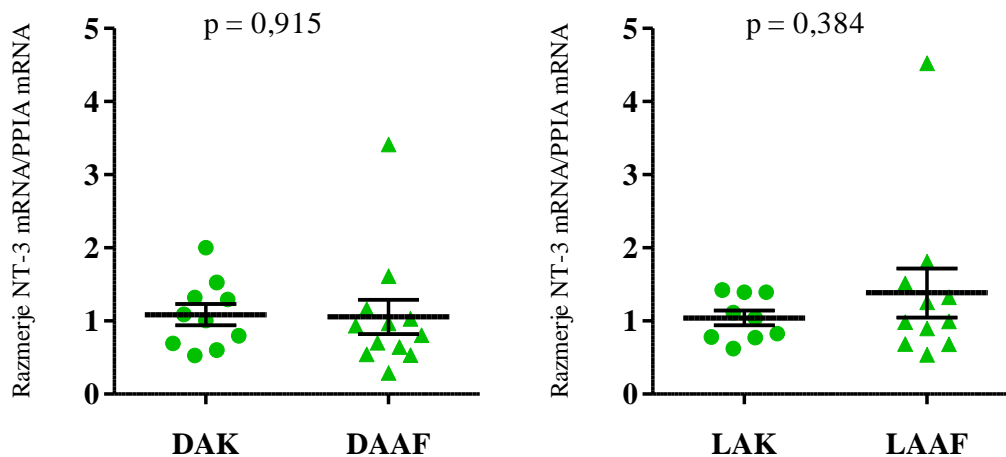
Rezultate izražanja genov v levem in desnem atriju bolnikov z AF smo predstavili relativno glede na odgovarjajoči atrij kontrolne skupine in preverili, ali se izražanje v posameznem atriju v prisotnosti atrijske fibrilacije spremeni.

Gen za NGF se je v desnem atriju bolnikov z AF izražal v enakem obsegu kot pri bolnikih z rednim ritmom, izražanje v levem atriju pa je bilo v prisotnosti motnje ritma za desetino višje, vendar razlika ni bila statistično pomembna (Slika 18).



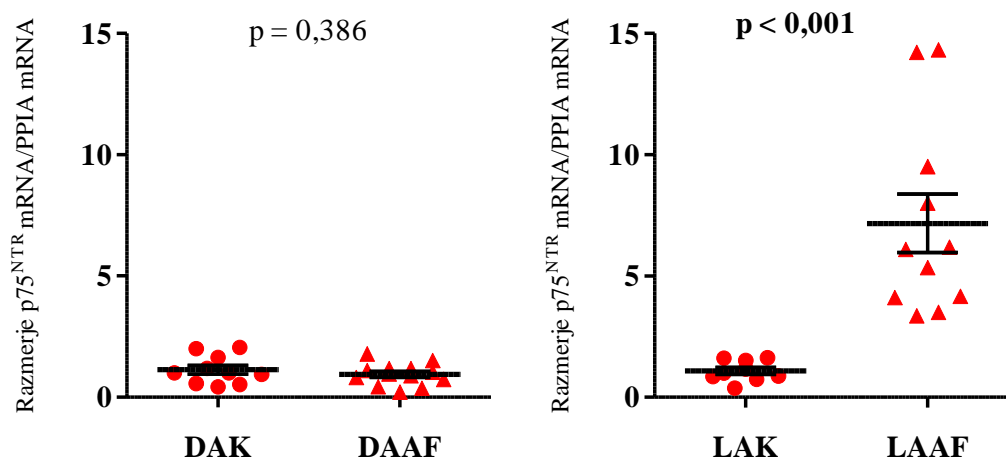
Slika 18: Izražanje gena za NGF v atrijih bolnikov z AF v primerjavi s kontrolno skupino. Točke predstavljajo relativne nivoje izražanja NGF mRNA glede na nivoje PPIA mRNA v posameznem vzorcu, oznake predstavljajo povprečno vrednost \pm SEM. DAK – desni atrij kontrolne skupine; DAAF – desni atrij skupine z atrijsko fibrilacijo; LAK – levi atrij kontrolne skupine; LAAF – levi atrij skupine z atrijsko fibrilacijo

Izražanje *NTF3*, gena, ki kodira NT-3, je bilo pri bolnikih z atrijsko fibrilacijo v desnem atriju enako kot pri bolnikih z rednim ritmom, medtem ko smo v levem atriju opazili 32,9% višje izražanje kot v kontrolni skupini. Statistična analiza je pokazala, da razlika ni bila statistično pomembna (Slika 19).



Slika 19: Izražanje gena za NT-3 v atrijih oseb z AF v primerjavi s kontrolno skupino. Točke predstavljajo relativne nivoje izražanja NT-3 mRNA glede na nivoje PPIA mRNA v posameznem vzorcu, oznake predstavljajo povprečno vrednost \pm SEM. DAK – desni atrij kontrolne skupine; DAAF – desni atrij skupine z atrijsko fibrilacijo; LAK – levi atrij kontrolne skupine; LAAF – levi atrij skupine z atrijsko fibrilacijo

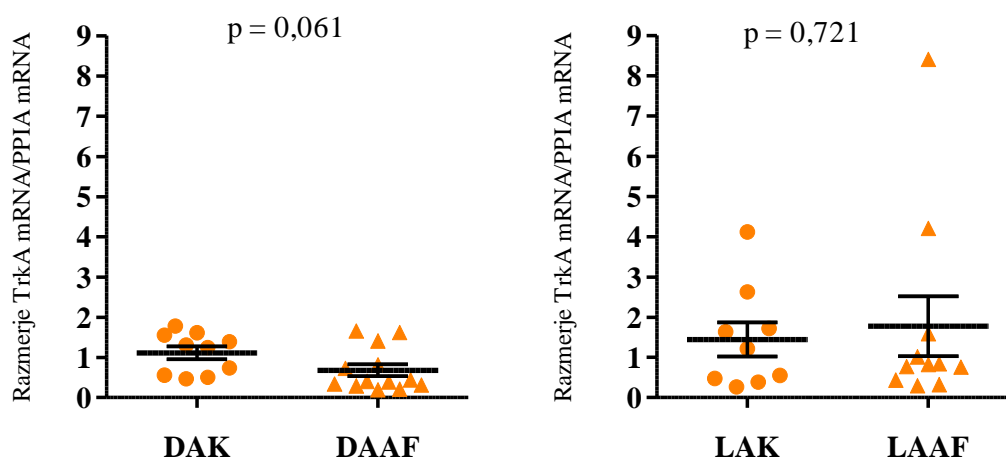
V desnem atriju bolnikov z atrijsko fibrilacijo smo določili manjše izražanje nevrotrofinskega receptorja p75^{NTR} kot pri bolnikih z rednim ritmom, vendar razlika med skupinama ni bila statistično pomembna (Slika 20). Nasprotno pa smo v levem atriju opazili statistično pomembno ($p < 0,001$), 6,5-kratno povečanje izražanje gena v pristonosti AF. Pri dveh bolnikih se je p75^{NTR} izražal skoraj 15-krat močneje kot pri bolnikih iz kontrolne skupine (Slika 20).



Slika 20: Izražanje gena za p75^{NTR} v atrijih bolnikov z AF v primerjavi s kontrolno skupino.

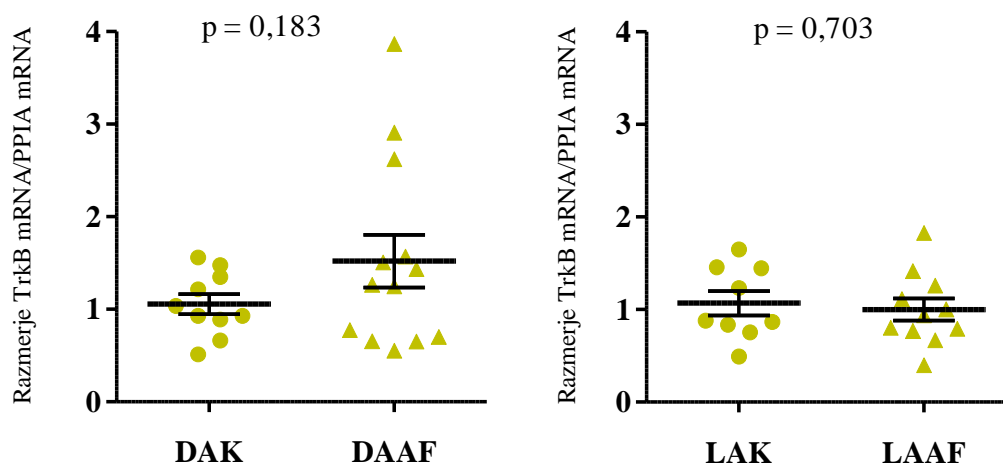
Točke predstavljajo relativne nivoje izražanja p75^{NTR} mRNA glede na nivoje PPIA mRNA v posameznem vzorcu, oznake predstavljajo povprečno vrednost \pm SEM. DAK – desni atrij kontrolne skupine; DAAF – desni atrij skupine z atrijsko fibrilacijo; LAK – levi atrij kontrolne skupine; LAAAF – levi atrij skupine z atrijsko fibrilacijo

Izražanje *NTRK1*, gena, ki kodira TrkA, v desnem atriju bolnikov z AF je bilo za 39,0% manjše kot pri bolnikih z rednim ritmom (Slika 21). Rezultat statistične primerjave je na meji značilnosti ($p = 0,061$), zato ne moremo z gotovostjo trditi, da je razlika med skupinama statistično pomembna. Izražanje gena za TrkA v levem atriju se med skupinama ni značilno razlikovalo, smo pa opazili, da se je *NTRK1* v nekaterih vzorcih izražal tudi do devetkrat močnejše, kot je bilo povprečje v skupini (Slika 21).



Slika 21: Izražanje gena za TrkA v atrijih oseb z AF v primerjavi s kontrolno skupino. Točke predstavljajo relativne nivoje izražanje TrkA mRNA glede na nivoje PPIA mRNA v posameznem vzorcu, oznake predstavljajo povprečno vrednost \pm SEM. DAK – desni atrij kontrolne skupine; DAAF – desni atrij skupine z atrijsko fibrilacijo; LAK – levi atrij kontrolne skupine; LAAF – levi atrij skupine z atrijsko fibrilacijo

Izražanje *NTRK2*, gena, ki kodira TrkB, je bilo v desnem atriju bolnikov z AF 44,1% višje kot pri kontrolni skupini (Slika 22). V levem atriju je bilo izražanje podobno v obeh skupinah, srednji vrednosti sta se razlikovali za manj kot 7% v prid kontrolni skupini. V nobenem primeru razlika ni bila statistično značilna (Slika 22).



Slika 22: Izražanje gena za TrkB v atrijih oseb z AF v primerjavi s kontrolno skupino.

Točke predstavljajo relativne nivoje izražanja TrkB mRNA glede na nivoje PPIA mRNA v posameznem vzorcu, oznake predstavljajo povprečno vrednost \pm SEM. DAK – desni atrij kontrolne skupine; DAAF – desni atrij skupine z atrijsko fibrilacijo; LAK – levi atrij kontrolne skupine; LAAF – levi atrij skupine z atrijsko fibrilacijo

Pri proučevanju genskega izražanja nekaterih nevrotrofinov in nevrotrofinskih receptorjev smo ugotovili, da je izražanje NGF in $p75^{\text{NTR}}$ pri bolnikih z rednim ritmom značilno višje v desnem atriju. Motnja ritma močno vpliva na izražanje nizkoafinitetnega nevrotrofinskega receptorja $p75^{\text{NTR}}$ v levem atriju, saj se njegovo izražanje močno poveča. Na meji statistične značilnosti obstaja tudi možnost, da se v prisotnosti AF zmanjša raven izražanja *NTRK1* v desnem atriju. Ostali nivoji izražanja proučevanih nevrotrofinov in receptorjev se v prisotnosti motnje ritma ne spremenijo.

5 RAZPRAVA

Električni signali se v avtonomnem živčevju srca prevajajo od desnega atrija (iz ritmovnika) najprej v ostale dele atrijev, preko AV vozla pa nato v prekate v točno določenih časovnih intervalih. Regulacija avtonomnega živčevja v srcu je verjetno sorodna regulaciji ostalih živčnih poti. Živčni sistem natančno uravnava delovanje srca, zato je oživčenost srca strogo kontrolirana. Pri tem sodelujejo nevrotrifini, ki preko uravnavanja različnih procesov nevronske aktivnosti določajo stopnjo simpatičnega prenosa v srcu (28). V srcih, ki jih je prizadela bolezen, se gostota oživčenosti spremeni, kar lahko vodi do neuravnotežene aktivacije živčevja in aritmij (39). Glede na fiziološko in patološko stanje organizma se spreminja tudi izražanje nevrotrifinov in njihovih receptorjev (20, 28). Obseg in posledice teh sprememb pri posameznih boleznih srca še niso raziskane.

V pričujočem delu smo proučevali možno vlogo izražanja nevrotrifinov v srcu pri motnji ritma srca, t.j. atrijski fibrilaciji (AF). Z uporabo encimsko-immunske metode in verižne reakcije s polimerazo (PCR) v realnem času smo v serumu in tkivih atrijev človeškega srca ugotovili, da prisotnost AF značilno ne vpliva na serumske koncentracije nevrotrifinov, prav tako tudi nima pomembnega vpliva na nivoje izražanja in na vsebnost nevrotrifinov v atrijih. Motnja ritma srca pa je povezana z izražanjem nekaterih nevrotrifinskih receptorjev, saj se v njeni prisotnosti značilno poveča izražanje gena za p75^{NTR} v levem atriju, na meji značilnosti pa je tudi znižanje ravni izražanja gena za TrkA v desnem atriju.

V raziskavo vključene bolnike smo razdelili dve skupini, v kontrolno skupino z bolniki z rednim ritmom ter v skupino z AF. Naši rezultati so omejeni z dejstvom, da kontrolne skupine niso sestavljali zdravi ljudje, ker atrijskega tkiva zaradi etičnih razlogov ne moremo dobiti, pač pa bolniki, predvideni za operacijo zaradi bolezni srčnih zaklopk. To nam je onemogočilo pravi vpogled v normalno aktivnost nevrotrifinskega sistema v zdravem srcu.

5.1 Serumske koncentracije nevrotrofinov

Podatki v literaturi kažejo, da se serumski nivoji nevrotrofinov v primeru nekaterih bolezenskih stanj ali motenj pomembno spremenijo (44, 54, 55). Določevanje in proučevanje teh nivojev je bilo za različne raziskovalne skupine zanimivo predvsem pri študiju vloge nevrotrofinov pri različnih vnetnih in neurodegenerativnih boleznih ter duševnih motnjah (54, 56, 57, 58). Raziskav, ki bi se ukvarjale z nivoji nevrotrofinov pri srčnožilnih boleznih, je malo, medtem ko serumske koncentracije nevrotrofinov v prisotnosti AF pred začetkom naše raziskave še niso bile znane.

Povprečna serumska vrednost NGF, ki smo jo izmerili v skupini bolnikov z rednim ritmom, je znašala $84,4 \pm 48,1$ pg/mL. Koncentracije NGF niso sledile normalni porazdelitvi, zato smo povprečno vrednost izrazili tudi v obliki mediane, ki je v tej skupini znašala 23,9 pg/mL (interkvartilni razpon 1,5 - 90,4 pg/mL). Naši rezultati so primerljivi z rezultati več študij (Glej Lang s sod. 2003 ; Hubold s sod., 2009), med drugim z objavljenimi rezultati Lang s sod., kjer so serumske koncentracije NGF proučevali na večjem številu zdravih oseb ($n > 100$) in določili srednjo vrednost $71,37 \pm 335$ pg/mL (56, 59). Tudi nemški raziskovalci so opazili nenormalno porazdelitev serumskih koncentracij NGF ter jo predstavili z mediano 19,68 pg/mL (interkvartilni razpon 11,06 - 41,74 pg/mL) (56). Primerjava obeh median kaže, da so serumski nivoji NGF pri naših bolnikih v kontrolni skupini kljub prisotnim boleznim zaklopki v skladu z nivoji NGF zdravih oseb.

Serumske koncentracije NGF, ki smo jih izmerili v naši študiji, se raztezajo v širokem območju, od 0 pg/mL do nekaj 100 pg/mL, kar priča o precejšnji fiziološki variabilnosti. O njej poročajo tudi v že omenjeni raziskavi, kjer so opazili še, da je bila pri 10% vzorcev koncentracija NGF višja od 164,16 pg/mL (56). Podoben delež visokih koncentracij smo zabeležili tudi mi, saj je bilo v kontrolni skupini 8,3% vrednosti višjih od 150 pg/mL. Visoka fiziološka variabilnost in nenormalna porazdelitev vrednosti sta verjetni razlog za razlike v povprečnih serumskih vrednosti NGF, ki so objavljene v literaturi. V manjših kontrolnih skupinah (do 25 prostovoljcev) so namreč določili serumske koncentracije NGF v širokem območju; $3,8 \pm 1,7$ pg/mL, $57,3 \pm 96,6$ pg/mL, 66 ± 18 pg/mL, $110,4 \pm 152,1$ pg/mL in $170,34 \pm 50,8$ pg/mL (56, 60).

V skupini z AF je bila povprečna vrednost ($117,9 \pm 44,7$ pg/mL) za 39,7% višja kot v kontrolni skupini, mediana pa z $11,7$ pg/mL (interkvartilni razpon $5,5 - 239,6$ pg/mL) za 51% nižja od mediane v kontrolni skupini. Tudi v tej skupini so se vrednosti nahajale v širokem koncentracijskem območju, vendar je bila porazdelitev izrazito dvodelna, saj je bilo 61,5% vrednosti nižjih od 33 pg/mL, ostale pa so bile višje od 170 pg/mL. Tudi v tem primeru je to verjetno posledica fiziološke variabilnosti, vendar je mogoč tudi vpliv drugih dejavnikov, ki so jim bili podvrženi proučevani bolniki. Znižanje nivoja NGF v plazmi so opazili pri kongestivni srčni odpovedi in akutnem koronarnem sindromu (43, 61), njegova raven v obtoku pa naraste pri vnetnem odgovoru, različnih avtoimunskih, alergijskih in metabolnih boleznih ter izpostavljenosti stresu (55, 60, 62, 63, 64). Mogoče je, da je bilo pri posameznem bolniku prisotno katero od teh stanj, vendar zaradi pomanjkanja informacij o celotnem zdravstvenem stanju sodelujočih tega ne moremo potrditi.

Povprečne serumske vrednosti BDNF, ki smo jih izmerili v naši raziskavi, so bile občutno višje kot serumske vrednosti NGF in NT-3. V skupini bolnikov z rednim ritmom smo določili $4349,8 \pm 668,4$ pg BDNF/mL, v skupini z atrijsko fibrilacijo pa $5130,2 \pm 476,0$ pg BDNF/mL (Slika 8). Podatki v literaturi kažejo, da se serumske vrednosti BDNF nahajajo v konc. območju od ~ 1 ng/mL pa do ~ 30 ng/mL (60, 65, 66). Tako je serumska koncentracija BDNF, ki je bila določena v skupini zdravih moških, znašala $5,76 \pm 0,68$ ng/mL (59). V raziskavi, ki je vključevala preko tisoč starejših oseb, so izmerili povprečno vrednost $7,79 \pm 3,32$ ng/mL, vendar so pri pripravi vzorcev uporabili postopek, ki je povečal količino zaznanega BDNF (54). Podoben nivo ($7,17 \pm 2,68$ ng/mL) so določili tudi drugi raziskovalci (67), ki ob tem za primerljivost rezultatov med študijami poudarjajo pomen priprave serumskih vzorcev. BDNF je namreč prisoten tudi v trombocitih in se med strjevanjem krvi iz njih sprošča (54, 58, 68), zato predvsem temperatura in čas strjevanja krvi določata količino iz trombocitov sproščenega BDNF in s tem serumsko koncentracijo (67). V naši raziskavi smo analizirali že pripravljene serumske vzorce in na potek koagulacije nismo imeli vpliva, vendar ujemanje naših rezultatov z omenjenimi študijami potrjuje, da so bili naši vzorci ustrezno pripravljene.

Na nivo BDNF v obtoku vplivajo tako življenjske navade (fizična aktivnost, prehrana) kot bolezenska stanja. Nižjo raven serumskega BDNF so določili pri depresiji in drugih duševnih motnjah ter pri različnih nevrodegenerativnih boleznih (54, 65, 67). Znano je, da

je raven BDNF povezana tudi s srčnožilnimi in metabolnimi boleznimi (44, 54, 66). Medtem ko so znižanje koncentracije BDNF v serumu opazili pri akutnem koronarnem sindromu (60), so višje plazemske koncentracije BDNF povezali z dejavniki tveganja za srčnožilne bolezni, kot so povišani diastolični krvni pritisk in plazemski lipidi, vendar še ni znano ali povišan BDNF prispeva k patogenezi ali gre za adaptivni odgovor na razvoj bolezni (69). V naši raziskavi smo v obeh skupinah izmerili vrednosti, ki se skladajo z vrednostmi, ki jih navaja literatura. Ker v celotno zdravstveno stanje in morebitne pridružene bolezni sodelujočih nismo imeli vpogleda, ni mogoče reči, ali so bile zgoraj omenjene povezave z drugimi bolezenskimi stanji prisotne tudi v našem primeru. Jasno je, da so imeli vsi pacienti tako napredovale bolezni zaklopki, da je bila potrebna operacija, in zato je pri njih smiselno pričakovati prisotnost različnih srčnožilnih dejavnikov tveganja. Ali so ti vplivali na povišanje nivojev tudi pri naših bolnikih, bi lahko v prihodnje preverili z analizo vzorcev zdravih oseb.

Raziskav, ki bi proučevale serumske koncentracije NT-3, ni veliko in nivoji tega nevrotrofina pri večjem številu zdravih oseb še niso znani. Območje, v katerem se vrednosti običajno nahajajo, je tako težje določiti, saj se rezultati manjših raziskav ponekod zelo razlikujejo.

Pri našem delu smo v večini vzorcev določili precej nizke serumske koncentracije NT-3. Večina izmerjenih koncentracij je bila nižja od 60 pg/mL, višjo vrednost smo izmerili le pri enem bolniku (8,3%) iz kontrolne skupine in pri dveh bolnikih (15,4%) z atrijsko fibrilacijo. V prvi skupini je imelo raven NT-3 pod mejo detekcije encimsko-immunskega testa 41,7% bolnikov, v skupini z AF pa je bilo takih vzorcev kar 61,5%. Koncentracije v nobeni skupini niso bile normalno porazdeljene, zato smo za predstavitev srednje vrednosti meritev uporabili še mediano, ki je znašala 5,3 pg/mL (interkvartilni razpon 0 - 25,0 pg/mL) v kontrolni skupini in 0 pg/mL (z zgornjim kvartilom 52,4 pg/mL) v skupini bolnikov z AF. Sprva smo predvidevali, da je precejšnje število rezultatov pod mejo detekcije povezano s dejstvom, da so naš vzorec predstavljale bolne osebe, vendar smo kasneje podobne rezultate zasledili tudi v literaturi. Raziskovalci v manjših kontrolnih skupinah zdravih oseb NT-3 v serumu praktično niso zaznali oz. so bile vrednosti, kot je mogoče razbrati iz grafične predstavitve podatkov, zelo blizu 0 (57, 63, 70).

Presenetljivo je, da so v dveh drugih študijah, prav tako v zdravih kontrolnih skupinah izmerili zelo visoke nivoje NT-3 v obtoku ($1,3 \pm 2,3$ ng/mL in $2,9593 \pm 2,555$ ng/mL) (55, 60). Čemu gre pripisati to razliko, zaenkrat še ni jasno. Pri osebah s stabilno angino pectoris in osebah z bolečinami v prsih brez zožitve koronarnih arterij so določili plazemske koncentracije NT-3 v območju od 365 – 606 pg/mL (44). Pri našem delu je bila blizu tem vrednostim le najvišja koncentracija v posamezni skupini, ki je znašala 343,9 pg/mL pri bolnikih brez motnje ritma in 501,9 pg/mL pri bolnikih z AF. Kako posamezne srčnožilne bolezni vplivajo na raven NT-3 v krvi, še ni znano, so pa opazili njegovo povišanje pri nekaterih vnetnih boleznih in psihiatričnih motnjah (70).

Statistična primerjava nivojev nevrotrofinov med bolniki z atrijsko fibrilacijo in bolniki z rednim ritmom je pokazala, da med njimi značilne razlike ni ($p_{(NGF)} = 0,496$; $p_{(BDNF)} = 0,346$; $p_{(NT-3)} = 0,908$). Viri nevrotrofinov v serumu so različni in na njihovo raven lahko vplivajo številni dejavniki, vendar naši rezultati kažejo, da AF ni med njimi. Možnost, da vpliv AF sicer obstaja, a ni dovolj obsežen, da bi se izrazil tudi v serumu, izključujejo rezultati analize atrijskega tkiva, kjer pomembne spremembe v nivojih NT prav tako nismo odkrili.

Kontrolne skupine v našem primeru niso predstavljale zdrave osebe, temveč bolniki, pri katerih je bila predvidena operacija zaradi bolezni zaklopk, kar je morda vplivalo na našo zmožnost zaznavanja razlik. V prihodnje bi lahko proučili raven NT v serumu krvodajalcev in na ta način enostavno opravili primerjavo s skupino zdravih oseb. Na podlagi naših rezultatov zaenkrat ne moremo trditi, da je serumska koncentracija nevrotrofinov kazalec atrijske fibrilacije.

5.2 Vsebnost in izražanje nevrotrofinov in njihovih receptorjev v tkivih atrijskega človeškega srca

V nasprotju z nivoji nevrotrofinov v telesnih tekočinah človeka, ki so v literaturi dobro opisani, je raziskav, ki so se ukvarjale z določevanjem nivojev izražanja nevrotrofinov in njihovih receptorjev v srčnih tkivih, malo. S proučevanjem nevrotrofinske aktivnosti atrijskega tkiva v prisotnosti atrijske fibrilacije tako dobimo boljši vpogled v poznavanje fiziološke in patofiziološke vloge nevrotrofinov v tkivih človeškega srca.

5.2.1 Vsebnost in izražanje nevrotrofinov v tkivih atrijev človeškega srca

Bazalni nivoji nevrotrofinov in njihovih genov v tkivih atrijev človeškega srca

Bazalne vrednosti vseh treh nevrotrofinskih proteinov, ki smo jih izmerili v kontrolni skupini preiskovanih bolnikov, se med levim in desnim atrijem človeškega srca ne razlikujejo (Slika 10). Pri vseh treh je bila vsebnost v homogenatu desnega atrija za 15 - 30% nižja kot v homogenatu levega atrija, vendar v nobenem primeru razlika ni bila statistično značilna.

V nasprotju z nivojem proteina se je gen za NGF v značilno ($p < 0,001$) manjšem obsegu izražal v levem atriju, kjer je bila raven njegovega izražanja kar za 46,8% nižja kot v desnem atriju (Slika 14). Glede na to, da je oživčenost levega atrija visoka, saj je klinično le levi atrij razlog za pojav atrijske fibrilacije (3), bi v levem atriju pričakovali višje nivoje NGF kot v desnem, saj je znano, da se stopnja njegovega izražanja ujema z gostoto oživčenosti (32). Naše ugotovitve so delno primerljive z rezultati pravkar objavljene študije Saygili s sod. (2011), kjer so proučevali nivoje izražanja in NGF proteina na srčnih mišičnih celicah (miocitih) podgane različnih starosti. Ugotovili so, da je koncentracija NGF v miocitih desnega atrija mladih (6-8 tednov) in starejših (20-24 mesecev) podgan nižja v primerjavi z miociti levega atrija enako starih živali, medtem ko se nivoji izražanja NGF med levim in desnim atrijem srca različno starih živali ne razlikujejo (71). Za kritično primerjavo rezultatov moramo upoštevati dejstvo, da so v tej raziskavi proučevali izolirane srčne mišične celice podgan, medtem ko smo pri našem delu analizirali homogenate človeških atrijev, ki so vsebovali celice (miocite) avrikla ob vstopu "vene cavae". Na podlagi naših rezultatov ne moremo ugotoviti, ali je razlika v izražanju NGF med atrijema normalno stanje ali posledica morebitnih patoloških sprememb, saj smo imeli v kontrolni skupini bolnike brez aritmij. Raziskave namreč kažejo, da se izražanje NGF poveča v bližini tistega dela srca, ki ga je prizadel infarkt in zmanjša pri kongestivni odpovedi srca, ki sta pogosto povezana z boleznimi zaklopk (42, 43, 72).

Izražanje gena za NT-3 se med atrijema ni pomembno razlikovalo, čeprav je bilo v levem atriju 19,1% nižje kot v desnem atriju (Slika 14). Opazili smo, da je bilo izražanje gena za NT-3 v obeh atrijih značilno nižje od izražanje gena za NGF ($p < 0,001$) (Slika

15), česar na ravni proteina nismo potrdili (Slika 10). Omenjeni rezultat kaže na različne, zaenkrat malo poznane mehanizme uravnavanja transkripcije in translacije obeh nevrotrofinov v srcu. Znano je, da vazokonstriktorni peptid endotelin-1 v srčnih mišičnih celicah spodbuja izražanje NGF (73) in zmanjša izražanje NT-3 (38). Uravnavanje izražanja nevrotrofinov je tudi celično specifično, saj npr. endotelin-1 ne vpliva na sintezo NGF v srčnih fibroblastih (71, 73).

Nivoji nevrotrofinov in njihovih genov v tkivih atrijev človeškega srca v prisotnosti atrijske fibrilacije

Bazalne nivoje nevrotrofinov smo primerjali z vrednostmi nevrotrofinov v prisotnosti atrijske fibrilacije. Vsebnost NGF v levem atriju je bila primerljiva s kontrolno skupino, v desnem atriju pa je bila za 25,3% višja (Slika 11). Izražanje gena se v obeh atrijih med skupinama ni razlikovalo za več kot desetino (Slika 18). Čeprav v skupini bolnikov z atrijsko fibrilacijo značilnih sprememb v nivojih NGF nismo opazili ne na ravni proteina ne pri izražanju gena, njegove vpletenosti v procese atrijske fibrilacije ne moremo izključiti. Študija na atrijskih srčnih mišičnih celicah podgan je pokazala, da nivo NGF proteina s starostjo poraste in morda predstavlja refleksni odgovor na s starostjo povezano naraščanje apoptoze v srcu (71). S preprečevanjem apoptoze v srčnih mišičnih celicah NGF lahko ugodno vpliva na manjši razvoj fibroze, ki je pri bolnikih z AF pogosto prisotna in to motnjo vzdržuje (8, 37). Znano je, da se pojavnost atrijske fibrilacije močno poveča s starostjo (12). NGF na atrijsko fibrilacijo vpliva s svojim delovanjem na živčevje, saj ugotavljajo, da razvoj te motnje ritma poleg električnega in strukturnega preoblikovanja atrijev povzroča tudi preoblikovanje avtonomnega živčevja (3, 8, 74). Povečana heterogenost simpatične oživčenosti s povzročanjem neenakomernih elektrofizioloških lastnosti atrijev lahko spodbuja AF. Heterogena oživčenost je prostorsko povezana z neenakomerno refraktarnostjo tkiva, simpatična denervacija atrijev pa poveča razpršenost refraktarnosti, kar povzroči fibrilacijo atrijev (74, 75, 76). Študija na bolnikih z perzistentno atrijsko fibrilacijo je pokazala heterogeno povečanje simpatične oživčenosti atrijev (34), vendar razlik v izražanju NGF v primerjavi s skupino z rednim ritmom v tej raziskavi, tako kot pri našem delu, ni bilo. Vendar pa je znano, da povečano izražanje NGF povzroča prekomerno simpatično oživčenost (33, 77). Študija na miših, ki prekomerno izražajo NGF, je pokazala podaljšano trajanje akcijskega potenciala v srčnih mišičnih

celicah prekatov (77). Podaljšanje učinkovite refraktarne dobe ni ugodno za nastanek AF, vendar se lahko aritmija razvije zaradi neenakomerne repolarizacije in ponovnega vstopanja impulza. Prav tako lahko podaljšani akcijski potenciali vodijo do nastanka naknadnih depolarizacij in ektopičnega sproženja impulza (77). Čeprav so ti mehanizmi pri AF lahko prisotni, pa možnosti, da potekajo v večji meri, nasprotujejo naše ugotovitve in ugotovitve drugih raziskovalcev (34), da atrijska fibrilacija ne vpliva na nivo NGF v tkivih atrijev človeškega srca.

Vsebnost BDNF je bila v desnem atriju bolnikov z AF za 22,1% višja in v levem atriju za 12,1% nižja kot pri bolnikih v kontrolni skupini, vendar razlika ni bila značilna (Slika 12). V nadaljevanju študije bo potrebno proučiti izražanje gena za BDNF, saj so ugotovili, da je v živčnih celicah njegovo izražanje uravnava tudi s tokom kalcijevih ionov skozi L-tip kalcijevih kanalov (19). Pri dolgotrajni AF se srčna mišična celica na obremenitev s kalcijem zaradi hitrega sproženja akcijskih potencialov odzove prav z zmanjšanjem izražanja te vrste kalcijevih kanalov (3). BDNF bi lahko pri AF sodeloval s povzročanjem oksidativnega stresa, ki pri tej motnji spremeni elektrofiziološke lastnosti srčnih mišičnih celic in prispeva k preoblikovanju atrijev (78, 79). Ugotovili so, da je glavni vir superoksidnih anionov v atrijskih srčnih mišičnih celicah človeka NAD(P)H oksidaza in da se njena aktivnost pri AF poveča (79). BDNF v gladkih mišičnih celicah koronarnih arterij in v živčnih celicah možganske skorje z aktivacijo NAD(P)H oksidaze povečuje nastajanje superoksidnih anionov, vendar še ni znano, ali enako deluje tudi v srčnih mišičnih celicah (44, 80). Naši rezultati pomembnih sprememb v nivojih BDNF pri AF niso odkrili, zato povezanost med BDNF, oksidativnim stresom in AF brez nadaljnjih raziskav ostaja le hipoteza.

Vsebnost NT-3 se v prisotnosti AF ni značilno spremenila, čeprav je bila v desnem atriju za 17,3%, v levem pa kar za 46,9% nižja kot v skupini bolnikov z rednim ritmom (Slika 13). Prav tako je na enaki ravni ostalo izražanje njegovega gena v desnem atriju. V nasprotju s padcem vsebnosti proteina se je izražanje v levem atriju v prisotnosti AF za 32,9% povišalo, a tudi ta razlika ni bila značilna. NT-3 preko aktivacije svojega specifičnega TrkC receptorja vodi do hipertrofije srčnih mišičnih celic, a se njegovo izražanje v modelu hipertrofirane srca nepričakovano zmanjša, verjetno z namenom zaščite (38). Ker je ena izmed posledic dolgotrajne AF preoblikovanje atrijev, za katerega

je značilna tudi hipertrofija celic, bi lahko pri bolnikih z AF pričakovali manjše izražanje NT-3 (8, 41). V levem atriju smo sicer opazili skoraj polovični padec vsebnosti in hkrati nepričakovano za tretjino višje izražanje gena glede na kontrolno skupino, vendar je statistična analiza pokazala, da spremembe niso značilne. Ker lahko hipertrofija spremlja tudi bolezen zaklopk, je mogoče, da bi morebitne spremembe v nivojih NT-3 opazili šele v primerjavi s skupino preiskovancev brez bolezni srca.

Naši rezultati kažejo, da se nivoji nevrotrofinov v tkivih atrijev človeškega srca pod vplivom atrijske fibrilacije ne spremenijo značilno, zato na podlagi njihovih vrednosti ne moremo predvideti prisotnosti te motnje ritma. Nevrotrofinom pripisujemo zaščitno vlogo, vendar je njihovo delovanje lahko tudi neželeno in povezano s procesi heterogene oživčenosti, oksidativnega stresa in hipertrofije (33, 38, 44). Ti procesi so pomembni dejavniki pri razvoju atrijske fibrilacije, vendar ne spremljajo samo te motnje, temveč so skupni številnim patološkim spremembam v srcu. To je verjetno tudi razlog, da v naši raziskavi nismo opazili več razlik, saj so tudi kontrolno skupino predstavljali bolniki z boleznimi srca.

5.2.2 Izražanje nevrotrofinskih receptorjev v tkivih atrijev človeškega srca

Bazalni nivoji izražanja nevrotrofinskih receptorjev v tkivih atrijev človeškega srca

Pri bolnikih z rednim ritmom sta se gena receptorjev $p75^{NTR}$ in TrkA v manjši meri izražala v levem atriju. Desetkratna razlika med atrijema je bila zelo značilna v primeru $p75^{NTR}$ ($p < 0,001$) (Slika 16), tretjinski padec izražanja gena za TrkA v levem atriju pa ni bil značilen ($p = 0,160$) (Slika 17). Nižji nivo izražanja gena za $p75^{NTR}$ v homogenatu levega atrija se sklada z manjšim izražanjem gena za NGF v tem delu srca (Slika 14). $p75^{NTR}$ je nespecifični receptor vseh nevrotrofinov, ki z interakcijami s Trk receptorji tvori visokoafinitetno vezavno mesto, preko katerega nevrotrofinske molekule spodbujajo preživetje in funkcijo tarčne celice (20). Z omejenim izražanjem tega receptorja se atrijsko tkivo prilagaja nižjim nivojem NGF in specifičnega receptorja TrkA, s tem skrbi za ravnovesje med receptorjema in omejuje pretirano aktivacijo $p75^{NTR}$, ki s proapoptotskim delovanjem nasprotuje spodbudnemu vplivu nevrotrofinov. Manjše izražanje genov za $p75^{NTR}$ in NGF, ki smo ga opazili v naši študiji, je morda posledica izrazito spremenjenega

delovanja levega atrija zaradi prisotnih bolezni aortne in mitralne zaklopke, ki so v kontrolni skupini bolnikov prevladovali. To možnost bomo v nadaljevanju še proučevali, saj sta študiji drugih raziskovalcev na modelu kongestivne srčne odpovedi pokazali izrazit padec izražanja TrkA in NGF v prekatih pasjega srca (72) in v srcu podgane (43).

Nivoji izražanja gena za TrkB se med levim in desnim atrijem človeškega srca ne razlikujejo ($p = 0,117$) (Slika 17), opazili pa smo, da se 30,7% višji nivo v levem atriju sklada z 28,9% višjo vsebnostjo BDNF proteina v levem atriju bolnikov v kontrolni skupini. Znano je, da so nivoji TrkB receptorja višji v ožilju kot v srcu, saj se TrkB v žilnih gladkomišičnih celicah nahaja v precejšnjem obsegu (38). Njegovo izražanje se ob poškodbi žile poveča, visok nivo pa so zaznali tudi v aterosklerotičnih lezijah, kjer ob vezavi BDNF sproži migracijo žilnih gladkomišičnih celic in tako prispeva k razvoju ateroskleroze (20, 81). V nadaljevanju študije bo potrebno proučiti še izražanje gena za receptor TrkC, na katerega se veže NT-3, saj poročajo, da je izražanje tega receptorja izmed vseh treh visokoafinitetnih nevrotrofinskih receptorjev v srcu najvišje (38).

Nivoji izražanja nevrotrofinskih receptorjev v tkivih atrijev človeškega srca v prisotnosti atrijske fibrilacije

Bazalne nivoje izražanja nevrotrofinskih receptorjev smo v nadaljevanju študije primerjali z nivoji njihovega izražanja v prisotnosti atrijske fibrilacije. Izražanje gena za $p75^{\text{NTR}}$ se v desnem atriju med skupinama ni razlikovalo, smo pa opazili zelo značilno, 6,5-kratno povišanje izražanja v levem atriju bolnikov z atrijsko fibrilacijo (Slika 20). Pri vseh bolnikih v tej skupini je bilo izražanje gena za $p75^{\text{NTR}}$ več kot trikrat višje od povprečja v kontrolni skupini, pri dveh osebah (18,2%) je bila razlika celo več kot 13-kratna. Nižji nivo izražanja v levem atriju kontrolne skupine in velik porast v prisotnosti AF sta v skladu z opažanji, da se $p75^{\text{NTR}}$ v normalnih pogojih izraža v manjši meri, bolj obsežno pa v patoloških stanjih (npr. ob ishemiji, aterosklerozi, diabetesu, poškodbi tkiva) (20, 29, 30).

Aktivacija receptorjev $p75^{\text{NTR}}$ pogosto nasprotuje učinkom, ki jih nevrotrofini posredujejo preko Trk receptorjev. Znano je, da $p75^{\text{NTR}}$ preprečuje angiogenezo tako, da v endotelnih celicah sproža apoptozo in otežuje njihovo proliferacijo, migracijo in adhezijo, medtem ko aktivacija Trk receptorjev te procese spodbuja (20, 29). Podobno je tudi v

žilnih gladkomišičnih celicah, kjer Trk spodbujajo njihovo migracijo, p75^{NTR} pa povzroča apoptozo in na ta način sodeluje tudi pri oblikovanju aterosklerotičnih lezij (20, 82). Višja raven p75^{NTR}, ki smo jo opazili pri bolnikih z atrijsko fibrilacijo, bi lahko prispevala k aktivaciji apoptotskih poti in večji izgubi srčnih mišičnih celic, ki je značilna za AF in ki prispeva k strukturnemu preoblikovanju atrijev ter olajšanemu ohranjanju motnje ritma. Prav tako pa je mogoče, da povečano izražanje p75^{NTR} ni dovolj za proženje apoptoze, saj je delovanje tega receptorja močno odvisno od prisotnosti specifičnih ligandov in koreceptorjev (20, 83, 84). Apoptotske poti učinkovito aktivira vezava pronevrotrofinov na p75^{NTR}, precej manj pa vezava zrelih oblik nevrotrofinov (84). Ni jasno, kako to vpliva na stopnjo apoptoze pri atrijski fibrilaciji, saj prisotnost pro-oblik v srčnožilnih celicah še ni bila opisana (20).

Pri razvoju AF je pomemben tudi porast fibroznega tkiva (8). Študije na modelih poškodbe živčnega in pljučnega tkiva so pokazale, da je p75^{NTR} udeležen pri razvoju fibroze, kjer na različne načine preprečuje razgradnjo fibrina in sodeluje pri brazgotinjenju tkiva, vendar najverjetneje ti učinki niso odvisni od nevrotrofične signalizacije (83). Možno je torej, da je receptor p75^{NTR} z atrijsko fibrilacijo povezan še na nek drug, zaenkrat neznan način, kar pa bo potrebno potrditi s proučevanjem mehanizmov, ki sodelujejo pri razvoju fibroze v srcu.

Udeležnost p75^{NTR} pri procesih AF bi lahko temeljila tudi na njegovih učinkih v živčnih celicah. Pri odraslih miših z izbitim genom za p75^{NTR} so v desnem atriju opazili zmanjšano gostoto simpatične oživčenosti, ki je bila hkrati neenakomerno porazdeljena (85). To je oslabilo simpatični prenos in otežilo avtonomno uravnavanje srčnega ritma (85). Ker p75^{NTR} tudi v živčnih celicah igra dvojno vlogo pri posredovanju preživetja ali celične smrti, kar zavisi od celičnega mikrookolja, ni mogoče sklepati, če povišan nivo izražanja p75^{NTR}, ki smo ga določili v naši študiji, sovпада z gostoto simpatične oživčenosti srca (84). Bolj se ponuja možnost, da p75^{NTR} prav z različnim delovanjem na posamezne živčne celice prispeva k heterogenosti oživčenosti, ki bi lahko spodbujala AF. Za uravnavanje delovanja simpatičnega sistema v srcu je pomembna raven aktivacije receptorjev p75^{NTR} in TrkA (28). Ker v simpatičnih živčnih celicah nevrotrofini preko TrkA posredujejo sproščanje noradrenalina in aktivacija p75^{NTR} poveča sproščanje acetilholina, sta stopnja vzdraženosti in fiziološki učinek simpatičnega prenosa odvisna

tudi od razmerja aktivnosti obeh receptorjev (28, 86). Večje izražanje p75^{NTR} pri naših bolnikih z AF bi lahko napovedovalo bolj izrazit inhibitorni prenos med simpatičnimi živčnimi celicami in srčnimi mišičnimi celicami, s čimer se poruši ravnotežje med simpatičnim in parasimpatičnim sistemom (86). Prav neravnovesje med njima je odgovorno za nastanek AF (8, 87, 88). Študije kažejo, da infuzija acetilholina v bližino sinoatrialnega vozla sproži AF in da vagalna stimulacija skrajša efektivno refraktarno dobo na prostorsko neenakomeren način in tako omogoča ponovno vstopanje impulza pri AF (9, 88). Dokazi o vlogi acetilholina pri AF in p75^{NTR} pri uravnavanju njegovega sproščanja nam odkrivajo še eno morebitno povezavo med p75^{NTR} in AF, ki bi jo bilo potrebno, tako kot ostala naša predvidevanja, še natančneje preveriti.

Izražanje gena za TrkB se v levem atriju med skupinama ni razlikovalo. V desnem atriju bolnikov z AF je bilo kar za 44,1% višje kot pri osebah z rednim ritmom, vendar nam značilnosti razlike ni uspelo potrditi. V kakšni povezavi je ta rezultat z izražanjem gena za BDNF, ne moremo predvidevati, saj nam ti podatki niso bili na voljo, smo pa na ravni proteina opazili, da je bila v tem atriju višja tudi vsebnost, a prav tako z neznačilno 22,1% razliko. V okviru študije na glodalcih so opazili, da izražanje TrkB v srcu s starostjo naraste (89). S starostjo povezane spremembe BDNF/TrkB signalnih poti povečajo vnetje, povečajo poškodbo miokarda po infarktu in lahko prispevajo k resni srčnožilni patofiziologiji pri starejših ljudeh (89). Hkrati so številne raziskave vnetje povezale z AF in pokazale, da bi le-to lahko s spodbujanjem strukturnega preoblikovanja atrijev sodelovalo tako pri nastanku kot pri ohranjanju te motnje ritma (8, 90). Prepletenost BDNF, TrkB, vnetja in AF se tako ponuja kot novo izhodišče za nadaljnje proučevanje.

Z opredelitvijo genskega izražanja receptorjev za nevrotrofine smo pokazali, da se raven bazalnega izražanja genov za TrkA in TrkB med atrijema pomembno ne razlikuje. Manjše izražanje gena za p75^{NTR} v levem atriju bi lahko predstavljalo odgovor organizma na sočasno zmanjšano izražanje gena za NGF v tem delu srca. Ugotovili smo še, da se v prisotnosti atrijske fibrilacije močno poveča izražanje gena za p75^{NTR} v levem atriju, mejno značilno pa se zniža tudi izražanje gena za TrkA v desnem atriju človeškega srca. Ti rezultati nakazujejo, da se pri AF razmerje med posameznimi nevrotrofinskimi receptorji spremeni, kar bi lahko vplivalo na obseg učinkov nevrotrofinov in tako prispevalo k patološkimi procesom pri AF.

5.3 Omejitve

Ena pomembnejših omejitev naše študije je majhno število vzorcev, saj smo v raziskavo vključili le 34 bolnikov. Kljub temu, da so se povprečne vrednosti med izbranimi skupinama ponekod razlikovale tudi za 40% in več, nam statistične značilnosti teh razlik ni uspelo potrditi, kar je lahko posledica majhnega vzorca in precejšnje variabilnosti podatkov. Naši rezultati so omejeni tudi z dejstvom, da kontrolne skupine niso sestavljali zdravi ljudje, ker atrijskega tkiva zaradi etičnih razlogov ne moremo dobiti, temveč bolniki, predvideni za operacijo zaradi bolezni srčnih zaklopk. To nam je onemogočilo pravi vpogled v normalno aktivnost nevrotrofinskega sistema v zdravem srcu. Ker številne srčnožilne bolezni povezujejo podobne patološke poti, je mogoče, da je bila prisotnost nevrotrofinov spremenjena tudi že v kontrolni skupini in so bile razlike, ki bi jih v primerjavi z zdravimi osebami sicer zaznali, prikrite. K podrobnejšemu razumevanju bi prispevali še podatki o izražanju gena za BDNF in gena za receptor TrkC, vendar nam te informacije žal niso bile na voljo. Podobno so vsa naša predvidevanja o vlogi receptorjev za NT v prisotnosti AF temeljila le na rezultatih genskega izražanja, pri čemer same vsebnosti proteina v atrijih nismo poznali. Izražanje je uravnava tudi po transkripciji gena, zato ni jasno, v kakšni meri so se receptorji dejansko pojavljali v tkivu. V primeru, da se nivoji izražanja gena ne odražajo v ravni proteina, bi to imelo pomembne posledice za naša predvidevanja.

6 SKLEP

V pričujoči nalogi smo želeli ugotoviti, ali prisotnost atrijske fibrilacije vpliva na raven nevrotrofinov in njihovih receptorjev v tkivih atrijev človeškega srca. Pri bolnikih z rednim srčnim ritmom in bolnikih z atrijsko fibrilacijo smo v vzorcih seruma ter levega in desnega atrija z encimsko-imunsko metodo izmerili nivoje nevrotrofinov NGF, BDNF in NT-3. V tkivih atrijev smo s pomočjo verižne reakcije s polimerazo v realnem času določili nivoje izražanja genov za NGF in NT-3 ter genov za nevrotrofinske receptorje p75^{NTR}, TrkA in TrkB.

Izmerjene vrednosti serumskih koncentracij nevrotrofinov so pokazale, da med posamezniki znotraj skupine obstaja precejšnja variabilnost, a so bili naši rezultati primerljivi z rezultati drugih študij. Raven nevrotrofinov v krvnem obtoku je sicer odvisna od številnih fizioloških in patoloških dejavnikov, vendar smo ugotovili, da prisotnost atrijske fibrilacije nanjo ne vpliva. Merjenje serumskih koncentracij tako ne more služiti kot napovedni dejavnik, saj se le-te niso značilno razlikovale od vrednosti pri bolnikih z rednim ritmom. Naša opažanja bi bilo smiselno potrditi še z analizo serumskih vzorcev ali zbira plazme (ang. pooled plasma) krvodajalcev, saj smo pri našem delu v kontrolno skupino vključili bolnike z boleznimi zaklopk in ne zdravih prostovoljcev.

V nadaljevanju raziskave smo proučili raven nevrotrofinov in njihovih receptorjev v tkivih atrijev človeškega srca, ki pred začetkom naše raziskave še niso bile znane. Potrdili smo prisotnost vseh treh nevrotrofinov v homogenatih človeških atrijev v merljivih koncentracijah. Njihova bazalna raven se med atrijema ni razlikovala. Opazili smo, da se je gen za NGF v značilno manjšem obsegu izražal v levem atriju, s čimer se je ujemalo tudi manjše izražanje gena za nizkoafinitetni nevrotrofinski receptor p75. Predvidevamo, da se atrijsko tkivo na ta način odzove na zmanjšano izražanje NGF in TrkA ter tako vzdržuje ravnovesje med receptorji in omejuje obseg proapoptotskih učinkov zaradi prekomerne aktivacije p75^{NTR}. Hkrati je mogoče tudi, da je manjše izražanje genov v levem atriju povezano s spremenjenim delovanjem levega atrija, ki je posledica v tej skupini prevladujočih bolezni aortne in mitralne zaklopke, čemur bi se lahko v prihodnje še posvetili.

Kljub temu, da nevrotrofini sodelujejo v procesih prekomerne oživčenosti, oksidativnega stresa in hipertrofije, ki so vpleteni v razvoj atrijske fibrilacije, sprememb v

njihovem genskem izražanju ali razlik na ravni proteina v prisotnosti te motnje nismo opazili. Pomembne rezultate je prineslo proučevanje nevrotrofinskih receptorjev, saj smo ugotovili, da se v prisotnosti AF izražanje gena za p75^{NTR} v levem atriju močno poveča in ob tem zmanjša (mejno značilno) izražanje gena za TrkA v desnem atriju. Zaradi različnih vlog, ki jih receptor p75 opravlja, ne moremo jasno zaključiti, kakšne so posledice teh sprememb. V stanju povišanega izražanja p75^{NTR} se procesi apoptoze in fibroze morda odvijajo v večjem obsegu. Prav tako bi povišanje lahko vplivalo na pojav neenakomerne oživčenosti in na stopnjo simpatičnega prenosa ter s tem na ravnotežje med simpatičnim in parasimpatičnim sistemom. Receptor p75 bi torej lahko k nastanku AF prispeval na dva načina, tj. s preoblikovanjem atrijev kot tudi s spreminjanjem funkcije živčevja.

V raziskavi smo meritve opravili na manjšem številu vzorcev, kar bi se lahko skupaj z znatno variabilnostjo podatkov odražalo v naši zmožnosti potrjevanja razlik med skupinama. Poleg tega so tudi kontrolno skupino predstavljali bolniki z boleznimi zaklopk, s čimer nam je bil onemogočen vpogled v normalno nevrotrofično aktivnost v srcu. Čeprav začetnih predvidevanj o spremenjenem izražanju nevrotrofinov pri osebah z AF nismo potrdili, smo pokazali, da se v njeni prisotnosti spremeni razmerje med nevrotrofinskimi receptorji. Zaenkrat še ni jasno, ali to prispeva k vzroku motnje ritma ali je njena posledica, vendar je mogoče, da tako neravnovesje vpliva na različne procese, ki so povezani z atrijsko fibrilacijo.

7 LITERATURA

1. Katz st 0: Katz AD: Physiology of the heart, 5. izdaja, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2011: 14.
2. Khairy P, Nattel S: New insights into the mechanisms and management of atrial fibrillation. CMAJ (Canadian Medical Association Journal) 2002; 167(9): 1012-20.
3. Nattel S: New ideas about atrial fibrillation 50 years on. Nature 2002; 415(6868): 219-26.
4. Kannel WB, Benjamin EJ: Current perceptions of the epidemiology of atrial fibrillation. Cardiol Clin 2009; 27(1):13-24.
5. Workman AJ: Cardiac adrenergic control and atrial fibrillation. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2010; 381(3): 235-49.
6. Kocijančič A, Mrevlje F eds.: Interna medicina, 2. izdaja, EWO, DZS, Ljubljana, 1998: 88.
7. Klabunde RE: Cardiovascular Physiology Concepts; Reentry. <http://www.cvphysiology.com/Arrhythmias/A008c.htm> (januar 2011)
8. Aldhoon B, Melenovský V, Peichl P, Kautzner J: New insights into mechanisms of atrial fibrillation. Physiol Res 2010; 59(1): 1-12.
9. Nattel S: Therapeutic implications of atrial fibrillation mechanisms: can mechanistic insights be used to improve AF management? Cardiovascular Research 2002; 54(2): 347-360.
10. Farré J, Wellens HJ: Philippe Coumel: a founding father of modern arrhythmology. Europace 2004; 6(5):464-5.
11. Shimizu A, Centurion OA: Electrophysiological properties of the human atrium in atrial fibrillation. Cardiovasc Res 2002; 54(2): 302-14.
12. Conen D, Osswald S, Albert CM: Epidemiology of atrial fibrillation. Swiss Med Wkly 2009; 139(25-26): 346-52.
13. Antolič B, Žižek D, Šinkovec M, Petrovič D: Genetika idiopatske atrijske fibrilacije. Zdrav Vestn 2010; 79: 427-32.
14. Fuster V, Rydén LE, Asinger RW, Cannom DS, Crijs HJ, Frye RL et al.: ACC/AHA/ESC Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation: Executive Summary A Report of the American College of Cardiology/American Heart

- Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines and Policy Conferences (Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation) Developed in Collaboration With the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation* 2001; 104(17): 2118-50.
15. Campuzano O, Brugada R: Genetics of familial atrial fibrillation. *Europace* 2009; 11(10): 1267–1271.
 16. Dixon BJ, Bracha Y, Loecke SW, Guerrero MA, Taylor RD, Asinger RW: Principal atrial fibrillation discharges by the new ACC/AHA/ESC classification. *Arch Intern Med* 2005; 165(16): 1877-81.
 17. Kalus JS: Pharmacologic management of atrial fibrillation: established and emerging options. *J Manag Care Pharm* 2009; 15(6 Suppl B): S10-8.
 18. Burashnikov A, Antzelevitch C: New pharmacological strategies for the treatment of atrial fibrillation. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2009; 14(3): 290-300.
 19. Reichardt LF: Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361(1473): 1545-64.
 20. Caporali A, Emanuelli C: Cardiovascular Actions of Neurotrophins. *Physiol Rev* 2009; 89(1): 279-308.
 21. Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA: Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem* 2001; 276(16): 12660-6.
 22. Wiesmann C, de Vos AM: Nerve growth factor: structure and function. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58(5-6): 748-59.
 23. Korsching S: The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J Neurosci* 1993; 13(7): 2739-48.
 24. Jurič DM, Miklič Š, Čarman-Kržan M: Monoaminergic neuronal activity up-regulates BDNF synthesis in cultured neonatal rat astrocytes. *Brain Res* 2006; 1108(1): 54-62.
 25. Miklič Š, Jurič DM, Čarman-Kržan M: Differences in the regulation of BDNF and NGF synthesis in cultured neonatal rat astrocytes. *Int J Devl Neurosci* 2004; 22: 119-130.
 26. Suter U, Heymach JV Jr, Shooter EM: Two conserved domains in the NGF propeptide are necessary and sufficient for the biosynthesis of correctly processed and biologically active NGF. *EMBO J* 1991; 10(9): 2395-400.

27. Masoudi R, Ioannou MS, Coughlin MD, Pagadala P, Neet KE, Clewes O et al.: Biological activity of nerve growth factor precursor is dependent upon relative levels of its receptors. *J Biol Chem* 2009; 284(27): 18424-33.
28. Luther JA, Birren SJ: Neurotrophins and target interactions in the development and regulation of sympathetic neuron electrical and synaptic properties. *Auton Neurosci* 2009; 151(1): 46-60.
29. Caporali A, Pani E, Horrevoets AJ, Kraenkel N, Oikawa A, Sala-Newby GB et al.: Neurotrophin p75 receptor (p75NTR) promotes endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis: implications for diabetes-induced impaired neovascularization in ischemic limb muscles. *Circ Res* 2008; 103(2): e15-26.
30. Kermani P, Hempstead B: BDNF: A Newly Described Mediator of Angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 2007; 17(4): 140-143.
31. Lockhart ST, Turrigiano GG, and Birren SJ: Nerve Growth Factor Modulates Synaptic Transmission between Sympathetic Neurons and Cardiac Myocytes. *J Neurosci* 1997; 17(24): 9573-82.
32. Heumann R, Korsching S, Scott J, Thoenen H: Relationship between levels of nerve growth factor (NGF) and its messenger RNA in sympathetic ganglia and peripheral target tissues. *EMBO J* 1984; 3(13): 3183-9.
33. Kiriazis H, Du XJ, Feng X, Hotchkiss E, Marshall T, Finch S et al.: Preserved left ventricular structure and function in mice with cardiac sympathetic hyperinnervation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289(4): H1359-65.
34. Gould PA, Yui M, McLean C, Finch S, Marshall T, Lambert GW, Kaye DM: Evidence for increased atrial sympathetic innervation in persistent human atrial fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol* 2006; 29(8): 821-9.
35. Blum R, Konnerth A: Neurotrophin-mediated rapid signaling in the central nervous system: mechanisms and functions. *Physiology* 2005; 20: 70-8.
36. Cristofaro B, Stone OA, Caporali A, Dawbarn D, Ieronimakis N, Reyes M et al.: Neurotrophin-3 is a novel angiogenic factor capable of therapeutic neovascularization in a mouse model of limb ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30(6): 1143-50.
37. Caporali A, Sala-Newby GB, Meloni M, Graiani G, Pani E, Cristofaro B et al.: Identification of the prosurvival activity of nerve growth factor on cardiac myocytes. *Cell Death Differ* 2008; 15(2): 299-311.

38. Kawaguchi-Manabe H, Ieda M, Kimura K, Manabe T, Miyatake S, Kanazawa H et al.: A novel cardiac hypertrophic factor, neurotrophin-3, is paradoxically downregulated in cardiac hypertrophy. *Life Sci* 2007; 81(5): 385-92.
39. Ieda M, Fukuda K: New aspects for the treatment of cardiac diseases based on the diversity of functional controls on cardiac muscles: the regulatory mechanisms of cardiac innervation and their critical roles in cardiac performance. *J Pharmacol Sci* 2009; 109(3): 348-53.
40. Lim PB, Malcolm-Lawes LC, Stuber T, Wright I, Francis DP, Davies DW et al.: Intrinsic Cardiac Autonomic Stimulation Induces Pulmonary Vein Ectopy and Triggers Atrial Fibrillation in Humans. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2011; doi: 10.1111/j.1540-8167.2010.01992.x. [Epub ahead of print].
41. Thijssen VL, Ausma J, Borgers M: Structural remodelling during chronic atrial fibrillation: act of programmed cell survival. *Cardiovasc Res* 2001; 52(1): 14-24.
42. Meloni M, Caporali A, Graiani G, Lagrasta C, Katare R, Van Linthout S et al.: Nerve growth factor promotes cardiac repair following myocardial infarction. *Circ Res* 2010; 106(7): 1275-84.
43. Kaye DM, Vaddadi G, Gruskin SL, Du XJ, Esler MD: Reduced myocardial nerve growth factor expression in human and experimental heart failure. *Circ Res* 2000; 86(7): e80-e84.
44. Ejiri J, Inoue N, Kobayashi S, Shiraki R, Otsui K, Honjo T et al.: Possible role of brain-derived neurotrophic factor in the pathogenesis of coronary artery disease. *Circulation* 2005; 112(14): 2114-20.
45. Zhang SH, Zhou XF, Rush RA: Extraction and quantification of the neurotrophins. *Methods in Molecular Biology* 2001; 169: 31-41.
46. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
47. Mele T, Čarman-Kržan M, Jurič DM: Regulatory role of monoamine neurotransmitters in astrocytic NT-3 synthesis. *Int J Dev Neurosci* 2010; 28: 13-19.
48. RNAqueous®-4PCR Kit Protocol. Applied Biosystems 2008; Part Number AM1914.
49. High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Protocol. Applied Biosystems 2010; Part Number 4375575.

50. TaqMan® Gene Expression Assays Protocol. Applied Biosystems 2008; Part Numbers 4401212, 4333458.
51. Pérez S, Royo LJ, Astudillo A, Escudero D, Alvarez F, Rodríguez A et al.: Identifying the most suitable endogenous control for determining gene expression in hearts from organ donors. *BMC Molecular Biology* 2007; 8: 114.
52. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct Method. *Methods* 2001; 25(4): 402-8.
53. Referenčne vrednosti laboratorijskih preiskav. <http://www.kclj.si/kikkb/preiskave.htm> (april 2011)
54. Bus BA, Tendolkar I, Franke B, de Graaf J, Heijer MD, Buitelaar JK, Oude Voshaar RC: Serum brain-derived neurotrophic factor: Determinants and relationship with depressive symptoms in a community population of middle-aged and elderly people. *World J Biol Psychiatry* 2011; [Epub ahead of print].
55. Bulló M, Peeraully MR, Trayhurn P, Folch J, Salas-Salvadó J: Circulating nerve growth factor levels in relation to obesity and the metabolic syndrome in women. *Eur J Endocrinol* 2007; 157(3): 303-10.
56. Lang UE, Gallinat J, Danker-Hopfe H, Bajbouj M, Hellweg R: Nerve growth factor serum concentrations in healthy human volunteers: physiological variance and stability. *Neurosci Lett* 2003; 344(1): 13-6.
57. Rihl M, Kruithof E, Barthel C, De Keyser F, Veys EM, Zeidler H et al.: Involvement of neurotrophins and their receptors in spondyloarthritis synovitis: relation to inflammation and response to treatment. *Ann Rheum Dis* 2005; 64(11): 1542-9.
58. Toyooka K, Asama K, Watanabe Y, Muratake T, Takahashi M, Someya T, Nawa H: Decreased levels of brain-derived neurotrophic factor in serum of chronic schizophrenic patients. *Psychiatry Res* 2002; 110(3): 249-57.
59. Hubold C, Lang UE, Gehring H, Schultes B, Schweiger U, Peters A et al.: Increased serum brain-derived neurotrophic factor protein upon hypoxia in healthy young men. *J Neural Transm* 2009; 116(10): 1221-5.
60. Lise MC, Sparsa A, Marie I, Lalloué F, Ly K, Martel C et al.: Serum neurotrophin profile in systemic sclerosis. *PLoS One* 2010; 5(11): e13918.
61. Lecht S, Foerster C, Arien-Zakay H, Marcinkiewicz C, Lazarovici P, Lelkes PI: Cardiac microvascular endothelial cells express and release nerve growth factor but not fibroblast growth factor-2. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2010; 46(5): 469-76.

62. Aloe L, Bracci-Laudiero L, Bonini S, Manni L: The expanding role of nerve growth factor: from neurotrophic activity to immunologic diseases. *Allergy* 1997; 52(9): 883-94.
63. Özseker F, Büyüköztürk S, Gelincik A, Depboylu B, Genç S, Giriş M et al.: Neurotrophins: are they meaningful in chronic spontaneous urticaria? *Asian Pac J Allergy Immunol* 2008; 26(2-3): 83-88.
64. Hadjiconstantinou M, McGuire L, Duchemin AM, Laskowski B, Kiecolt-Glaser J, Glaser R: Changes in plasma nerve growth factor levels in older adults associated with chronic stress. *J Neuroimmunol* 2001; 116(1): 102-6.
65. Chan KL, Tong KY, Yip SP: Relationship of serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and health-related lifestyle in healthy human subjects. *Neurosci Lett* 2008; 447(2-3): 124-8.
66. Suwa M, Kishimoto H, Nofuji Y, Nakano H, Sasaki H, Radak Z, Kumagai S: Serum brain-derived neurotrophic factor level is increased and associated with obesity in newly diagnosed female patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 2006; 55(7): 852-7.
67. Currie J, Ramsbottom R, Ludlow H, Nevill A, Gilder M: Cardio-respiratory fitness, habitual physical activity and serum brain derived neurotrophic factor (BDNF) in men and women. *Neurosci Lett* 2009; 451(2): 152-5.
68. Nakahashi T, Fujimura H, Altar CA, Li J, Kambayashi J, Tandon NN, Sun B: Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Lett* 2000; 470(2): 113-7.
69. Golden E, Emiliano A, Maudsley S, Windham BG, Carlson OD, Egan JM et al.: Circulating Brain-Derived Neurotrophic Factor and Indices of Metabolic and Cardiovascular Health: Data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *PLoS One* 2010; 5(4): e10099.
70. Quarcoo D, Fischer TC, Peckenschneider N, Groneberg DA, Welker P: High abundances of neurotrophin 3 in atopic dermatitis mast cell. *J Occup Med Toxicol* 2009; 4: 8.
71. Saygili E, Kluttig R, Rana OR, Saygili E, Gemein C, Zink MD et al.: Age-related regional differences in cardiac nerve growth factor expression. *Age (Dordr)* 2011; [Epub ahead of print]

72. Qin F, Vulapalli RS, Stevens SY, Liang CS: Loss of cardiac sympathetic neurotransmitters in heart failure and NE infusion is associated with reduced NGF. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282(1): H363-71.
73. Ieda M, Fukuda K, Hisaka Y, Kimura K, Kawaguchi H, Fujita J et al.: Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression. *J Clin Invest* 2004; 113(6): 876-84.
74. Gong YT, Li WM, Li Y, Yang SS, Sheng L, Yang N et al.: Probucol attenuates atrial autonomic remodeling in a canine model of atrial fibrillation produced by prolonged atrial pacing. *Chin Med J (Engl)* 2009; 122(1): 74-82.
75. Olgin JE, Sih HJ, Hanish S, Jayachandran JV, Wu J, Zheng QH et al.: Heterogeneous atrial denervation creates substrate for sustained atrial fibrillation. *Circulation* 1998; 98(23): 2608-14.
76. Jayachandran JV, Sih HJ, Winkle W, Zipes DP, Hutchins GD, Olgin JE: Atrial fibrillation produced by prolonged rapid atrial pacing is associated with heterogeneous changes in atrial sympathetic innervation. *Circulation* 2000; 101(10): 1185-91.
77. Heath BM, Xia J, Dong E, An RH, Brooks A, Liang C et al.: Overexpression of nerve growth factor in the heart alters ion channel activity and beta-adrenergic signalling in an adult transgenic mouse. *J Physiol* 1998; 512 (Pt 3): 779-91.
78. Lin YK, Lin FZ, Chen YC, Cheng CC, Lin CI, Chen YJ, Chen SA: Oxidative stress on pulmonary vein and left atrium arrhythmogenesis. *Circ J* 2010; 74(8): 1547-56.
79. Kim YM, Guzik TJ, Zhang YH, Zhang MH, Kattach H, Ratnatunga C et al.: A myocardial Nox2 containing NAD(P)H oxidase contributes to oxidative stress in human atrial fibrillation. *Circ Res* 2005; 97(7): 629-36.
80. Kim SH, Won SJ, Sohn S, Kwon HJ, Lee JY, Park JH, Gwag BJ: Brain-derived neurotrophic factor can act as a pronecrotic factor through transcriptional and translational activation of NADPH oxidase. *J Cell Biol* 2002; 159(5): 821-31.
81. Kraemer R, Baker PJ, Kent KC, Ye Y, Han JJ, Tejada R et al.: Decreased neurotrophin TrkB receptor expression reduces lesion size in the apolipoprotein E-null mutant mouse. *Circulation* 2005; 112(23): 3644-53.
82. Wang S, Bray P, McCaffrey T, March K, Hempstead BL, Kraemer R: p75(NTR) mediates neurotrophin-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol* 2000; 157(4): 1247-58.

83. Sachs BD, Baillie GS, McCall JR, Passino MA, Schachtrup C, Wallace DA et al.: p75 neurotrophin receptor regulates tissue fibrosis through inhibition of plasminogen activation via a PDE4/cAMP/PKA pathway. *J Cell Biol* 2007; 177(6): 1119-32.
84. Teng KK, Hempstead BL: Neurotrophins and their receptors: signaling trios in complex biological systems. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61(1): 35-48.
85. Habecker BA, Bilimoria P, Linick C, Gritman K, Lorentz CU, Woodward W, Birren SJ: Regulation of cardiac innervation and function via the p75 neurotrophin receptor. *Auton Neurosci* 2008; 140(1-2): 40-8.
86. Yang B, Slonimsky JD, Birren SJ: A rapid switch in sympathetic neurotransmitter release properties mediated by the p75 receptor. *Nat Neurosci* 2002; 5(6): 539-45.
87. Workman AJ, Kane KA, Rankin AC: Cellular bases for human atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2008; 5(6 Suppl): S1-6.
88. Chen PS, Tan AY: Autonomic nerve activity and atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2007; 4(3 Suppl): S61-4.
89. Cai D, Holm JM, Duignan IJ, Zheng J, Xaymardan M, Chin A et al.: BDNF-mediated enhancement of inflammation and injury in the aging heart. *Physiol Genomics* 2006; 24(3): 191-7.
90. Yap YG: Inflammation and atrial fibrillation: cause or para-phenomenon? *Europace* 2009; 11(8): 980-1.

8 PRILOGA

Priloga 1: Odobritev Komisije za medicinsko etiko.



KOMISIJA REPUBLIKE SLOVENIJE ZA MEDICINSKO ETIKO

Prof. dr. Borut Geršak, dr. med., višji svetnik
KO za kirurgijo srca in ožilja
Univerzitetni klinični center Ljubljana
Zaloška 7, 1525 Ljubljana



Štev.: 186/12/08
Datum obravnave: 16. 12. 2008
Datum dopisa: 17. 12. 2008

Spoštovani gospod profesor,

Komisiji za medicinsko etiko ste 12. 12. 2008 poslali prošnjo za oceno načrta raiskave z naslovom:

"Preučevanje sprememb v genskem izražanju in sintezi nevrotrofičnih dejavnikov pri bolnikih z atrijsko fibrilacijo."

Komisija za medicinsko etiko je ocenila, da je raziskava z etične strani sprejemljiva, in Vam s tem izdaja svoje soglasje.

Z lepimi pozdravi in dobrimi željami,

v imenu Komisije za medicinsko etiko:
prof. dr. Jože Trontelj