

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TJAŠA PAL

DIPLOMSKA NALOGA

Univerzitetni študij farmacije

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TJAŠA PAL

**PROUČEVANJE NIVOJA mRNA *CCL2* V PLAZMI
BOLNIKOV S STABILNO ANGINO**

**PLASMA LEVEL OF mRNA *CCL2* IN PATIENTS WITH
STABLE ANGINA**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo (Katedra za klinično biokemijo) pod mentorstvomizr. prof. dr. Darka Černeta.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju,izr. prof. dr. Darku Černetu za izkazano zaupanje, pripravljenost za sodelovanje in pomoč pri nastajanju diplomskega dela ter nasvete pri pisanju diplomske naloge. Hvala tudi vsem zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo za pomoč pri delu in prijaznost v laboratoriju.

Želim se zahvaliti tudi družini, prijateljem in fantu za vso podporo, vzpodbudo in razumevanje v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorjaizr. prof. dr. Darka Černeta.

Tjaša Pal

Ljubljana, september 2011

Predsednik diplomske komisije:

izr. prof. dr. Odon Planinšek

Član diplomske komisije:

doc. dr. Jožko Cesar

VSEBINA

VSEBINA	I
KAZALO SLIK	III
KAZALO PREGLEDNIC	IV
POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1 UVOD	1
1.1 Zunajcelične nukleinske kisline	1
1.1.1 Lastnosti, izvor in koncentracija zunajceličnih nukleinskih kislin	1
1.1.2 Stabilnost zunajcelične mRNA	2
1.1.3 Možnosti uporabe zunajceličnih nukleinskih kislin v diagnostiki	3
1.2 Koronarna ateroskleroza	4
1.2.1 Etiologija ateroskleroze	5
1.2.2 Patogeneza ateroskleroze	6
1.2.3 Klinične manifestacije in zapleti ateroskleroze	7
1.3 Kemokinski ligand 2 (CCL2)	8
1.3.1 Vloga CCL2 v patogenezi ateroskleroze.....	10
1.3.2 Vloga CCL2 pri celjenju srčne mišice po infarktu.....	12
1.3.3 Koncentracije CCL2 v krvi	12
1.4 Statini	13
1.4.1 Osnovni mehanizem delovanja	13
1.4.2 Mehanizem pleiotropnih učinkov statinov.....	13
1.4.3 Zaščitni pleiotropni učinki statinov	15
2 NAMEN IN DELOVNA HIPOTEZA	17
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 Vzorci	18
3.1.1 Priprava vzorcev	18
3.2 Materiali in aparature	19
3.3 Metode	19
3.3.1 Izolacija zunajceličnih nukleinskih kislin	19
3.3.2 Reverzna transkripcija	23
3.3.3 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času.....	25
3.3.4 Statistična analiza	31
4 REZULTATI	32

4.1	Analiza podatkov o vzorcih	32
4.2	Analiza rezultatov, dobljenih z metodo PCR v realnem času	33
5	RAZPRAVA	37
5.1	Prva delovna hipoteza	37
5.2	Druga delovna hipoteza.....	38
6	SKLEPI	41
7	LITERATURA	42

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz aterogeneze od endotelijske disfunkcije do nastanka aterosklerotičnega plaka in tromboze	7
Slika 2: Signalne poti, ki jih aktivira CCL2 po vezavi na CCR2	9
Slika 3: Vstop monocitov v nastajajoči aterosklerotični plak pod vplivom CCL2	10
Slika 4: Zmanjšano kopičenje makrofagov pri miškah brez CCR2.....	11
Slika 5: Vloga CCL2 pri napredovanju aterosklerotične bolezni	12
Slika 6: Prikaz biosintezne poti holesterola in posledice zaviranja HMG-CoA-reduktaze s statini	14
Slika 7: Postopek izolacije NK iz plazme s kompletom QUIamp MinElute Virus Spin Kit	23
Slika 8: RT-PCR s hidrolizirajočo sondo Taqman.....	26
Slika 9: Krivulja pomnoževanja pri PCR v realnem času	27
Slika 10: Porazdelitev starosti preiskovancev glede na bolezensko stanje.....	33
Slika 11: Delež izmerjenih in neizmerjenih Ct.....	33
Slika 12: Plazemski nivo nukleinskih kislin CCL2 bolnikov s stabilno angino (SA) in zdravih preiskovancev	34
Slika 13 Poti, preko katerih statini regulirajo izražanje <i>CCL2</i> in njegovega receptorja.....	40

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Sestava reagenčnega kompleta za sintezo cDNA.....	24
Preglednica II: Sestava reakcijske zmesi za reverzno transkripcijo.....	24
Preglednica III: Pogoji reakcije reverzne transkripcije	25
Preglednica IV: Razredčitev raztopine cDNA v postopku reakcije PCR.....	29
Preglednica V: Sestava reakcijske zmesi za PCR v realnem času.....	30
Preglednica VI: Klinične značilnosti preiskovancev	32
Preglednica VII: Vrednosti mediane plazemskega nivoja NK CCL2, 25. in 75. percentil	34
Preglednica VIII: Test normalnosti distribucije plazemskega nivoja NK <i>CCL2</i>	35
Preglednica IX: Predstavitev rezultatov neparametričnega Mann-Whitneyjevega U-testa	35

POVZETEK

Koronarna ateroskleroza je vnetna degenerativna bolezen koronarnih arterij, ki predstavlja vodilni vzrok obolevnosti in umrljivosti v razvitem svetu. V začetnih fazah aterogeneze monociti vstopajo v žilno steno pod vplivom kemokinskega liganda 2 (CCL2), ki nastaja v celicah žilne stene. CCL2 pomembno vpliva tudi na napredovanje in destabilizacijo aterosklerotičnega plaka. Eksperimentalni rezultati kažejo, da je v aterosklerotični žilni steni povišan nivo mRNA *CCL2* v primerjavi z zdravo žilno steno. Predvidevali smo, da z različnimi mehanizmi mRNA *CCL2* iz celic žilne stene prehaja v kri, zato smo v diplomski nalogi želeli potrditi hipotezo, da v plazmi bolnikov s stabilno angino obstaja mRNA *CCL2* in je njen nivo mogoče izmeriti. Druga hipoteza je bila, da imajo bolniki s stabilno angino v plazmi zvišan nivo mRNA *CCL2* v primerjavi z zdravimi preiskovanci.

Iz plazme 29 bolnikov s stabilno angino in 33 zdravih preiskovancev smo izolirali nukleinske kisline, izvedli prepis mRNA v cDNA in izmerili njen nivo z metodo PCR v realnem času. Kljub zagotovitvi proizvajalca, da so reagenti specifični za mRNA, je v meritvah interferirala DNA, vendar obsega interference nismo mogli ovrednotiti.

Ugotovili smo, da so nukleinske kisline (mRNA in DNA) *CCL2* prisotne v plazmi bolnikov s stabilno angino pa tudi v plazmi zdravih ter da imajo bolniki s stabilno angino nižje plazemske vrednosti nukleinskih kislin *CCL2* v primerjavi z zdravimi preiskovanci (12,55 vs. 36,25; $p=0,099$). Pokazali smo, da obstaja statistična razlika med bolniki s stabilno angino, ki prejemajo statine, in zdravimi ($p=0,049$), še večja pa med bolniki s stabilno angino, zdravljenimi s statini, in zdravimi preiskovanci s plazemsko koncentracijo C-reaktivnega proteina višjo od mediane vseh vrednosti pri zdravih ($p=0,022$).

Rezultati so bili v nasprotju s pričakovanji, pri bolnikih s stabilno angino smo izmerili znižan plazemski nivo nukleinskih kislin *CCL2*, še posebej pri tistih, ki so prejemali statine. Znižanje plazemskega nivoja bi lahko pripisali delovanju statinov na zaviranje izražanja *CCL2* v žilni steni.

Za zaključek lahko povemo, da nismo uspeli potrditi hipoteze, da lahko z neinvazivno metodo merjenja plazemskega nivoja mRNA *CCL2* sklepamo na prisotnost in stopnjo bolezni, vendar pa rezultati naše raziskave kažejo na smiselnost nadaljnjega proučevanja uporabnosti analize plazemskega nivoja mRNA *CCL2* s postopki, ki so specifični za mRNA. Smiselno je tudi proučevanje mRNA drugih genov, ki z zvečanim izražanjem v

žilni steni spremljajo in sodelujejo v procesu aterogeneze.

ABSTRACT

Coronary atherosclerosis is an inflammatory degenerative disease of the coronary arteries, which is the leading cause of morbidity and mortality in modern world. In the early stages of atherogenesis monocytes are recruited in vascular wall by chemokine ligand 2 (*CCL2*) synthesized in vascular wall cells. *CCL2* is also involved in progression and destabilization of atherosclerotic plaques. Experimental results suggest that the levels of *CCL2* mRNA are increased in atheroma compared to the healthy vessel wall. We assumed that *CCL2* mRNA is released into the blood by different mechanisms and that is why our aim was to confirm the hypothesis that it is possible to determine *CCL2* mRNA plasma levels in the stable angina patients' plasma. Our second hypothesis was that stable angina patients have increased *CCL2* mRNA levels in comparison with healthy subjects.

We isolated nucleic acids from plasma of 29 patients with stable angina and 33 healthy individuals, transcribed mRNA in cDNA and made quantification with real time PCR. Although the reagents have been declared as mRNA specific, DNA interfered during quantification of *CCL2* mRNA. We were not able to assess the range of interference.

We have found *CCL2* nucleic acids (DNA and mRNA) present in plasma of stable angina patients and also in plasma of healthy controls and showed that stable angina patients have lower plasma levels of *CCL2* nucleic acids compared with healthy subjects (12.55 vs. 36.25, $p=0.099$). We have shown that there is statistical difference between patients with stable angina receiving statins and controls ($p=0.049$). The difference got even higher when we compared stable angina patients treated with statins and healthy individuals with plasma concentration of C-reactive protein higher than the median of all values of this protein in healthy subjects ($p=0.022$).

Unexpectedly, stable angina patients had lower plasma levels of *CCL2* nucleic acids than controls and the lowest values were associated with statin treatment. The decrement may be a consequence of statin-driven downregulation of *CCL2* expression in vascular wall.

In conclusion we can say that we were unable to confirm the hypothesis that the non-invasive method of measuring plasma levels of *CCL2* mRNA can indicate the presence and degree of disease, but our results suggest, that further studying of the applicability of the analysis of plasma levels of *CCL2* mRNA by methods that are specific for the mRNA, is reasonable. It is also reasonable to study and monitor the mRNA of other genes, which

participate in the process of atherogenesis with increased expression in the vascular wall.

SEZNAM OKRAJŠAV

- AKS** (angl. acute coronary syndrome) – akutni koronarni sindrom
- AP-1** – aktivatorski protein-1
- ApoA1** – apolipoprotein A1
- ApoB** – apolipoprotein B
- ApoE** – apolipoprotein E
- CAD** (angl. coronary artery disease) – koronarna arterijska bolezen
- CCL2** (angl. chemotactic ligand 2) – kemokinski ligand 2
- CCL2** – gen, ki kodira CCL2
- CCR2** – receptor za CCL2
- cDNA** – DNA komplementarna mRNA
- CRP** (angl. C-reactive protein) – C-reaktivni protein
- Ct** – število ciklov, pri katerem je presežen prag fluorescence
- DAG** – diacilglicerol
- DNA** – deoksiribonukleinska kislina
- dNTP** – deoksinukleotid trifosfat
- EDTA** – etilendiaminotetraocetna kislina
- FPP** – farnezilpirofosfat
- GAPDH** – gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza
- GGPP** – geranilgeranilpirofosfat
- HDL** – lipoprotein visoke gostote
- HMG-CoA** – 3-hidroksi-3-metilglutaril-koencim A
- ICAM-1** – medcelična adhezijska molekula-1
- IDL** – lipoprotein srednje gostote
- IFN- γ** – interferon γ
- IL-1/6** – interleukin 1/6
- IP3** – inozitol trifosfat
- LDL** – lipoprotein majhne gostote
- MAP kinaza** – mitogen aktivirana proteinska kinaza
- MCP-1** (angl. monocyte chemotactic protein 1) – monocitni kemotaktični protein-1
- MCPIP** – z monocitnim kemotaktičnim proteinom-1 inducirani protein

M-CSF – makrofagni kolonijo stimulirajoči dejavnik
MMP – matriksna metaloproteinaza
mRNA – informacijska RNA
NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NF- κ B – jedrni dejavnik kapa B
NK – nukleinske kisline
NO – dušikov oksid
PCR – verižna reakcija s polimerazo
PDGF – trombocitni rastni dejavnik
PIP2 – fosfatidilinozitol bifosfat
PKC – proteinska kinaza C
PLC – fosfolipaza C
PPIA – peptidil-prolil-izomeraza A, ciklofilin A
RNA – ribonukleinska kislina
RNaza – ribonukleaza
ROCK – Rho kinaza
RT-PCR – reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo
SA – stabilna angina
Taq DNA-polimeraza – *Thermus aquaticus* DNA polimeraza
TNF- α – dejavnik tumorske nekroze α
VCAM-1 – žilnocelična adhezijaska molekula-1
UNG – uracil-N-glikozilaza

1 UVOD

1.1 Zunajcelične nukleinske kisline

Zunajcelične nukleinske kisline (NK) so nukleinske kisline, ki se nahajajo izven celic v plazmi, serumu pa tudi v drugih bioloških vzorcih (1). Njihovo odkritje sega v leto 1948, ko sta Mendel in Mateis poročala o prisotnosti NK v plazmi bolnikov. Odkritju so dodelili pomen šele čez dve desetletji ob odkritju povišane koncentracije zunajcelične DNA v plazmi bolnikov s sistemskim eritematoznim lupusom, nadaljnje raziskave pa so pokazale višje vrednosti zunajcelične DNA v serumu bolnikov z rakavimi obolenji, še posebej pri tistih z metastazami (2). Proučevanje zunajceličnih NK se je znova razmahnilo v devetdesetih letih z razvojem novih analitskih metod za kvalitativno analizo DNA in metod za analizo mRNA (1).

1.1.1 Lastnosti, izvor in koncentracija zunajceličnih nukleinskih kislin

Zunajcelične NK imajo lastnosti celičnih NK, le da so fragmentirane. Zunajcelična DNA je dvoverižna, nizkomolekularna skupina molekul z velikostjo od 0,5 do 21 kb, strukturno povezanih s histoni v mono- in oligonukleosomi. Zunajcelične NK se v plazmi nahajajo v obliki apoptotičnih telesc, mono- in oligonukleosomov, proste in vezane na plazemske proteine (1). V plazmi lahko najdemo divji tip NK, ki izhaja iz normalnih jedrnih celic organizma, tumorski tip NK iz rakavih celic, fetalni tip NK iz celic ploda, humani eksogeni tip NK iz celic transplantiranega organa ali tkiva ter nehumani tip, čigar vir so celice nehumanega izvora (bakterije, glive, 3).

V plazmi kontrolnih skupin je nivo zunajcelične DNA do 50 µg/L in zunajcelične RNA do 250 µg/L, pri bolnikih pa lahko v obeh primerih preseže 3000 µg/L. Koncentracija zunajceličnih NK v telesnih tekočinah je rezultat ravnotežja mehanizmov sproščanja iz celic in mehanizmov odstranjevanja. Zunajcelične NK se iz krvnega obtoka odstranjujejo z razgradnjo z endonukleazami ali pa jih odstranjujejo celice retikuloendotelnega sistema in makrofagi. Mehanizmi odstranjevanja so zelo učinkoviti, zato je razpolovna doba eksogenih nukleosomov v krvi le nekaj minut, vendar pa je odstranjevanje upočasnjeno pri vezavi zunajceličnih NK na proteine (1). Med patološkimi procesi se koncentracija zunajceličnih NK v plazmi zvišuje, količina nukleosomov zelo poraste, razpolovni čas pa

se podaljša, saj je zmogljivost odstranjevanja presežena. Pri malignih boleznih je tudi zmanjšana aktivnost endonukleaz v krvnem obtoku, medtem ko pri vnetnih stanjih naraste plazemska koncentracija C-reaktivnega proteina (CRP), ki se veže na histone in tako zmanjša odstranjevanje nukleosomov (4).

Kljub številnim dokazom o prisotnosti zunajceličnih NK v plazmi bolnikov in zdravih izvor zunajceličnih NK še vedno ni pojasnjen. Pri zdravih ljudeh je najverjetnejši mehanizem sproščanja apoptoza, pri bolnikih so možni tudi drugi mehanizmi, kot so liza celic, nekroza ter spontano in aktivno sproščanje NK.

APOPTOZA: Pri zdravih osebah je apoptoza glavni mehanizem izločanja NK. Izvor so limfociti in druge normalne jedrne celice, ki jih v procesu apoptoze odstranijo in situ epiteljske celice in makrofagi. V prid apoptozi kaže tudi velikost fragmentov DNA v plazmi, ki so mnogokratniki dolžine DNA v nukleosomih, kot je to značilno za apoptozo. Prav tako koncentracija DNA v plazmi ali serumu korelira z aktivnostjo nevron-specifičnih enolaz in laktat-dehidrogenaze, ki sta označevalca celične smrti pri bolnikih z rakom.

NEKROZA: Terapija z obsevanjem sproži nekrozo rakavih celic. Po uspešni radioterapiji je pričakovati, da koncentracija zunajceličnih NK naraste zaradi razpada rakavih celic. Prav nasprotno pa je pokazala primerjava koncentracij zunajceličnih NK pred in po obsevanju. Koncentracija zunajceličnih NK se je namreč močno znižala, kar izključuje nekrozo kot prevladujoč mehanizem za prehod NK v plazmo.

LIZA CELIC: Hipoteza o lizi cirkulirajočih rakavih celic kot prevladujočem mehanizmu izvora zunajceličnih NK je bila zavrnjena. Število tumorskih celic je bilo v plazmi manjše, kot bi bilo potrebno za količino tumorske DNA, detektirane v plazmi.

SPONTANO IN AKTIVNO SPROŠČANJE NK: *In vitro* je bilo dokazano, da celice (limfociti) spontano sproščajo nukleoproteinske komplekse, predvsem novo sintetizirane DNA v zunajcelično okolje. S številnimi poskusi je bila zavrnjena možnost, da je sproščanje posledica celične smrti (5,6).

1.1.2 Stabilnost zunajcelične mRNA

Odkritje cirkulirajoče RNA je bilo zaradi splošno znane nestabilnosti presenetljivo. Eksogeno dodana RNA v plazmo se razgradi v nekaj sekundah zaradi delovanja v krvi

prisotnih RNaz, medtem ko je endogena RNA obstojna 24 ur pri 4 °C v krvi z dodatkom antikoagulantna EDTA. To kaže na to, da je endogena RNA lahko v plazmi zaščitena pred razgradnjo z nukleazami z določenimi mehanizmi (7). Ng in sod. so filtrirali vzorce plazme s filtri z različnimi velikostmi por in izvedli kvantitativno analizo mRNA gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaze (GAPDH). Po filtraciji skozi filter z velikostjo por 0,22 µm so ugotovili, da se je koncentracija mRNA GAPDH v povprečju zmanjšala kar za 15-krat. Ugotovitev so si razlagali tako, da se mRNA v serumu nahaja v obliki apoptotičnih teles ali vezana v proteinkse komplekse in je na tak način zaščitena pred delovanjem RNaz (2).

1.1.3 Možnosti uporabe zunajceličnih nukleinskih kislin v diagnostiki

Povišane vrednosti plazemske DNA so odkrili pri avtoimunih boleznih, kot je revmatoidni artritis in sistemski eritematozni lupus, nadaljnje raziskave pa so pokazale povišane vrednosti zunajcelične DNA v serumu bolnikov z rakavimi obolenji. Razvoj analitskih metod je omogočil tudi detekcijo sprememb v zunajcelični DNA pri rakavih bolnikih, kot so mikrosatelitske nestabilnosti in izguba heterozigotnosti pa tudi mutacije na onkogenih in tumor supresorskih genih, ki so značilne za tumorsko tkivo. Razvoj obratne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR) je omogočil detekcijo zunajcelične RNA, ki izhajajo iz tumorja, v plazmi bolnikov z nazofaringealnim karcinomom in melanomom. Kasneje so detektirali s tumorjem povezano mRNA različnih telomeraznih komponent v serumu oziroma plazmi bolnikov z rakom na prsah, s hepatocelularnim karcinomom, rakom na debelem črevesju in folikularnim limfomom (8). Analiza zunajceličnih NK predstavlja možnosti neinvazivne, zgodnje presejalne diagnostike bolezni, pridobivanja prognostičnih podatkov in sledenja uspešnosti zdravljenja rakavih obolenj (1).

Analiza zunajceličnih NK ploda v krvi matere ima prednosti pred konvencionalno prenatalno diagnostiko, kot sta horiontska biopsija in amniocenteza, saj omogoča zgodnejšo in predvsem neinvazivno odkrivanje genskih in genomskih sprememb ploda. NK ploda se v krvni obtok matere sprostijo iz poškodovanih celic posteljice, na primer trofoblastov in eritroblastov. Z današnjimi metodami jih zaznamo v četrtem tednu nosečnosti, zanesljivo pa od sedmega tedna naprej. Mnogi laboratoriji za molekularno diagnostiko imajo utečeno rutinsko določanje plodovega spola (1). Plodova DNA v krvi matere se uporablja za prenatalno določanje spola in s tem za izključitev dedovanja na kromosom X vezanih recesivnih bolezni (hemofilija, mišična distrofija), nevroloških

motenj, aneuploidij (Downov sindrom, trisomije) in določanje RhD statusa. Povišane vrednosti zunajcelične DNA so tudi kazalci bolezni in zapletov v nosečnosti, kot sta prezgodnji porod ali preeklampsija. V krvi matere so zaznali tudi plodovo zunajcelično RNA. Signifikantna razlika med plazemski nivoji mRNA kortikotropin sproščujočega faktorja (CRH) med zdravo nosečnico in nosečnico z eklampsijo je pokazala potencialno možnost uporabe zunajcelične plodovne RNA v diagnostične namene (8). Kvantifikacija plodovne zunajcelične mRNA za γ globin v plazmi matere pa lahko služi kot dokaz in ocena obsega fetomaternalne krvavitve (1).

Danes se intenzivno proučuje uporaba kvalitativne in kvantitativne analize zunajceličnih NK predvsem v tumorski in prenatalni diagnostiki. Najnovejše strokovne objave pa nakazujejo potencialne možnosti uporabe analize zunajceličnih NK tudi pri sladkorni bolezni, možganski kapi, travmatskih poškodbah in drugih bolezenskih stanjih (1). Antonatos in sod. so zaznali višje vrednosti zunajcelične DNA pri bolnikih z akutnim koronarnim sindromom kot pri zdravih preiskovancih. Poleg tega so ugotovili, da obstaja pozitivna korelacija med zunajcelično DNA in kreatin-kinazo ter troponinom I, kar kaže, da je količina sproščene DNA odvisna od obsega poškodbe srčne mišice. Najvišje vrednosti DNA v plazmi bolnikov so napovedovale kasnejše zaplete (9). Do danes pa še ni bila objavljena nobena študija, ki bi navajala analizo zunajceličnih NK v plazmi bolnikov s koronarno arterijsko boleznijo za ugotavljanje prisotnosti mRNA genov, ki sodelujejo pri nastanku in napredovanju bolezni.

1.2 Koronarna ateroskleroza

Ateroskleroza je kronična napredujoča bolezen arterij, ki predstavlja vodilni vzrok obolevnosti in umrljivosti v razvitem svetu (10). Kadar ateroskleroza zajame koronarne arterije, govorimo o koronarni arterijski bolezni (CAD; 11). Klinično se manifestira v zrelih letih; letna incidenca po 40. letu je 0,5 %. Za CAD so značilna obdobja stabilne angine, ki jo prekinjajo epizode akutnega koronarnega sindroma (AKS). Akutni miokardni infarkt ali nenadna srčna smrt sta pogosto prvi in nenapovedani klinični manifestaciji bolezni. Podatki v Sloveniji kažejo, da je število smrti zaradi akutnega miokardnega infarkta približno enako tako pri moških (1,7 %) kot pri ženskah (2,3 %, 3).

Metoda, ki je namenjena za odkrivanje že napredovale CAD, kadar so prisotne že obsežne zožitve koronarnega žilja, je koronarografija. Slednja se zaradi invazivnosti in uporabe

kontrastnih sredstev izvaja le pri bolnikih z značilnimi simptomi in pred posegom revaskularizacije. Na voljo je tudi nekoliko manj invazivna računalniška tomografija, ki zaradi izpostavljenosti preiskovanca rentgenskim žarkom ni primerna za uporabo v primarni preventivi. Motnje v miokardialni prekrvavitvi, ki so posledica napredovale CAD, lahko zaznamo tudi z neinvazivnimi metodami, kot sta stresna ehokardiografija in perfuzijska miokardna scintigrafija.

Danes se zaradi pomanjkanja zanesljivih, neinvazivnih metod odkrivanja aterosklerotičnih leh uporablja presajanje ogroženosti bolnikov na podlagi prisotnih dejavnikov tveganja in izračunane hipotetične verjetnosti za razvoj ateroskleroze. Osnovno laboratorijsko oceno tveganja za pojav in razvoj ateroskleroze lahko razberemo iz lipidnega profila, pri katerem določamo koncentracijo celokupnega holesterola, LDL ter HDL holesterola in trigliceride. Tudi določanje apolipoproteinov v krvi pripomore k oceni tveganja. ApoB se nahaja v aterogenih lipoproteinih (VLDL, IDL, LDL), ki pospešujejo aterosklerozo, ApoA1 pa se nahaja v lipoproteinih HDL, ki delujejo antiaterogeno in ščitijo pred aterosklerozo. Tako zvišana koncentracija holesterola LDL, ApoB in trigliceridov ter znižana koncentracija holesterola HDL in ApoA1 v serumu pomenijo višje tveganje za nastanek ateroskleroze. V novejšem času pa se vedno večji pomen pripisuje novejšim, neklasičnim dejavnikom tveganja, kot so povišane vrednosti lipoproteina (a), homocisteina, fibrinogena in CRP-ja (12). Med splošne dejavnike tveganja za aterosklerozo pa prištevamo genetsko nagnjenost (predispozicijo), spol, starost, način življenja (nezdrava prehrana, kajenje, premalo telesne aktivnosti, stres), sladkorno bolezen in povišan krvni tlak (10,13).

1.2.1 Etiologija ateroskleroze

Do nedavnega je veljalo prepričanje, da je ateroskleroza pretežno degenerativna bolezen, za katero je značilno kopičenje lipidov in nekrotičnega materiala v arterijski steni. V zadnjih letih pa so ugotovili, da je kopičenje holesterola in drugih lipidov le eden od procesov v aterogenezi. Vnetje ima ključno vlogo v vseh fazah aterogeneze, od pričetka, napredovanja do pretrganja plaka ter poleg intime zajame tudi medijo in adventicijo arterijske stene. Ateroskleroza prizadene velike in srednje velike arterije elastičnega in mišičnega tipa, predvsem na razcepiščih arterij in takoj za njimi, kjer je večja hemodinamska obremenitev (10,14). Razvile so se številne hipoteze o sprožitvi ateroskleroze, med katerimi je najširše sprejeta hipoteza o "odzivu na poškodbo

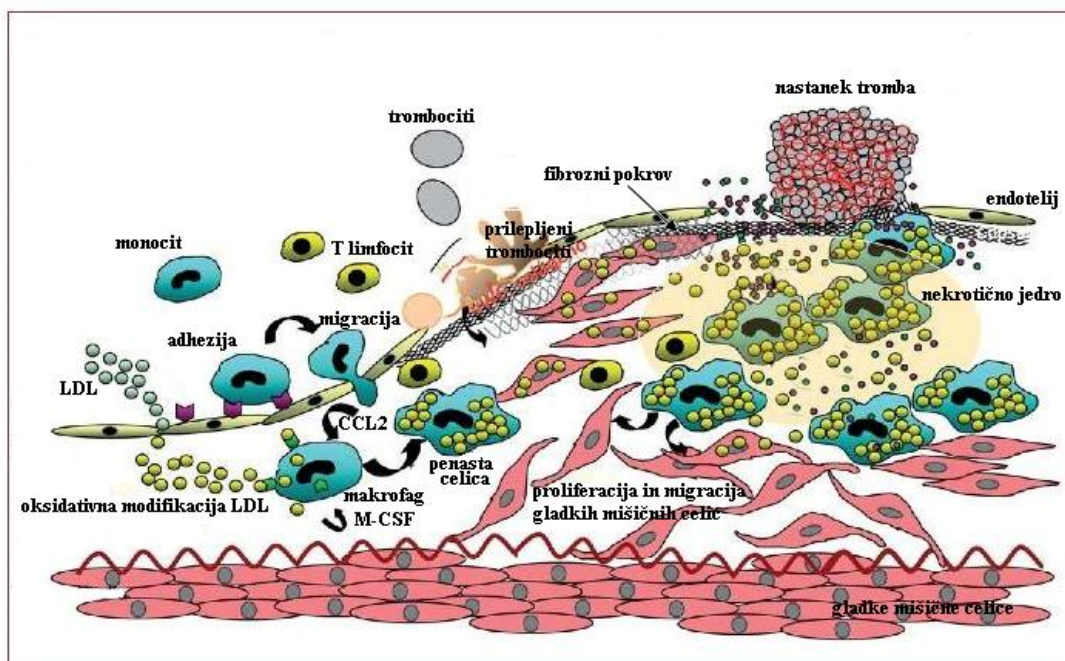
endotelija". Po tej hipotezi naj bi bila poškodba endotelijske celice prva stopnja v razvoju ateroskleroze, posledica je povečana prepustnost, ki privede do kopičenja različnih sestavin krvi v intimi. Poškodbo endotelijske celice lahko povzročijo velike strižne sile in tlak, imunske poškodbe, presnovne poškodbe, infekcije, reaktivne kisikove spojine in radikali kot tudi dejavniki zunaj žilne stene (sestava lipidov v plazmi, koagulabilnost krvi, 13).

1.2.2 Patogeneza ateroskleroze

Poškodbe endotelija vodijo v endotelijsko disfunkcijo, ki omogoči prehajanje delcev LDL skozi stike med endotelijskimi celicami iz krvi v intimo. V intimi poteče oksidativna modifikacija s pomočjo reaktivnih dušikovih in kisikovih spojin (10). Oksidativni stres vključno z oksidiranimi lipoproteini z aktivacijo transkripcijskega jedrnega dejavnika kapa B (NF- κ B) poveča izražanje adhezijskih molekul na endotelijskih celicah (14). Tudi vnetna citokina, TNF- α in IL-1, povečata izražanje adhezijskih molekul na endotelijskih celicah (15). Žilnocelične adhezijske molekule-1 (VCAM-1), medcelične adhezijske molekule-1 (ICAM-1), P-selektini in E-selektini omogočijo prilepljanje monocitov ter limfocitov na endotelijske celice (16). Pritrditvi sledi prehajanje monocitov preko stikov med endotelijskimi celicami v subendotelijski prostor pod vplivom kemokinskega liganda 2 (CCL2), ki nastaja znotraj intime. Tudi sam oksidiran LDL lahko deluje kemotaktično na monocite. Citokin oz. rastni faktor sintetiziran v vnetno spremenjeni intimi, makrofagni kolonijo stimulirajoči dejavnik (M-CSF), spodbudi monocite k diferenciaciji v makrofage. M-CSF poveča tudi izražanje odstranjevalnih receptorjev na makrofagih, preko katerih slednji prepoznajo in prevzamejo oksidiran LDL holesterol. Holesterol, razgradni produkt oksidiranih delcev LDL, se nalaga znotraj celice v obliki citosolnih kapljic. Makrofagi se tako spremenijo v t.i. penaste celice, ki lahko odmrejo in se kopičijo v intimi v obliki nekrotičnega jedra maščobne lehe (10,16).

Makrofagi in endotelijske celice na svoji površini izražajo tudi "toll-like" receptorje, na katere se lahko veže oksidiran LDL in povzroči aktivacijo celice (17). Aktivirani makrofagi sintetizirajo velike količine vnetnih citokinov (IL-1, TNF- α), rastnih dejavnikov, proteaz, reaktivnih kisikovih in dušikovih zvrsti (14). Pri nastajanju in napredovanju lehe pa sodelujejo tudi limfociti T, ki se preko VCAM-1 pritrdijo na endotelijske celice in pod vplivom kemotaktičnih faktorjev prehajajo v intimo. Tu srečajo antigene (oksidiran LDL) in pričnejo proizvajati citokine, ki delujejo na ostale celice

prisotne v lehi. Interakcija penastih celic in limfocitov T se poveže v kroničen vnetni proces (16,17).



Slika 1: Shematski prikaz aterogeneze od endotelijske disfunkcije do nastanka aterosklerotičnega plaka in tromboze (18)

Zaradi odziva na rastne dejavnike in citokine gladke mišične celice prehajajo v intimo. Tam se proliferirajo, prevzemajo oksidirane lipoproteine in se pretvorijo v penaste celice. Gladke mišične celice izločajo tudi proteine zunajceličnega matriksa, ki omogočajo nastanek fibroznega pokrova (15). Morfološko tako iz maščobne lehe, ki jo sprva sestavljajo penaste celice makrofagnega izvora, kasneje tudi penaste gladkomišične celice, nastane fibrozna leha. Shematski prikaz aterogeneze je prikazan na sliki 1.

1.2.3 Klinične manifestacije in zapleti ateroskleroze

Klinično se ateroskleroza koronarnih arterij lahko kaže kronično kot stabilna angina, bolj dramatični pa so akutni klinični dogodki, kot so miokardni infarkt, nestabilna angina ali nenadna srčna smrt. Stabilna angina je povezana z zožitvijo žilnega lumna, ki vodi do motenj v prekrvavitvi srčne mišice pri povečanem naporu ali stresu (14). Za akutne zaplete so zlasti nevarne nestabilne aterosklerotične lehe, ki so mnogokrat nehomogene, imajo velike lipidne vložke, tanek fibrozni pokrov, malo gladkomišičnih celic in vsebujejo večje

število vnetnih celic (10). Nagnjenost za pretrganje fibroznega pokrova lehe zvišujejo dejavniki, ki zavirajo sintezo kolagena v gladkomišičnih celicah oziroma spodbujajo apoptozo teh celic (IFN- γ iz limfocitov T, nekateri citokini iz makrofagov), in dejavniki, ki spodbujajo razgradnjo zunajceličnega matriksa (metaloproteinaze in elastolitični katepsini iz makrofagov). Zmanjšana stabilnost lehe vodi do rupture na robu lehe na mestu, kjer vstopajo in se akumulirajo makrofagi. Takrat tkivni faktor iz lehe pride v stik s faktorji koagulacije iz krvi, kar sproži koagulacijsko kaskado, adhezijo trombocitov in trombozo (14).

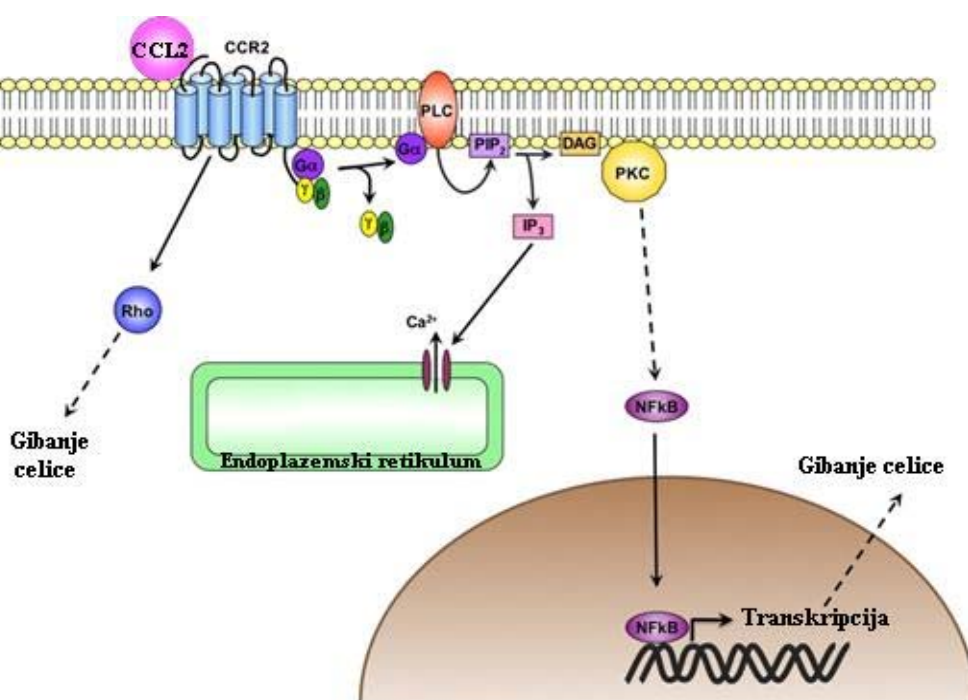
1.3 Kemokinski ligand 2 (CCL2)

Kemokinski ligand 2 (CCL2), poznan tudi kot monocitni kemotaktični protein-1 (MCP-1), spada v družino kemokinov CC, majhnih kemotaktičnih citokinov. Gen, ki ga kodira, se nahaja na sedemnajstem kromosomu (17q11.2). Protein se sintetizira kot prekuzorski protein, sestavljen iz signalnega peptida iz 23 aminokislin in zrelega peptida iz 76 aminokislin. Izloča se v različnih oblikah z molekulsko maso 9 in 13 kDA, kar je rezultat različne O-glikozilacije, vendar to nima vpliva na sposobnost delovanja na kemotakso monocitov (19,20).

CCL2 lahko proizvajajo številne celice: endotelijske celice, gladke mišične celice, fibroblasti, limfociti T, glavni vir pa predstavljajo monociti oz. makrofagi (19). Dejavniki tumorske nekroze alfa (TNF- α), interferon gama (IFN- γ), trombocitni rastni dejavnik (PDGF), oksidirani LDL, homocistein, angiotenzin in drugi stresni faktorji povečajo izražanje *CCL2* na nivoju transkripcije, nasprotno pa ga retinojska kislina, glukokortikoidi in estrogen zavirajo. V mnogih od naštetih regulatornih odzivih igra pomembno vlogo provnetni transkripcijski faktor NF- κ B. Patogeni dejavniki, kot so TNF- α , IL-1, oksidirani LDL, homocistein, angiotenzin II in III, povzročijo hitro aktivacijo NF- κ B, ki ima vezavno mesto na promotorski regiji gena *CCL2* ter uravnava njegovo transkripcijo. Tudi reaktivne kisikove spojine lahko delujejo kot prenašalci signala za transkripcijske faktorje, kot sta NF- κ B in aktivatorski protein-1 (AP-1) (20).

CCL2 posreduje svoje učinke z delovanjem na kemokinski receptor CCR2, sklopljen z G-proteinom, na tarčnih celicah. CCR2 je konstitutivno izražen na monocitih, medtem ko je za izražanje CCR2 na limfocitih T potrebna njihova predhodna aktivacija. Plazemski lipoproteini lahko regulirajo izražanje *CCR2* na monocitih, delci LDL jo povečajo, delci

HDL pa znižajo. Vezava liganda na receptor privede do aktivacije receptorja in sproži kaskado celičnih reakcij, katerih rezultat je aktivacija fosfolipaze C (PLC), ki cepi fosfatidilinozitol bifosfat (PIP₂) na diacilglicerol (DAG) in inozitol trifosfat (IP₃). Slednji sprosti znotrajcelične zaloge kalcija v citosol, DAG pa aktivira protein kinazo C (PKC), ki aktivira od PKC odvisni jedrni faktor kapa B (NF-κB) in s tem poveča izražanje številnih genov, odgovornih za usmerjeno gibanje celice. Vezava CCL2 na receptor aktivira tudi proteine iz družine Rho proteinov, majhne GTP vezavne proteine (slika 2). Aktivacija Rho proteinov vpliva na gibanje celic s spremembami v aktinskem citoskeletu, nastanku psevdopodij in nagubanju membrane (20,21).



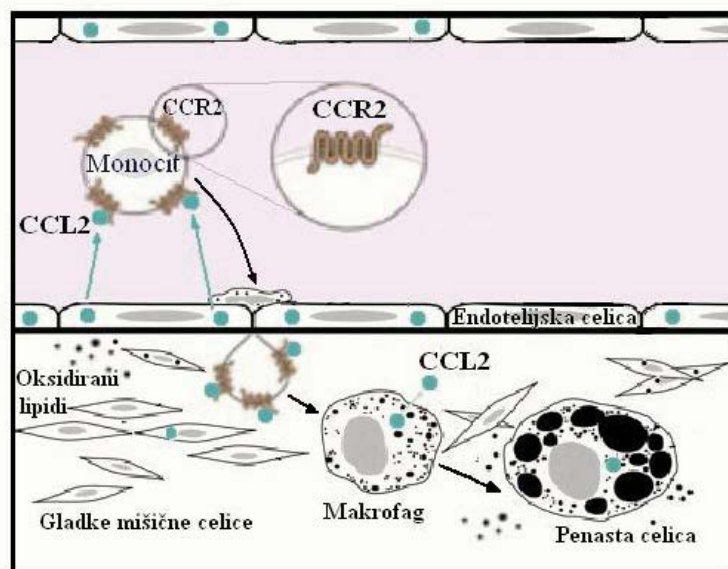
Slika 2: Signalne poti, ki jih aktivira CCL2 po vezavi na CCR2 (20)

Kot že samo ime pove, CCL2 na monocite deluje kemotaktično in povzroči transendotelijsko migracijo teh celic. Dodatno lahko deluje kemotaktično tudi na limfocite T in naravne celice ubijalke (19). Vezava CCL2 na receptor pa sproži tudi spremembe v izražanju genov, ki vodijo v nastajanje biološko aktivnih molekul. *In vitro* CCL2 v monocitih poveča izražanje vnetnih citokinov IL-6 ter IL-1 ter adhezijskih molekul (22). Monociti pod vplivom CCL2 povečajo tudi izražanje metaloproteinaz. CCL2 poveča, sintezo in aktivacijo tkivnega faktorja ter sintezo IL-6 v gladkomišičnih celicah in njihovo

proliferacijo (23,24). Prav tako vezava CCL2 na receptor v monocitih aktivira protein, imenovan z monocitnim kemotaktičnim proteinom-1 induciran protein (MCPIP). Ta transkripcijski faktor poveča izražanje apoptotičnih genov, ki so povezani z angiogenezo in remodelacijo žilja (25). Povečano ekspresijo MCPIP so povezali tudi z apoptozo kardiomiocitov v miškah z izbitim genom *CCL2* in pri ljudeh z odpovedjo srca (26).

1.3.1 Vloga CCL2 v patogenezi ateroskleroze

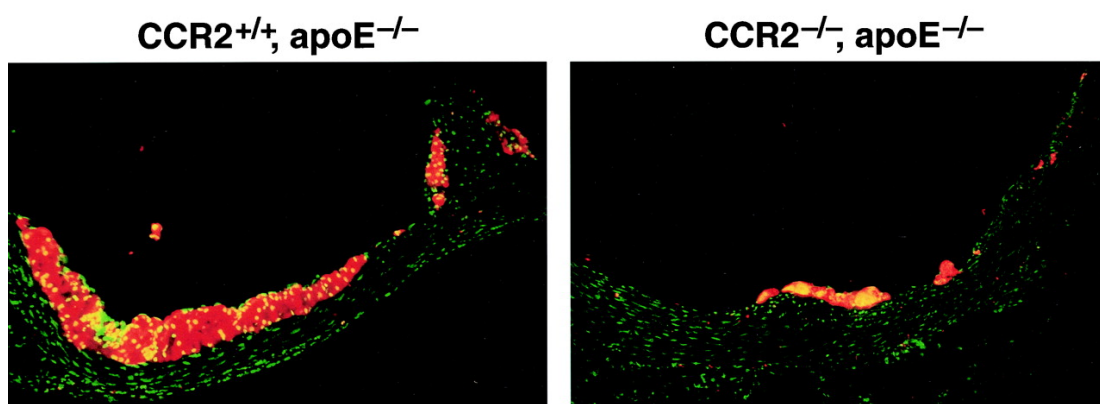
Povečano izražanje *CCL2* je značilno za patološka stanja, povezana z vnetjem in infiltracijo monocitov. Mnogo eksperimentalnih dokazov kaže, da je *CCL2* visoko izražen v aterosklerotičnih lelah in ima osrednjo vlogo pri privabljanju monocitov v intimo arterije. Minimalno oksidiran LDL, vendar ne nativni LDL, sproži sintezo CCL2 v endotelijskih in gladkih mišičnih celicah žilne stene. Sintetizirani CCL2 se veže na luminalno stran endotelijskih celic preko proteoglikanov in vstopa v interakcije z receptorjem, izraženim na površini cirkulirajočih monocitov. Ta interakcija sproži trdno z integrini posredovano adhezijo monocita na endotelijsko celico, katere rezultat je vstop levkocitov v subendotelijski prostor (slika 3).



Slika 3: Vstop monocitov v nastajajoči aterosklerotični plak pod vplivom CCL2 (27)

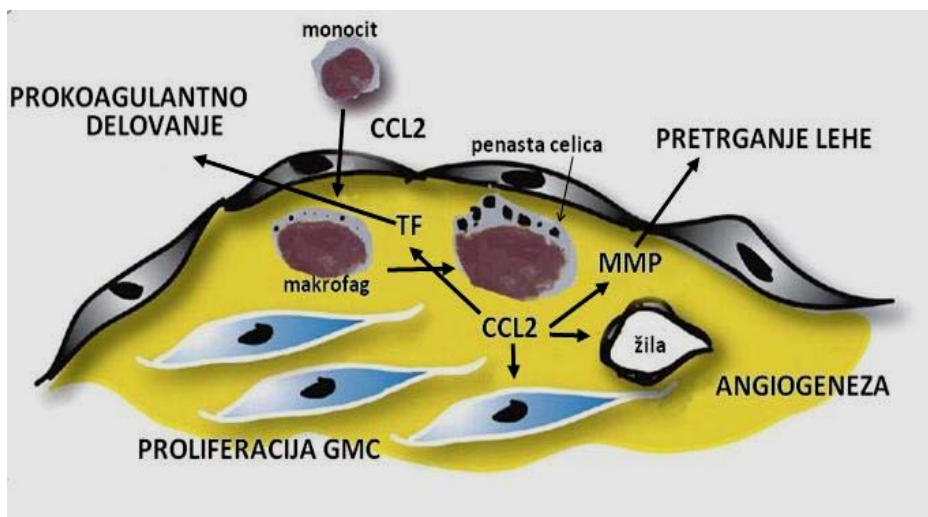
Študije na gensko spremenjenih živalih so priskrbele močne dokaze, da ima CCL2 glavno vlogo pri privabljanju monocitov v žilno steno. Izbris gena *CCL2* je pri miškah brez

receptorja za LDL in pri miškah s povečanim izražanjem ApoB zagotovil znatno stopnjo zaščite pred nastankom z dieto sprožene ateroskleroze in močno zmanjšal vstopanje monocitov v žilno steno, brez sprememb v metabolizmu lipoproteinov. Poleg tega je izbris gena za CCR2, edinega funkcionalnega receptorja za CCL2, zmanjšal kopičenje makrofagov v aterosklerotično leho (slika 4) ter zaščitil pred nastankom ateroskleroze miške brez ApoE, ki so prejemale hrano z veliko holesterola ali so bile na normalni dieti. Dodatno je zaviranje *CCL2* s transfekcijo mutirane oblike N-terminalnega dela gena *CCL2* v hiperholesterolemičnih miškah značilno zavrta nastanek novih ateroskleroznih plakov (28).



Slika 4: Zmanjšano kopičenje makrofagov pri miškah brez CCR2 (29)

Potencialna vloga CCL2 v napredovanju aterosklerotične bolezni in pretrganju plaka je manj raziskana (slika 5). CCL2 sproži proliferacijo in migracijo gladkih mišičnih celic v intimo in kaže angiogene učinke, spodbuja nastanek žil v plaku, kar lahko povzroči hitro napredovanje bolezni. CCL2 lahko tudi vpliva na pretrganje lehe z induciranjem izražanja in sproščanja metaloproteinaz, ki pripomorejo k raztapljanju zunajceličnega matriksa. Dodatno ima CCL2 prokoagulantne lastnosti, saj spodbuja sintezo in aktivnost tkivnega faktorja v gladkih mišičnih celicah. Čeprav primanjkuje dokazov o pomembnosti teh mehanizmov *in vivo*, je uporaba protiteles za CCL2 in MCP-5 v miškah brez ApoE povzročila nastanek stabilnega plaka s povečano vsebnostjo kolagena. Prav tako je zaviranje *CCL2* z gensko terapijo omejilo napredovanje že obstoječih leh v aorti pri hiperholesterolemičnih miših. Ta pristop je tudi spremenil sestavo plaka v bolj stabilen fenotip, z manj makrofagi ter limfociti, manj lipidi in več mišičnimi celicami ter kolagenom (28).



Slika 5: Vloga CCL2 pri napredovanju aterosklerotične bolezni (30)

1.3.2 Vloga CCL2 pri celjenju srčne mišice po infarktu

CCL2 ima pomembno vlogo tudi v procesih v srcu po akutnem miokardnem dogodku, pri zdravljenju infarkta in srčni remodelaciji. Po ponovni vzpostavitvi krvnega pretoka skozi ishemično srce je med vnetno fazo v infarktne območju izražanje *CCL2* izrazito in prehodno povečano ter posreduje vstop monocitov v ishemično srce. Monociti se diferencirajo v makrofage, odstranjujejo odmrlo tkivo in sintetizirajo citokine ter rastne faktorje. CCL2 izkazuje pomembne učinke na infarktno srce tudi z direktnim angiogenim učinkom na žilni endotelij in z modulacijo fenotipa in aktivnosti fibroblastov. Ko poteka celjenje infarkta, je sinteza CCL2 zavrtja, vnetje se ustavi in nastane fibrozno tkivo (31). Rezultat podaljšane sinteze kemokina je nastanek granulacijskega tkiva v večjem obsegu in škodljiva remodelacija ventriklov. Pravočasno zavrtje vnetnega odgovora je torej bistvenega pomena za optimalno celjenje (28).

1.3.3 Koncentracije CCL2 v krvi

Plazemske koncentracije CCL2 korelirajo z večino tradicionalnimi faktorji tveganja za aterosklerozo (32). Poročajo tudi o povezavi med določeni polimorfizmi v genu *CCL2* in višjih vrednostih CCL2 ter povečanjem tveganju za miokardni infarkt (33). Povišane vrednosti CCL2 v plazmi pa povezujejo tudi s povečano incidenco koronarnih in perifernih arterijskih bolezni (34).

Plazemske vrednosti CCL2 so zvišane pri bolnikih s CAD, najvišje vrednosti imajo bolniki z AKS. Nishiyama in sod. so merili plazemske koncentracije CCL2 bolnikov z AKS in

stabilno angino; višje so bile pri bolnikih z AKS (35). Pri bolnikih z AKS so povišani plazemski nivoji CCL2 povezani s povečanim tveganjem za smrt in ponovne ishemične dogodke (36).

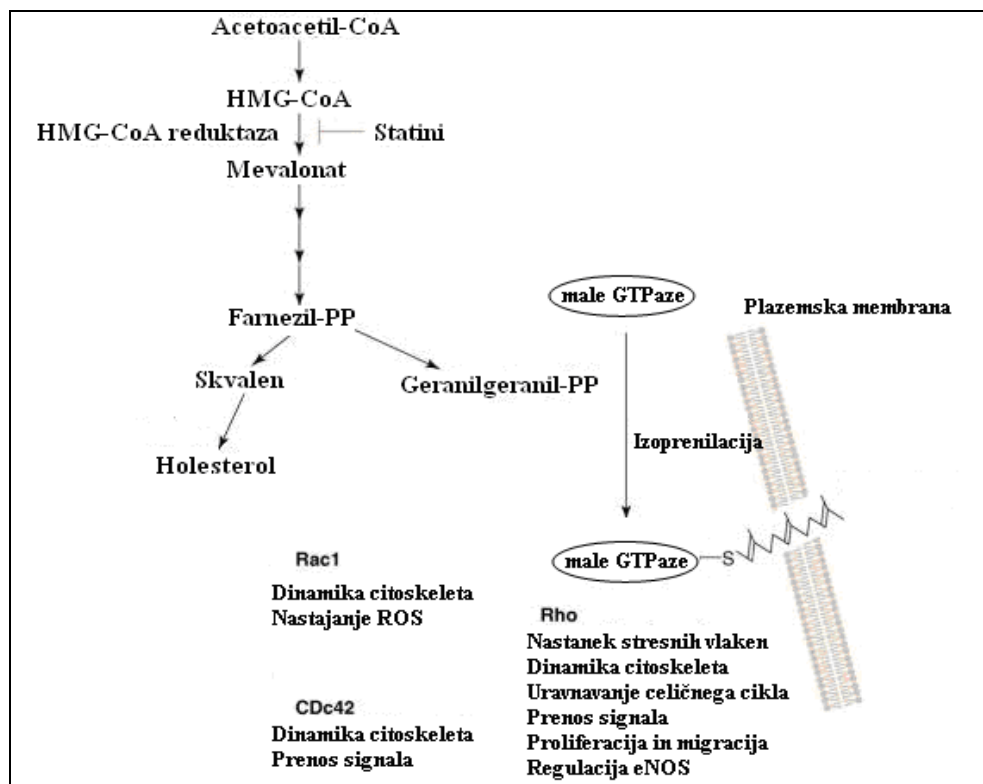
1.4 Statini

1.4.1 Osnovni mehanizem delovanja

Statini so najbolj široko predpisana zdravila za zniževanje koncentracija holesterola v plazmi. V hepatocitih inhibirajo encim 3-hidroksi-3-metilglutaril-koencim A (HMG-CoA) reduktazo, ki pretvori HMG-CoA v mevalonat, prekursor holesterola, in s tem zmanjšajo endogeno sintezo holesterola. Statini tekmujejo s HMG-CoA za vezavo na aktivno mesto encima in po reverzibilni vezavi povzročijo spremembo konformacijske strukture encima. Hepatociti kompenzirajo zaradi delovanja statinov zmanjšano endogeno sintezo holesterola s povečanim izražanjem receptorjev za LDL. Posledično se poveča privzem plazemskih LDL, ki so glavni prenašalci zunajceličnega holesterola, kar vodi v znižanje plazemskih vrednosti holesterola. Statini prav tako povzročijo povišanje plazemskih vrednosti HDL (37).

1.4.2 Mehanizem pleiotropnih učinkov statinov

Statini močno zmanjšajo tveganje za zaplete krvožilnih bolezni, vendar njihovih učinkov ne moremo v celoti razložiti z znižanjem ravni holesterola v plazmi. Rezultati kliničnih preizkušanj namreč kažejo, da imajo statini tudi druge učinke, tako imenovane pleiotropne učinke. V širšem smislu so to vsi učinki, ki niso odvisni od neposrednega učinka na holesterol, v ožjem smislu pa gre za učinke, ki so najverjetneje posledica manjše tvorbe izoprenoidov. Statini z blokado HMG-CoA reduktaze namreč inhibirajo tudi sintezo nesteroidnih izoprenoidnih intermediatov, ki nastanejo v sintezni poti holesterola, kot sta farnezilpirofosfat (FPP) in geranilgeranilpirofosfat (GGPP, slika 6). Izoprenoidi imajo pomembno vlogo v post-translacijski modifikaciji proteinov in se v procesu, imenovanem prenilacija, kovalentno vežejo na cisteinske ostanke proteinov. Pomen prenilacije je, da se proteini z lipidnim delom lahko zasidrajo v membrano in tam opravljajo svojo funkcijo. Prenilirani proteini imajo pomembno vlogo pri sestavi prenašalnih molekul RNA, sintezi glikoproteinov, delovanju celične membrane, dinamiki citoskeleta, endocitozi/eksocitozi ter celičnem signaliziranju, proliferaciji in diferenciaciji (37,38).



Slika 6: Prikaz biosintezne poti holesterola in posledice zaviranja HMG-CoA-reduktaze s statini (38)

Legenda: ROS – reaktivna kisikova spojina; eNOS – endotelna NO-sintaza

Monomerni GTP vezavni proteini (male GTPaze) iz družine Ras in Rho so glavni substrati za prenilacijo. V neaktivnem stanju se nahajajo v citoplazmi in imajo vezan GDP. Po aktivaciji celice se GDP zamenja z GTP in sledi translokacija aktivnega proteina na celično membrano. Proteini iz družine Rho (RhoA, Rac in Cdc42) regulirajo spremembe aktinskega citoskeleta, dinamiko mikrotubulov, polarnost celice, celični cikel. Spremembe v aktinskem citoskeletu vplivajo na intracelularni transport, razvrščanje proteinov na membrano, mRNA stabilnost in transkripcijo genov (38).

Zaviranje Rho proteina in z Rho povezane proteinske kinazne poti (Rho/ROCK) je bilo označeno kot najpomembnejši mehanizem mnogih pleiotropnih učinkov statinov. Direktna inhibicija Rho proteina ali njegovega efektorja ROCK je povzročila enake učinke kot s statini povečana sinteza NO, zmanjšana kontrakcija in proliferacija gladkih mišičnih celic, zmanjšana sinteza citokinov ter trombogenost žilne stene. *In vivo* so pokazali, da statini zavirajo aterogeno Rho/ROCK signalno pot v odvisnosti od časa in odmerka (39).

Rac protein je vključen v remodelacijo aktinskega skeleta pa tudi v sintezo reaktivnih kisikovih spojin z aktivacijo NADPH oksidaznega sistema. Aktivacija Rac proteina je povezana z aterosklerozo, proliferacijo neointime, hipertrofijo srčne mišice in endotelijsko disfunkcijo. Statini inhibirajo z Rac sproženo NADPH oksidazno aktivnost (38).

NF- κ B in AP-1 sta transkripcijska faktorja, ki vplivata na ključne korake v razvoju ateroskleroze z regulacijo izražanja genov, ki kodirajo citokine, celične adhezijske molekule, kemokine in rastne faktorje. Dichtl in sod. so pokazali, da statini v kulturi endotelijskih in gladkih mišičnih celic zavirajo aktivacijo teh transkripcijskih faktorjev (40). Namreč RhoA, geranilgeraniliran protein, je vključen v aktivacijo NF- κ B, Ras-protein pa aktivira prvo kinazo v MAP kinazni poti, katere rezultat je aktivacija AP-1. Tako statini preko uravnavanja prenilacije malih GTPaz zavirajo te poti in zmanjšajo nastajanje provnetnih molekul.

1.4.3 Zaščitni pleiotropni učinki statinov

Mnoge raziskave so razkrile številne učinke statinov, ki delujejo na različne tipe celic in so predvsem vazoprotektivni. Statini izboljšajo delovanje endotelija preko znižanja ravni holesterola ali z mehanizmi, ki niso odvisni od holesterola. Delujejo na sintezo in sproščanje vazoaktivnih prenašalcev. Zavirajo izražanje in nastajanje endotelina-1, ki je močan vazokonstriktor, s spodbujanjem in pozitivnim uravnavanjem endotelne NO-sintaze pa povečajo biološko uporabnost NO, kar za endotelij predstavlja zaščitno delovanje. Z zaviranjem izražanja adhezijskih molekul, vnetnih in kemotaktičnih citokinov zmanjšajo prisotnost vnetnih celic v intimi žile in zmanjšajo vnetno dogajanje. V raziskavi PRINCE so po 24 tednov trajajoči terapiji zabeležili znižanje CRP-ja, nespecifičnega označevalca vnetja, za 16,9 % (37). Zaviralni učinek statinov je bil zaznan tudi pri proliferaciji in migraciji gladkih mišičnih celic (41). Statini delujejo tudi antioksidativno, kar je posledica zaviranja NADPH-oksidade, encima, ki sodeluje pri nastanku reaktivnih kisikovih spojin. Poleg tega pa povečajo izražanje hem oksigenaze-1 in nastajanje ogljikovega monoksida ter biliverdina, ki delujeta kot antioksidanta (38). Znižanje plazemskih vrednosti holesterola s statini lahko prispeva k stabilnosti plaka z zmanjšanjem njegove velikosti ali spremenjenih lastnosti lipidnega jedra. Statini v okviru pleiotropnih učinkov stabilizirajo plak, saj povečajo vsebnost kolagena v plaku, zavirajo vnetne procese ter aktivnost metalproteinaz, ki razgrajujejo fibrozni pokrov (37). Posledica delovanja statinov je tudi

zaviranje funkcije trombocitov z zmanjšano sintezo TXA2 in znižanjem količine holesterola v membrani trombocitov, kar najverjetneje zmanjša njihov trombogeni potencial. Prav tako zavirajo sintezo tkivnega faktorja v makrofagih (42). Antitrombotični učinek pa dosegajo tudi z zmanjšano sintezo inhibitorja plazminogenkega aktivatorja 1 (PAI-1) in povečano sintezo tkivnega plazminogenkega aktivatorja (t-PA), kar poveča fibrinolizo in razgradnjo tromba (38).

1.4.3.1 Statini in CCL2

Znižanje koncentracije CCL2 upočasni prehod monocitov iz krvi pod endotelij, v žarišče aterosklerotičnih leh. Po raziskavah sodeč je to eden od mehanizmov, ki prispeva k učinkovitosti statinov pri zdravljenju ateroskleroze. Romano in sod. so opazovali učinke statinov (lovastatina in simvastatina) na *in vitro* sintezo CCL2. Tako v monocitih kot tudi v endotelijskih celicah so zaznali zmanjšano nastajanje CCL2 in izražanje njegovega gena v prisotnosti statinov. V isti študiji je dodatek mevalonata prevladal nad zaviralnim učinkom statinov na nastajanje CCL2. To opažanje kaže na vlogo mevalonat-izoprenoidne poti v sintezi citokinov (43). Do enakih rezultatov so prišli tudi Rezaee-Majd in sod. Inkubacija endotelijskih celic in monocitov s simvastatinom, atorvastatinom ali cerivastatinom je povzročila znižano izražanje mRNA *CCL2* v odvisnosti od časa in odmerka. Nadalje so po 6 tednih terapije s statini v serumu hiperholesterolemičnih bolnikov zaznali signifikanten upad koncentracije CCL2 in zmanjšano ekspresijo mRNA proteina v cirkulirajočih monocitih (44). Pri bolnikih z akutnim koronarnim sindromom je štiritredenska terapija z atorvastatinom (10 mg/dan) signifikantno znižala plazemske vrednosti CCL2 (45).

2 NAMEN IN DELOVNA HIPOTEZA

Aterosklerotična leha je klinično nema, dokler ne zožuje svetline koronarne arterije in dokler je leha stabilna. Pogosto se kot prvi in nenapovedani klinični manifestaciji bolezni kaže akutni koronarni sindrom in nenadna srčna smrt, zato je pomembno zgodnje odkrivanje aterosklerotičnih sprememb z metodami, ki so bolniku prijazne. Danes še ni na voljo dovolj zanesljive in neinvazivne metode, ki bi omogočala zgodnje odkrivanje aterosklerotičnih plakov.

Analiza zunajceličnih NK omogoča neinvaziven vpogled v tkivo oz. organ, iz katerega NK izhajajo. Z analizo zunajceličnih NK bi lahko ugotovili, kako se proteini izražajo v žilni steni, in sklepali na procese, ki tam potekajo. Iz številnih raziskav vemo, da je v aterosklerotični lehi povečano izražanje *CCL2*. Predvidevamo, da z različnimi mehanizmi mRNA *CCL2* iz celic žilne stene prehaja v ekstracelularni prostor pa tudi v kri.

Naši delovni hipotezi sta:

- 1) V plazmi bolnikov s stabilno angino obstaja mRNA *CCL2* in je njen nivo mogoče izmeriti.
- 2) Bolniki s stabilno angino imajo v plazmi zvišan nivo mRNA *CCL2* v primerjavi s kontrolno skupino.

Hipotezi bomo preverili z merjenjem koncentracije zunajcelične mRNA gena *CCL2* v plazmi bolnikov s stabilno angino in zdravih preiskovancev. Iz plazme preiskovancev bomo izolirali zunajcelične NK z uporabo reagenčnega kompleta QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit. Z reverzno transkripcijo bomo prepisali mRNA v cDNA in izmerili njen nivo z metodo PCR v realnem času.

Potrjeni hipotezi bi pomenili, da lahko z analizo plazemskega nivoja mRNA *CCL2* neinvazivno spremljamo izražanje *CCL2* v aterosklerotični koronarni žilni steni.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Vzorci

Raziskavo smo izvedli na vzorcih 62 ljudi, od tega 33 zdravih in 29 bolnikov s stabilno angino (SA). Bolniki s SA so se zdravili na *Kliničnem oddelku za kardiologijo Univerzitetnega Kliničnega centra v Ljubljani*. V študijo so bili vključeni bolniki s SA, napoteni na rutinsko koronarno angiografijo. Diagnoza SA je bila postavljena na podlagi klinične ocene, EKG in laboratorijskih izvidov. Angiografsko dokazana koronarna ateroskleroza je ocenjena kot prisotnost vsaj ene obstruktivne koronarne lezije/zožitve, ki zožuje svetlino epikardne arterije ali njene večje veje za vsaj 50 %. Zdravljenje s statini, z antihipertenzivi in aspirinom je bilo zabeleženo. Kadičci, bolniki s hipertenzijo ali posamezniki, ki imajo sladkorno bolezen, iz študije niso bili izključeni. Bolniki z vnetnimi obolenji, ledvičnimi boleznimi (če je bila koncentracija kreatinina v serumu več kot 120 $\mu\text{mol/L}$), jetrnimi boleznimi, boleznimi ščitnice, endokrinimi in neoplastičnimi boleznimi so bili iz študije izključeni.

V kontrolno skupino smo vključili zdrave prostovoljce, ki niso imeli subjektivnih težav (prsna bolečina) in so po oceni morebitnih dejavnikov tveganja (krvni tlak, glukoza in lipidi v serumu, kajenje, družinska obremenitev) imeli tveganje za ishemične zaplete koronarne ateroskleroze manjše od 10 % (45).

Preiskovanci so bili seznanjeni z obsegom in namenom raziskave in so svoj pristanek za sodelovanje tudi pisno potrdili. Raziskavo je odobrila *Komisija za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravje Republike Slovenije*.

3.1.1 Priprava vzorcev

Vsem preiskovancem smo za potrebe raziskave odvzeli 6 mL venske krvi z dodatkom antikoagulant K-EDTA. Kri je bila odvzeta zjutraj na tešče in pred posegom koronarne angiografije. Vzorce smo pripravili najkasneje v eni uri od odvzema, da bi se izognili razgradnji mRNA in lizi celic. Odvzeto kri smo centrifugirali 10 minut pri 1600 x g na 4 °C, nato smo plazmo v aseptični komori previdno odpipetirali v čisto mikrocentrifugalno epruveto in jo ponovno centrifugirali 10 minut pri 16000 x g na 4 °C. Po drugem centrifugiranju smo v čiste kriovijale odpipetirali po 250 μL plazme in jih do nadaljnje

analize hranili v tekočem dušiku. Pri obeh pipetiranjih smo za nadaljnjo uporabo odpipetirali plazmo, ki je bila najmanj 0,5 mm nad usedlino celic ali dnom epruvete. Hemoliziranih vzorcev nismo uporabili.

3.2 Materiali in aparature

- komora za izolacijo RNA: DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M-AR (Biosan, Latvija)
- pipete: 100-1000 μL , 10-100 μL , 0,5-10 μL ; nastavki za pipete: 100-1000 μL , 10-100 μL , 0,5-10 μL (Eppendorf, Nemčija)
- mikrocentrifugirne epruvete brez RNaz (Multi TabTop Tube)
- centrifuge: Centrifuge 5804 R (Eppendorf, Nemčija), Centrifuge 5415 R (Eppendorf, Hamburg Nemčija), Centric 322A (Tehtnica, Slovenija)
- termostat Cooling-Heating Thermostat CH-100 (Biosan, Latvija)
- vibracijski mešalnik FVL-2400N, CombiSpin (Biosan, Latvija)
- PCR/ Thermal Cycler MWG Primus 96 plus (AG Biotech, Nemčija)
- mikrotitrna ploščica MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, (Applied Biosystems, ZDA)
- prozorna samolepilna folija MicroAmp® Optical Adhesive Film (Applied Biosystems, ZDA)
- ciklični pomnoževalnik: ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, ZDA)
- avtoklav Kambič
- rokavice za enkratno uporabo
- hladilniki in zamrzovalniki

3.3 Metode

3.3.1 Izolacija zunajceličnih nukleinskih kislin

Princip postopka:

Postopek QIAamp MinElute Virus Spin je sestavljen iz štirih korakov (liza, vezava, izpiranje, elucija) in ga izvajamo s kolonami QIAamp MinElute v standardni mikrocentrifugi. Proteine v vzorcu liziramo pod močno denaturacijskimi pogoji pri visokih

temperaturah. Liza proteinov poteka ob prisotnosti proteaze QIAGEN in pufra AL, ki skupaj zagotavljata inaktivacijo RNaz. Pogoje za vezavo na membrano dosežemo z dodatkom etanola, kar omogoči optimalno vezavo RNA. Lizate nato prenesemo na kolone QIAamp MinElute, kjer se NK adsorbirajo na silikatno gelsko membrano, medtem ko lizat odstranimo s centrifugiranjem. Soli in pH zagotavljajo, da proteini in druge nečistoče, ki bi lahko motile PCR in druge kasnejše reakcije, ne zastajajo na membrani. NK ostanejo vezane na membrani, medtem ko nečistoče učinkovito odstranimo s trikratnim izpiranjem. Nato v enem koraku visoko očiščeno RNA in DNA eluiramo s pufrom AVE na sobni temperaturi. Elucijo lahko izvedemo tudi z vodo, prosto RNaz. Kolone QIAamp MinElute dovoljujejo uporabo minimalnih elucijskih volumnov, kot je 20 µl. Nizki elucijski volumni dajejo eluate z visoko koncentracijo NK. V nadaljnjih aplikacijah, ki zahtevajo majhne začetne volumne (npr. nekateri testi PCR in RT-PCR), lahko bolj koncentriran eluat zviša občutljivost testa. Za aplikacije, ki zahtevajo višje začetne volumne, pa lahko zvišamo elucijski volumen do 150 µl. Seveda bo večji volumen eluata pomenil znižanje koncentracije NK v eluatu. Na končni volumen eluata pa vpliva tudi narava vzorca (46).

Reagenti:

- reagenčni komplet s komercialnim imenom QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN, Hilden, Nemčija): QIAamp kolone, 2 mL zbirne epruvetke, pufer AL, AVE, koncentracije pufrov AW1, AW2, QIAGEN proteaze, pufer za raztapljanje proteaze, nosilec RNA, navodila za uporabo.

Pripravljeno raztopino nosilca RNA hranimo pri -20 °C, ostale reagente pri sobni temperaturi (15–20 °C);

- absolutni etanol (96–100 %);
- detergent za odstranitev RNaz (RNaseZap, Ambion);
- voda brez RNaz (HyClone HyPure Molecular Biology Grade Water, Thermo Scientific).

Raztopine, ki jih pripravimo z reagenčnim kompletom:

- Raztopina nosilca RNA: 310 µL pufra AVE, da dobimo koncentracijo 1 µg/L. Popolnoma raztopimo nosilec RNA, ga razdelimo na ustrezno velike alikvotne ter hranimo pri -20 °C. Alikvotov ne zamrzujemo in ne odtajamo več kot trikrat.
- Pufer za spiranje 1 (Pufer AW1): koncentratu pufra dodamo 25 mL absolutnega etanola (96–100 %).

- Pufer za spiranje 2 (Pufer AW2): koncentratu pufera dodamo 30 mL absolutnega etanola (96–100 %).
- Raztopina proteaz (QIAGEN proteaz): raztopini dodamo 1,4 mL pufera AVE ali pufer za raztapljanje proteaze. QIAGEN proteazo razdelimo na ustrezno velike alikvote in shranjujemo pri temperaturi -20 °C. Alikvotov ne zamrzujemo in ne odtajamo več kot trikrat.

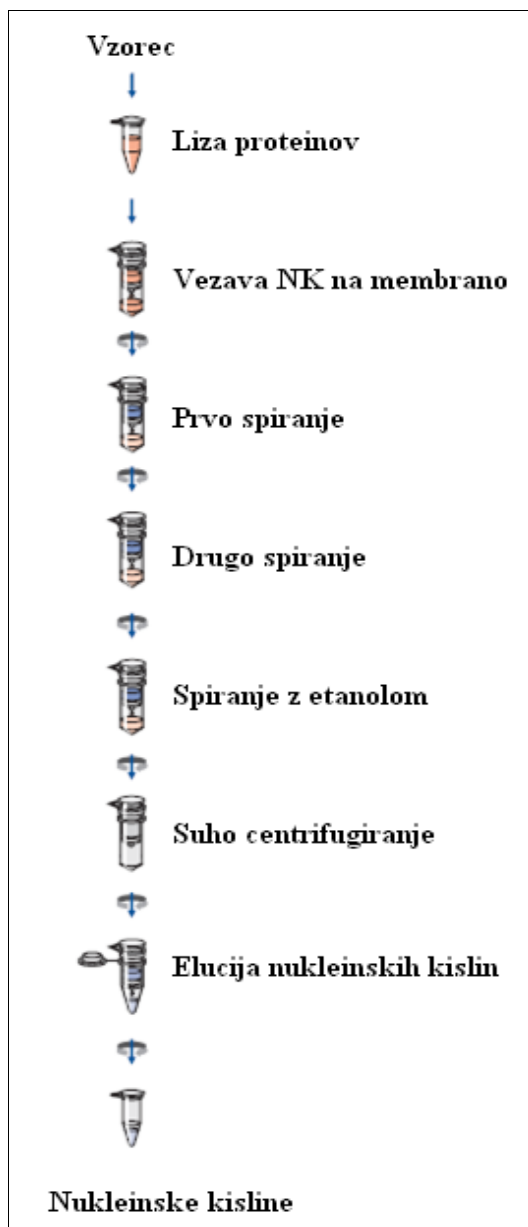
Postopek:

Za izolacijo zunajcelične RNA smo uporabili reagenčni komplet QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit, sam protokol proizvajalca (47) pa so na *Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo* predhodno optimizirali in uvedli modifikacije postopka izolacije. 5-minutna proteoliza se je izkazala za ustrežnejšo kot 15-minutna proteoliza, ki jo navaja proizvajalec. Prav tako so uvedli dvostopenjsko elucijo NK iz membrane, ko s primarnim eluatom izvedemo še sekundarno elucijo in s tem dosežemo, da se spere še preostanek NK, ki je po prvem spiranju morebiti ostal na membrani.

RNA smo izolirali v komori, očiščeni z RNase Zap-detergentom in izpostavljeni UV-svetlobi za 35 minut. Pred pričetkom dela smo uravnali temperaturo vzorcev na sobno temperaturo, preverili, da so bili puferi AW1, AW2, QIAGEN proteaze ter nosilec RNA pripravljene po navodilih proizvajalca in uravnali temperaturo termostata. V nadaljevanju je naveden opis celotnega postopka in slikovni prikaz (slika 7).

1. LIZA PROTEINOV: 25 µL QIAGEN proteaze odpipetiramo v 1,5 mL-epruveto in v epruveto dodamo 200 µL plazme. Dodamo še 200 µL pufera AL, ki vsebuje 28 µg/mL nosilca RNA. Zapremo pokrovček in zmešamo na vibracijskem mešalniku. Sledi 5-minutna inkubacija pri 56 °C v termostatu. Po inkubaciji vsebino epruvete na kratko centrifugiramo, da bi odstranili kapljice z notranje strani pokrovčka. Vzorcju dodamo 250 µL etanola (96–100 %). Pokrovček zapremo in 15 sekund mešamo na vibracijskem mešalu. Lizat inkubiramo z etanolom 5 minut pri sobni temperaturi (15–25 °C). Po inkubaciji epruveto z vsebino na kratko centrifugiramo, da bi odstranili kapljice z notranje strani pokrovčka.
2. VEZAVA NK NA MEMBRANO: Iz epruvete nato previdno prenesemo lizat v QIAamp MinElute kolono, ki je vstavljena v 2 mL-epruveto. Zapremo pokrovček kolone in centrifugiramo 1 minuto pri hitrosti 6000 x g. Po centrifugiranju QIAamp

- MinElute kolono prenesemo v novo 2 mL-epruveto, epruveto s filtratom pa zavržemo.
3. PRVO SPIRANJE: QIAamp MinElute kolono previdno odpremo in dodamo 500 μL AW1. Pri tem pazimo, da ne omočimo roba kolone. Zapremo pokrovček kolone in centrifugiramo 1 minuto pri hitrosti 6000 x g. Po centrifugiranju QIAamp MinElute kolono prenesemo v novo 2 mL-epruveto, epruveto s filtratom pa zavržemo.
 4. DRUGO SPIRANJE: QIAamp MinElute kolono previdno odpremo in dodamo 500 μL AW2. Pri tem pazimo, da ne omočimo roba kolone. Zapremo pokrovček kolone in centrifugiramo 1 minuto pri hitrosti 6000 x g. Po centrifugiranju QIAamp MinElute kolono prenesemo v novo 2 mL-epruveto, epruveto s filtratom pa zavržemo.
 5. SPIRANJE Z ETANOLOM: QIAamp MinElute kolono previdno odpremo in dodamo 500 μL etanola (96–100 %). Pri tem pazimo, da ne omočimo roba kolone. Zapremo pokrovček kolone in centrifugiramo 1 minuto pri hitrosti 6000 x g. Epruveto s filtratom zavržemo.
 6. SUHO CENTRIFUGIRANJE: QIAamp MinElute kolono vstavimo v čisto 2 mL-epruveto in centrifugiramo 5 minut pri 16000 x g, da se membrana posuši. Priporočeno je, da QIAamp MinElute kolono vstavimo v 2 mL-epruveto, odpremo pokrovček in inkubiramo na 56 °C 3 minute, da se membrana popolnoma posuši.
 7. ELUCIJA NK: QIAamp MinElute kolono vstavimo v čisto 1,5 mL-epruveto, epruveto s filtratom pa zavržemo. Kolono previdno odpremo in na sredino membrane naneseemo 55 μL vode brez RNaz. Zapremo pokrovček, inkubiramo na sobni temperaturi 5 minut in nato centrifugiramo 2 minuti na 16000 x g. Dobljeni eluat naneseemo na sredino iste membrane in ponovno inkubiramo na sobni temperaturi 5 minut, centrifugiramo še 2 minuti pri 16000 x g. Pomembno je, da z vodo brez RNaz omočimo celotno membrano. S tem zagotovimo najvišjo učinkovitost elucije.



Slika 7: Postopek izolacije NK iz plazme s kompletom QUIamp MinElute Virus Spin Kit

(47)

3.3.2 Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija (obratno prepisovanje) je postopek, v katerem enoverižno RNA prepisemo v komplementarno DNA (cDNA) s pomočjo encima reverzna transkriptaza, oligonukleotidnih začetnikov, deoksinukleotid trifosfatov (dNTP) in RNaznega inhibitorja. Reverzna transkriptaza med prepisovanjem razgradi molekulo RNA, zato je količina cDNA po reakciji enaka matrični RNA. Dobljeno cDNA nato uporabimo v verižni reakciji s polimerazo (PCR).

Reagenti:

- reagenčni komplet za prepis mRNA v cDNA SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Sestava reagenčnega kompleta je prikazana v preglednici I.

Preglednica I: Sestava reagenčnega kompleta za sintezo cDNA

Reagenti	Sestava
10X SuperScript encimska mešanica	Vsebuje encim reverzno transkriptazo, ribonukleazni inhibitor in lastni pomožni protein.
5X VILO reakcijska mešanica	Vsebuje naključne oligonukleotidne začetnike, MgCl ₂ in zmes dNTP-jev v pufru, ki je optimiziran za RT-PCR.

Postopek:

Najprej smo eluat segrevali 5 minut pri 65 °C in nato ohlajali 5 minut na ledu. Reakcijo smo izvedli po navodilu proizvajalca, vendar smo za večjo učinkovitost prepisa v cDNA pri 42 °C inkubirali 120 namesto 60 minut. Za vsako reakcijo smo v epruveti na ledu zmešali encimsko mešanico, reakcijsko mešanico in eluat. Vsebinsko epruvete smo rahlo premešali in inkubirali na 25 °C 10 minut. Nato smo epruveto inkubirali 120 minut na 42 °C in reakcijo ustavili s 5-minutnim segrevanjem na 85 °C. Sestava reakcijske zmesi in pogoji reakcije so v preglednici II in III.

Preglednica II: Sestava reakcijske zmesi za reverzno transkripcijo

Sestavina	Volumen
10X SuperScript encimska mešanica	6 µl
5X VILO reakcijska mešanica	12 µl
Eluat	42 µl

Preglednica III: Pogoji reakcije reverzne transkripcije

Faza	Temperatura	Čas
Prileganje oligonukleotidnih začetnikov	25 °C	10 min
Sinteza cDNA	42 °C	120 min
Prekinitiev reakcije (inaktivacija reverzne transkriptaze)	85 °C	5 min

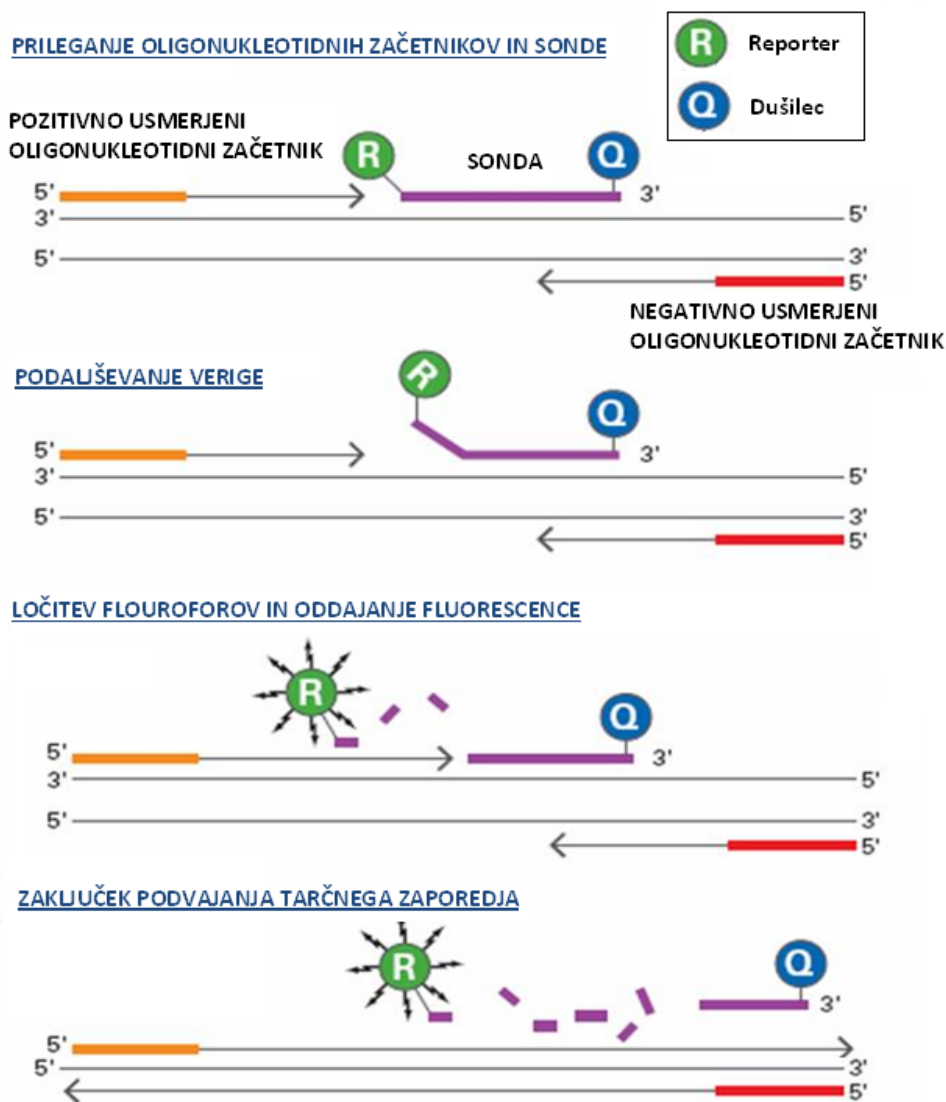
Sintetizirano cDNA smo nato do analize hranili v zamrzovalniku na -80 °C.

3.3.3 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času

Princip metode:

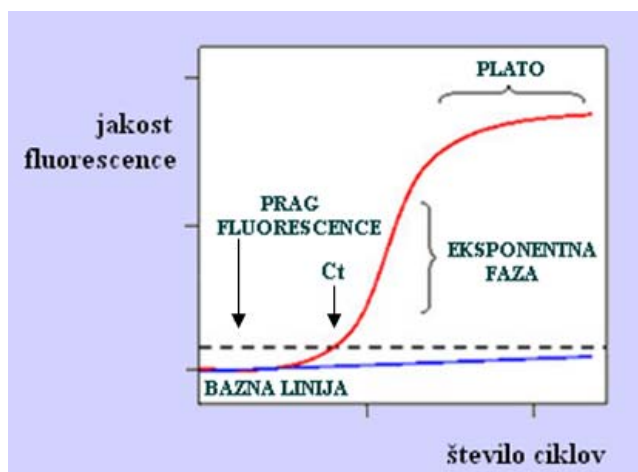
PCR v realnem času je kvantitativna PCR metoda, ki omogoča merjenje količine produkta v vsakem ciklu med samo reakcijo. Reakcijsko zmes za PCR sestavljajo vzorec DNA, ki služi kot matrica, dva oligonukleotidna začetnika, s katerima omejimo odsek, ki ga želimo pomnožiti, mešanica dNTP-jev, Mg^{2+} ioni, reakcijski pufer in termostabilna DNA-polimeraza (najpogosteje je uporabljena *Taq* DNA-polimeraza). Reakcija poteka ciklično, vsak cikel pa je sestavljen iz treh stopenj: denaturacije, prileganja nukleotidnih začetnikov in izgrajevanja komplementarne verige. Teoretično se torej z vsakim ciklom število kopij želenega odseka DNA podvoji. Zaznava produktov temelji na merjenju fluorescence izbranega barvila, ki je udeleženo v reakciji. Načinov za detekcijo produktov s PCR v realnem času je več. Pri nespecifičnem načinu detekcije se uporabljajo fluorescentna barvila (etidijev bromid, SYBR Green I), ki se nespecifično vgradijo v dvoverižno DNA. Z njimi detektiramo vsako dvoverižno DNA, ki je prisotna v zmesi. Pri specifičnem načinu detekcije uporabljamo s fluorofori označene oligonukleotidne začetnike – sonde, ki se specifično vežejo na nukleotidno zaporedje, ki ga pomnožujemo. Za meritev signala izkoriščamo princip fluorescenčnega resonančnega prenosa energije iz donorske na akceptorsko molekulo. Kadar sta dva fluorofora, katerih eksitacijski in emisijski spekter se prekrivata dovolj blizu, ekscitacija donorskega barvila povzroči emisijo svetlobe, ki ekscitira akceptorsko barvilo, to pa posledično emitira svetlobo drugačne valovne dolžine. Kot akceptorje lahko uporabimo tudi molekule, ki absorbirajo svetlobo donorske molekule, same pa ne fluorescirajo (48).

V raziskovalnem delu diplomske naloge smo uporabili specifične hidrolizirajoče sonde, pri katerih izkoriščamo 5'-eksonukleazno aktivnost nekaterih DNA-polimeraz (slika 8). V reakcijsko zmes dodamo sondo, ki specifično prepozna in se v stopnji prileganja veže na tarčno zaporedje na DNA. Sonda ima na obeh koncih vezana različna fluorofora. Pri intaktni sondi fluorescenco, ki jo emitira reportersko barvilo, vezano na 5' koncu, prestreže drugo barvilo, imenovano dušilec, ki je vezano na 3' koncu. Tekom PCR povzroči 5'-eksonukleazna aktivnost *Taq* DNA-polimeraze hidrolizo na tarčno zaporedje vezane sonde v stopnji podaljševanja. Razdalja med reporterskim barvilom in dušilec se poveča in tako je onemogočeno prestrežanje fluorescence. Fluorescenca zato poraste in je sorazmerna s količino produkta PCR (48).



Slika 8: RT-PCR s hidrolizirajočo sondo Taqman (49)

Kontinuirano spremljanje poteka reakcije v vsakem ciklu nam omogoči, da izmerimo količino produkta PCR, ko je reakcija še v eksponentni fazi. Na osnovi izmerjenih jakosti fluorescence narišemo krivuljo, ki podaja odvisnost jakosti fluorescence posameznih vzorcev od števila ciklov (slika 9). Na eksponentnem delu krivulje določimo linijo fluorescenčnega praga, ki predstavlja tisto intenziteto, ki je značilno večja od fluorescence ozadja. Nato za vsak vzorec določimo cikel, ko preseže ta prag (Ct). Pri večjem začetnem številu kopij matrice signal prej preseže prag in tako določimo nižji Ct. Vrednosti Ct so obratnosorazmerne z začetnim številom kopij matrice. S primerjavo vrednosti Ct vzorcev z vrednostmi Ct standardov z znanim številom kopij matrice lahko določimo absolutno število kopij matrice v vzorcu. Pri merjenju izražanja genov nam pogosto zadostuje podatek o razliki med vzorci, zato rezultate podajamo relativno kot razmerje med mRNA proučevanega gena in mRNA referenčnega gena.



Slika 9: Krivulja pomnoževanja pri PCR v realnem času (50)

Izražanje referenčnega oz. hišnega gena mora biti konstantno ne glede na eksperimentalne pogoje (količina vzorca, učinkovitost izolacije), prisotnost bolezni, stanje bolezni, terapijo z zdravili in prisotnost faktorjev tveganja (diabetes, kajenje, spol). Najprimernejši hišni gen je določila raziskovalna skupina na *Katedri za klinično kemijo na Fakulteti za farmacijo*. Z reagenčnim kompletom TaqMan Human Endogenous Control Plate (Applied Biosystems) so po navodilu proizvajalca preizkusili enajst hišnih genov. Kot najustreznejši hišni gen se je izkazal gen, ki kodira ciklofilin A (PPIA).

Reagenti:

- univerzalna zmes reagentov (FastStart Universal Probe Master (Rox) – Roche Applied Science)
- zmes oligonukleotidnih začetnikov in hidrolizirajoče sonde TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems):
 - za tarčni gen *CCL2* (oznaka: Hs00234140_m1)
 - za referenčni (hišni) gen *PPIA* (oznaka: Hs99999904_m1)
- ultra čista voda

Postopek:

Vzporedno smo določali Ct izbranega gena in referenčnega (hišnega) gena. V vsaki seriji meritev smo poleg vzorcev nanesti tudi negativno kontrolo, za katero smo uporabili ultra čisto vodo, s čimer smo preverjali morebitno kontaminacijo reagentov s tarčno nukleinsko kislino. Meritve smo izvedli v trojniku.

Kot matrico smo uporabljali cDNA vzorcev, ki smo jih redčili z ultra čisto vodo do količine, ki omogoča zanesljivo zaznavo produkta PCR (preglednica IV).

Preglednica IV: Razredčitev raztopine cDNA v postopku reakcije PCR

	cDNA* (μL)	Voda (μL)
<i>PPIA</i>	1,5	10,25
<i>CCL2</i>	3,75	8

*Raztopina cDNA, pridobljena s prepisom mRNA v cDNA z reagentom SuperScript® VILO™

Pred začetkom dela smo komoro očistili s 3 % hipokloritom ter nato izpostavili UV-svetlobi za 30 minut. Nato smo v mikrocentrifugirki pripravili izhodiščno zmes iz univerzalne zmesi reagentov, oligonukleotidnih začetnikov, sonde in ultra čiste vode. Mešanico smo premešali in nanesti v vdolbinice na mikrotitrski ploščici. V vdolbinice smo dodali še ustrezno količino raztopine cDNA ali ultra čiste vode. Sestavo reakcijske mešanice prikazuje preglednica V. Ploščico smo prekrili z lepljivo folijo, njeno vsebino

pretresli na vibracijskem mešalu in 2 minuti centrifugirali pri 1900 x g. Za tem smo ploščico vstavili v ciklični termostat ABI Prism™ SDS 7000.

Preglednica V: Sestava reakcijske zmesi za PCR v realnem času

Sestavina	Volumen
univerzalna zmes reagentov	12,5 µL
zmes oligonukleotidnih začetnikov in hidrolizirajoče sonde	0,75 µL
razredčena cDNA	11,75 µL
Skupno:	25 µL

Reakcija pomnoževanja je potekala v naslednjih korakih:

1. Inkubacija pri 50 °C 2 minuti, da poteče aktivacija encima uracil-N-glikozidaze (UNG).
2. Inkubacija pri 95 °C 10 minut, da poteče aktivacija *Taq* DNA-polimeraze.
3. 40 ciklov iz dveh stopenj: denaturacija 15 sekund pri 95 °C ter prileganje oligonukleotidnih začetnikov in podaljševanje verige 1 min pri 60 °C.

Podatke, dobljene s PCR, smo analizirali s programom 7000 System SDS Software. Program je podal vrednost Ct glede na izmerjeni fluorescenčni signal in nastavljeno bazno linijo ter prag. Ct smo določali v trojnikih. Vrednosti smo prenesli v Microsoft Excel in izračunali povprečno vrednost Ct. Dobljene vrednosti Ct tarčnega gena *CCL2* smo normalizirali glede na Ct hišnega gena *PPIA* za posamezni vzorec. Izračunali smo razliko med Ct tarčnega in Ct hišnega gena v istem vzorcu (ΔCt). Nato smo poiskali vzorec z najmanjšim izražanjem tarčnega gena glede na referenčni oz. vzorec z najvišjo vrednostjo ΔCt (ΔCt_{max}). Plazemski nivo je razmerje števila molekul NK *CCL2* glede na število molekul mRNA hišnega gena v istem vzorcu in uravnan na vzorec z najmanjšim izražanjem tarčnega gena. Izračunamo ga po enačbi: $2^{-(\Delta Ct - \Delta Ct_{max})}$.

Vpliv DNA na rezultate meritev

Za kvantifikacijo RNA smo izbrali par začetnih oligonukleotidov in sonde, ki prekrivajo nukleotidno zaporedje dveh sosednjih eksonov po izrezovanju intronske regije. Tako lahko pomnožimo le nukleotidno zaporedje specifično za mRNA in ne za DNA. Prav tako

proizvajalec zagotavlja, da so oligonukleotidni začetniki in sonde specifični za mRNA in naj bi bila zato genomska DNA nemoteča. Kasneje se je izkazalo, da temu ni tako. Raziskovalna skupina *Katedre za klinično biokemijo* je namreč ugotovila, da DNA interferira pri merjenju plazemskega nivoja mRNA *CCL2*. To so ugotovili tako, da so: 1) analizirali velikost pomnoženega produkta PCR z agarozno gelsko elektroforezo; 2) izvedli PCR z vzorci, ne da bi predhodno opravili prepis mRNA v cDNA; 3) izvedli PCR s čisto humano DNA. Po poročanju o nespecifičnosti reagentov proizvajalcu je slednji priskrbel nove reagente, za katere se je izkazalo, da so specifični. Ker smo vse raztopine s cDNA porabili, meritev plazemskega nivoja mRNA *CCL2* nismo mogli ponoviti. Prav tako nismo mogli analizirati, v kakšnem deležu prispeva DNA k nastanku meritvenega signala poleg cDNA v postopkih merjenja mRNA s prejšnjimi, nespecifičnimi reagenti. V predhodnih poskusih smo namreč vse nespecifične reagente porabili.

3.3.4 Statistična analiza

Statistično analizo smo izvedli s pomočjo računalniškega programa SPSS v.17.0. Za ugotavljanje normalnosti porazdelitve spremenljivk smo uporabili Kolmogorov-Smirnov test. Za primerjavo parametrov med skupinama smo uporabili neparametrični Mann-Whitneyjev U-test. Odnosi med spremenljivkami so bili določeni s testom korelacije po Spearmanu. V vseh analizah smo vrednost $p \leq 0,5$ opredelili kot statistično značilno.

4 REZULTATI

4.1 Analiza podatkov o vzorcih

Analizirali smo vzorce plazme 62 preiskovancev, od tega 33 zdravih in 29 bolnikov s SA. Preiskovance smo znotraj skupin razdelili glede na spol, prisotne bolezni oz. stanje in zdravila, ki jih prejemajo. Klinične značilnosti preiskovancev so prikazane v preglednici VI.

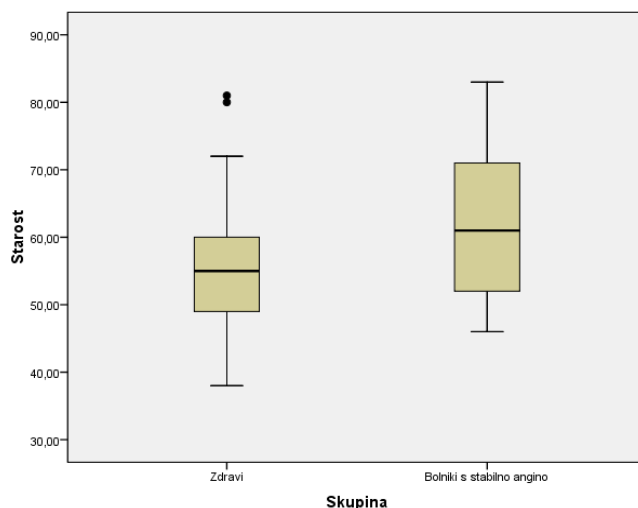
Preglednica VI: Klinične značilnosti preiskovancev

Parameter	Zdravi	Bolniki s stabilno Angino
N	33	29
Spol (M/Ž)	21/12	16/13
Starost	55 {48,5/60} (38–81)	61 {51/71} (46–83)
Družinska anamneza (ne/da)	33/0	22/7
Kajenje (ne/bivši kadilec ali trenutno kadi)	33/0	21/8
Sladkorna bolezen (ne/da)	33/0	17/12
Terapija s statini (ne/da)	33/0	4/25
Terapija z aspirinom (ne/da)	33/0	4/25
Terapija z ACE inhibitorji (ne/da)	33/0	12/17
Koronarna arteriografija	33/0	3/15/4/7
(ne/enojna/dvojna/trojna žilna bolezen)		

Vrednosti: mediana {25. percentil/75. percentil} (najnižja vrednost–najvišja vrednost)

Legenda: N število preiskovancev

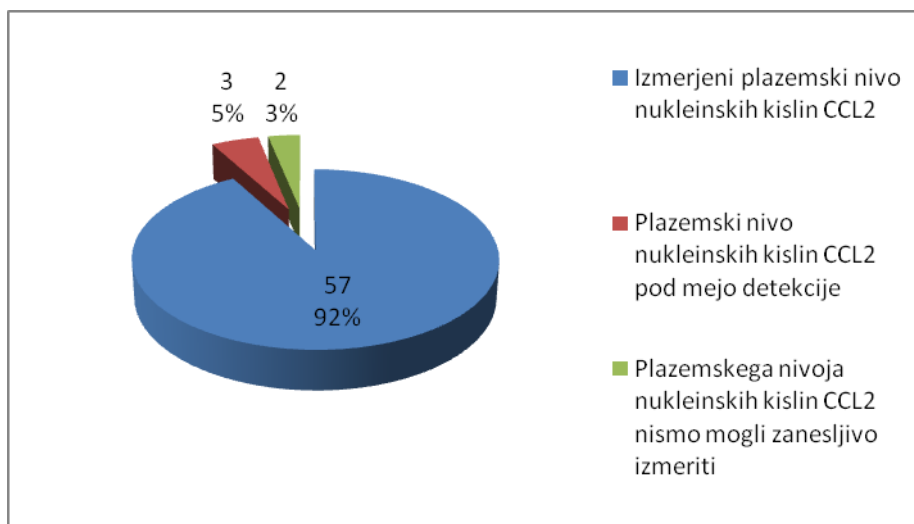
Iz preglednice je razvidno, da so bili zdravi preiskovanci mlajši od bolnikov s stabilno angino (mediana 55 vs. 61; $p=0,029$). Znotraj skupin starost ni korelirala z nobenim od opazovanim kliničnim, anamnestičnim in laboratorijskim parametrom (podatki niso prikazani).



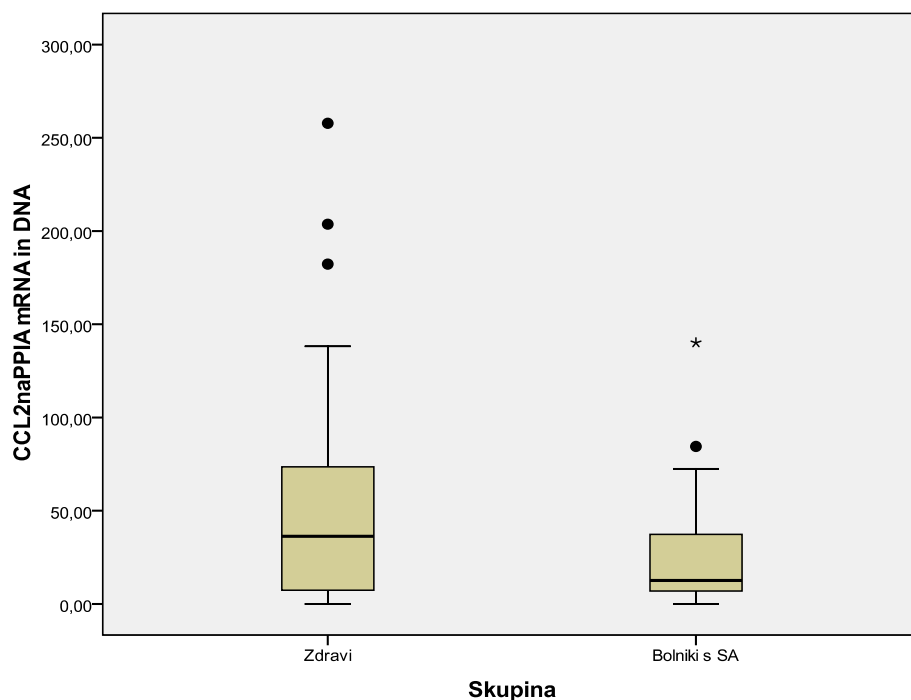
Slika 10: Porazdelitev starosti preiskovancev glede na bolezensko stanje

4.2 Analiza rezultatov, dobljenih z metodo PCR v realnem času

62 vzorcem plazme smo merili nivo plazemskih nukleinskih kislin (mRNA in DNA) *CCL2* z metodo RT-PCR v realnem času. Ct smo zanesljivo izmerili pri 57 vzorcih (92 %). V dveh vzorcih se Ct (3 %) ni dalo zanesljivo določiti, kajti standardna deviacija meritev v trojniku je bila previsoka. V treh vzorcih (5 %) v vseh meritvah v trojniku nismo zaznali signala. Količina NK (mRNA in DNA) *CCL2* je bila pod mejo detekcije (slika 11).



Slika 11: Delež izmerjenih in neizmerjenih Ct



Slika 12: Plazemski nivo nukleinskih kislin *CCL2* bolnikov s stabilno angino (SA) in zdravih preiskovancev

Plazemski nivoji NK *CCL2* so bili standardizirani na referenčni gen *PPIA*. Slika prikazuje najmanjše in največje vrednosti plazemskega nivoja NK *CCL2*, kvartile in mediano. Prikazani so tudi osamelci (•), ki so zunaj intervala $Q_3+1,5Q$ in ekstremni osamelci (*), ki so zunaj intervala Q_3+3Q . Razlaga kratic: Q_3 – tretji kvartil, Q – kvartilni razmik

Preglednica VII: Vrednosti mediane plazemskega nivoja NK *CCL2*, 25. in 75. percentil

	Skupina	Mediana	25./75. Percentil
Plazemski nivo NK <i>CCL2</i>	zdravi	36,25	5,90/74,54
	bolniki s SA	12,55	6,78/37,27

Legenda: SA – stabilna angina

Z uporabo statističnih metod smo želeli preučiti, ali se plazemski nivo NK *CCL2* statistično razlikuje med zdravimi preiskovanci in bolniki s SA. Najprej smo naredili Kolmogorov-Smirnov test za normalnost distribucije. Pri tem smo ugotovili, da se plazemski nivoji NK *CCL2* znotraj skupin ne porazdeljujejo normalno ($p < 0,05$, preglednica VIII).

Preglednica VIII: Test normalnosti distribucije plazemskega nivoja NK *CCL2*

	Skupina	Kolmogorov-Smirnov test
Plazemski nivo nukleinskih kislin <i>CCL2</i>	zdravi	p = 0,005
	bolniki s stabilno angino	p = 0,000

V nadaljevanju smo izvedli neparametrični Mann-Whitneyjev U-test. Plazemski nivoji NK *CCL2* so bili 2,9-krat višji pri zdravih kot pri bolnikih s SA, vendar test ni pokazal statistično značilne razlike med skupinama (36,25 vs. 12,55; p=0,099).

Kar 25 od 29 bolnikov s SA je prejelo statine, zato smo v nadaljevanju primerjali le podskupino bolnikov s SA, ki so bili na terapiji s statini, in zdrave. Mann-Whitneyjev U-test je pokazal, da obstaja signifikantna razlika med skupinama (36,25 vs. 12,21; p=0,049).

Vnetje ima ključno vlogo v nastanku aterosklerotične lehe, zato smo želeli preveriti, ali obstaja povezava med CRP in plazemskim nivojem NK *CCL2*. Glede na mediano koncentracije CRP pri zdravih, ki je znašala 1,4mg/L, smo zdrave preiskovance razdelili v dve skupini: 1) skupino zdravih s koncentracijo CRP, višjo od mediane; 2) skupino zdravih s koncentracijo CRP, nižjo od mediane. Pri primerjavi skupine bolnikov, zdravljenih s statini, in zdravimi, ki imajo višje plazemske koncentracije CRP, smo ugotovili, da imajo slednji skoraj 5-krat višje plazemske nivoje NK *CCL2* (12,21 vs. 56,89; p=0,022). Med skupinama zdravljeni s statini in zdravimi, ki imajo nižje plazemske koncentracije od mediane, ni bilo razlik (12,21 vs. 25,99; p= 0,184). Povzetek statistične analize podaja tudi preglednica IX.

Preglednica IX: Predstavitev rezultatov neparametričnega Mann-Whitneyjevega U-testa

	Mediana	P
Bolniki s SA, zdravljeni s statini vs. zdravi (CRP<1,4 mg/L)	12,21 vs. 25,99	0,184
Bolniki s SA, zdravljeni s statini vs. vsi zdravi	12,21 vs. 36,25	0,049
Bolniki s SA, zdravljeni s statini vs. zdravi (CRP>1,4 mg/L)	12,21 vs. 56,89	0,022

Z uporabo korelacijskega testa nismo našli korelacije med plazemski nivojem NK *CCL2* pri bolnikih in številom obolelih koronarnih arterij ter plazemskimi lipidi. Pri zdravih nivo NK *CCL2* v plazmi prav tako ni koreliral s plazemskimi lipidi, niti z ostalimi opazovanimi parametri.

5 RAZPRAVA

5.1 Prva delovna hipoteza

Na področju aterogeneze so številne raziskave usmerjene v iskanje genov, ki se povečano izražajo v posameznih vrstah celic aterosklerotične lehe, pri posameznih patofizioloških procesih v aterogenezi ali pri posameznih patomorfoloških oblikah bolezni. Kljub temu pa še ničesar ne vemo o morebitnem obstoju zunajcelične mRNA v plazmi bolnikov s CAD, in sicer genov, ki z zvečanim izražanjem spremljajo ali aktivno sodelujejo v razvoju ateroskleroze. Glede na to, da je nivo mRNA *CCL2* v aterosklerotični lehi povečan v primerjavi z zdravo žilno steno, smo v prvi delovni hipotezi predpostavili, da mRNA *CCL2* iz celic aterosklerotične žilne stene prehaja z različnimi mehanizmi v zunajcelični prostor ter nato v kri. Želeli smo pokazati, da v plazmi bolnikov s SA obstaja mRNA *CCL2* in jo je mogoče tudi izmeriti.

V raziskavi je bilo ugotovljeno, da reagenčni komplet za kvantifikacijo cDNA *CCL2* ni specifičen, kot zagotavlja proizvajalec. Izkazalo se je, da humana DNA interferira pri merjenju plazemskega nivoja mRNA *CCL2*. Proizvajalec nam je priskrbel nove, specifične reagente, vendar nismo imeli več prepisane cDNA, da bi ponovili meritve plazemskega nivoja mRNA *CCL2*. Obsega interference DNA žal nismo mogli določiti, ker starih reagentov nismo imeli več na voljo.

Z našimi meritvami smo pokazali, da so NK (mRNA in DNA) *CCL2* prisotne v plazmi bolnikov v SA pa tudi v plazmi zdravih. Plazemski nivo NK smo zanesljivo izmerili v 52 vzorcih (92 %). V 3 vzorcih (5 %) fluorescenčnega signala nismo mogli izmeriti v vseh alikvotih. Menimo, da je bila vsebnost NK *CCL2* pod mejo detekcije, da bi jo lahko zanesljivo zaznali s PCR v realnem času, ali pa je prišlo do razgradnje NK v tolikšni meri, da jih ni bilo mogoče izmeriti. V 2 vzorcih (3 %) je bila variabilnost Ct prevelika za zanesljiv izračun povprečne vrednosti.

Povzamemo lahko, da v plazmi bolnikov s SA pa tudi v plazmi zdravih obstaja mRNA *CCL2* in je njen nivo mogoče kvantificirati z uporabo najnovejših specifičnih reagenčnih kompletov. V nadaljnjih raziskavah pa je nujno preveriti in dokazati, da DNA v postopku ne interferira.

5.2 Druga delovna hipoteza

Vnetje igra ključno vlogo v patogenezi in napredovanju aterosklerotične bolezni. V začetnih fazah aterogeneze monociti vstopajo v žilno steno pod vplivom kemotaktičnega faktorja CCL2, ki nastaja v celicah žilne stene. CCL2 pomembno vpliva na napredovanje in destabilizacijo aterosklerotičnega plaka pa tudi na celjenje srčne mišice po miokardnem infarktu (28). Povečano izražanje CCL2 v žilni steni pri hiperholesterolemičnih zajcih dobro korelira z nastankom aterosklerotične lehe (51). CCL2 je visoko izražen v humanem ateromu kot tudi v napredovalih aterosklerotičnih lehah živali (52–54). Posledično so bile pri bolnikih s koronarno ali periferno arterijsko boleznijo povišane serumske koncentracije CCL2 (34).

V naši drugi delovni hipotezi smo želeli pokazati, da imajo bolniki s SA višje plazemske vrednosti mRNA CCL2 kot kontrolna skupina. Rezultati so bili nasprotni pričakovanju. Preiskovanci brez koronarne ateroskleroze so imeli skoraj 2,9-krat višje plazemske nivoje NK CCL2, vendar neparametrični Mann-Whitneyjev U-test ni pokazal statističnih razlik med skupinama (36,25 vs. 12,55; $p=0,099$). Od 29 bolnikov s SA jih je kar 25 prejelo statine, zato smo v nadaljevanju primerjali le slednje s kontrolno skupino in dobili statistično razliko med skupinama (12,21 vs. 36,25; $p=0,049$).

CRP je reaktant akutne faze in nespecifičen, vendar izjemno občutljiv pokazatelj vnetnega dogajanja v telesu. Za ateroskleroza, ki je vnetna bolezen, pa je značilna nizka stopnja vnetja. Že najmanjše zvišanje koncentracije tega proteina v serumu lahko pomenijo tveganje za koronarne dogodke. Tako pri odraslih serumska koncentracija, manjša od 1 mg/L, pomeni nizko tveganje, koncentracija med 1 in 3 mg/L pomeni srednjo stopnjo tveganja, nad 3 mg/L pa predstavlja veliko tveganje za kardiovaskularne dogodke (55). Nevarnost ateroskleroze je dolga klinična neopaznost, zato je možno, da smo v skupino zdravih vključili tudi preiskovance, pri katerih je subklinična ateroskleroza še povsem asimptomatska. Zdrave preiskovance smo razdelili v dve podskupini glede na mediano vseh plazemskih vrednosti CRP pri zdravih (1,4 mg/L). Nizka koncentracija CRP v serumu nam je v tem primeru služila za izključitev vsakega, tudi asimptomatskega aterosklerotičnega procesa. Nasprotno pa zvišana koncentracija CRP v serumu pri zdravih preiskovancih (brez kliničnih znakov koronarne ateroskleroze in nizkim tveganjem za akutne koronarne dogodke v naslednjih 10 letih) vendarle opozarja, da morebiti v njihovih

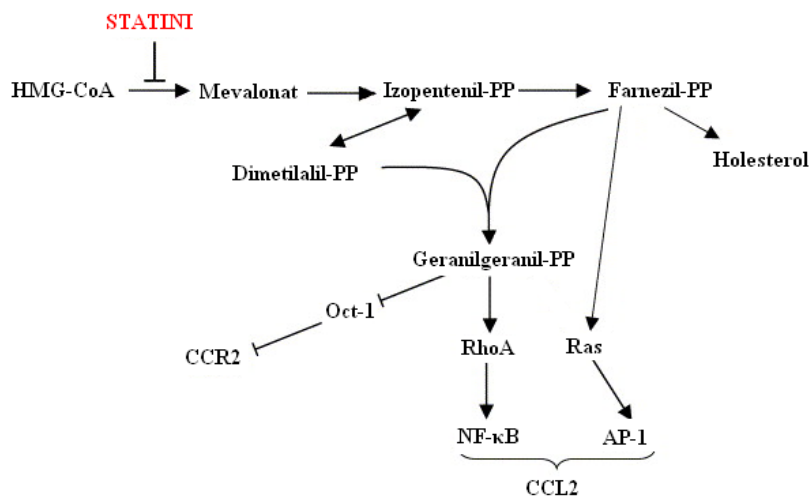
arterijah poteka asimptomatski aterosklerotični proces s subkliničnim vnetjem. Pri tem je potrebno omeniti nespecifičnost CRP kot kazalca vnetja. V bran našemu razmišljanju pa velja tudi omeniti, da smo iz študije izključili vse preiskovance s prehladnimi obolenji, revmatizmi in drugimi vnetnimi boleznimi ter poškodbami. Pri primerjavi skupine bolnikov s SA, ki prejemajo statine, s podskupino zdravih, ki imajo CRP višji od mediane, je bila razlika med skupinama še izrazitejša (mediana 12,21 vs. 56,89; $p = 0,022$).

Nižje plazemske nivoje NK *CCL2* bolnikov v primerjavi z zdravimi bi lahko pripisali delovanju statinov. Mnoge raziskave poročajo, da statini znižujejo serumske koncentracije *CCL2*. Bolniki, zdravljeni s statini, so imeli nižje plazemske koncentracije kot bolniki brez zdravljenja s statini (44,56). V zajčjem modelu ateroskleroze so statini zmanjšali vnetje v neointimi ter neointimalno in medialno prisotnost *CCL2* (57). Nadalje so pokazali, da statini znižujejo izražanje gena za *CCL2 in vitro* v monocitih, endotelijskih celicah in gladkih mišičnih celicah (44, 58). Navsezadnje, statini so znižali nivo mRNA *CCL2 in vivo* v monocitih periferne krvi (44).

Sinteza kemokinov je v prvi vrsti regulirana na nivoju transkripcije genov. Aktivacija celic z zunajceličnimi dejavniki sproži znotrajcelične signalne poti, ki vodijo v aktivacijo transkripcijskih faktorjev in povečano izražanje genov, ki kodirajo kemokine in kemokinske receptorje. Mnogo genov, ki kodirajo kemokine, vključno s *CCL2*, ima na promotorski regiji vezavno mesto za transkripcijski faktor NF- κ B. Objavljene študije navajajo, da statini zavirajo izražanje *CCL2* preko inhibicije transkripcijskega faktorja NF- κ B. Atorvastatin je zmanjšal aktivacijo omenjenega transkripcijskega faktorja in izražanje *CCL2* v kulturi gladkih mišičnih celic in monocitov (58) pa tudi v zajčjem modelu ateroskleroze (59). Prav tako vemo, da je izoprenilacija potrebna za aktivacijo majhnih GTP vezavnih proteinov, kot je RhoA, ki sodeluje pri aktivaciji NF- κ B. Veillard in sod. so pokazali, da statini preko zaviranja geranilgeranilacije RhoA proteina zavirajo aktivacijo NF- κ B in zmanjšajo nastajanje kemotaktičnega citokina *CCL2* (60). Dokazi kažejo na sodelovanje med transkripcijskima faktorjema NF- κ B in AP-1 pri uravnavanju izražanja gena *CCL2* (61). Statini zavirajo tudi aktivacijo AP-1, ki je prav tako posledica zaviranja izoprenilacije (40).

Kemokinski receptor CCR2 ima znotraj proksimalne 5' regije cis-regulatorni element Oct-1 vezočo domeno. Ortego in sod. so poročali, da statini povečajo aktivnost

transkripcijskega zaviralca Oct-1, ki uravnava izražanje *CCR2*, najverjetneje preko zaviranja sinteze geranilgeraniliranih izoprenoidnih intermediatov (60,62). Poti, preko katerih statini regulirajo izražanje *CCL2* in njegovega receptorja, so prikazane na sliki 13.



Slika 13 Poti, preko katerih statini regulirajo izražanje *CCL2* in njegovega receptorja

Iz objavljenih raziskav je razvidno, da je zaviranje aktivnosti HMG-CoA reduktaze spremenilo izražanje *CCL2* in nastajanje *CCL2* tako *in vitro* kot *in vivo*. Statini torej spremenijo izražanje genov, ki vplivajo na dogajanje v žilni steni, kar prispeva k njihovi klinični učinkovitosti. V diplomski nalogi ni bilo mogoče zmanjšati sočasnega vpliva ostalih zdravil, kljub temu pa bi lahko znižanje plazemskega nivoja NK *CCL2* pripisali delovanju statinov na zaviranje izražanja *CCL2* v žilni steni.

Za zaključek lahko povemo, da nismo uspeli potrditi hipoteze, da lahko z neinvazivno metodo merjenja plazemskega nivoja mRNA *CCL2* sklepamo na prisotnost in stopnjo bolezni, vendar pa rezultati naše raziskave kažejo na smiselnost nadaljnega proučevanja uporabnosti analize plazemskega nivoja mRNA *CCL2* s postopki, ki so specifični za mRNA. Morebiti bi pa lahko z enakim postopkom merjenja plazemskega nivoja mRNA *CCL2* spremljali učinkovitost zdravljenja s statini. Smiselno je tudi proučevanje mRNA drugih genov, ki z zvečanim izražanjem v žilni steni spremljajo in sodelujejo v procesu aterogeneze.

6 SKLEPI

V literaturi nismo našli nobene raziskave o obstoju mRNA *CCL2* v plazmi bolnikov z aterosklerozo. V našem postopku merjenju nivoja mRNA *CCL2* v plazmi, kljub proizvajalčevemu zagotovitlu specifičnosti reagenčnega kompleta, interferira tudi DNA, vendar obsega interference žal nismo mogli natančneje opredeliti. Ugotovili smo, da je v plazmi bolnikov v SA, kakor tudi zdravih preiskovancev, mogoče izmeriti nivo NK *CCL2*.

Proti pričakovanju smo v plazmi bolnikov v SA našli nižji plazemski nivo NK *CCL2* v primerjavi z zdravimi. Ker je bila večina bolnikov s SA na statinskem zdravljenju, je najverjetnejša razlaga znižanega nivoja NK *CCL2* v plazmi bolnikov s SA delovanje statinov na zaviranje izražanja *CCL2* v aterosklerotični žilni steni.

7 LITERATURA

1. Černe D. Sodobna uporaba analize zunajceličnih nukleinskih kislin v laboratorijski medicini. *Farm vestn* 2010; 61: 144–148.
2. Wong BCK, Lo YMD. Cell-free DNA and RNA in plasma as new tools for molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2003; 3(6): 785–797.
3. Mršnik P. Proučevanje nivoja mRNA *DAPK1* v plazmi bolnikov s koronarno aterosklerozo, diplomsko delo. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani 2011.
4. Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmüller H, Busch M, Von Pawel J, Schalhorn A, Nagel D, Seidel D. Circulating nucleosomes in serum. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 945: 93–102.
5. Swarup V, Rajeswari M. R. Circulating (cell-free) nucleic acids – A promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *FEBS Lett* 2007; 581(5): 795–799.
6. Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Lefort F, Rossier A, Chen XQ, Anker P. The origin and mechanism of circulating DNA. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 906: 161–168.
7. Tsui NB, Ng EK, Lo YM. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem* 2002; 48(10): 1647–1653.
8. Tong YK, Lo YMD. Diagnostic developments involving cell free (circulating) nucleic acids. *Clin Chim Acta* 2006; 363: 187–196.
9. Antonatos D, Patsilnakos S, Spanodimos S, Korkonikitas P, Tsigas D. Cell-free DNA levels as a prognostic marker in acute myocardial infarction. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1075: 278–281.
10. Lunder M, Kuhar P, Drevenšek G. Aterosklerozna – dejavniki tveganja in zapleti. *Medicinski mesečnik* 2007; 3 (7/8): 235–240.
11. Elektronski vir: <http://www.webmd.com/heart-disease/atherosclerosis-and-coronary-artery-disease>
12. Acevedo M, Tagle R, Simpfendorfer C. Non-traditional risk factor for atherosclerosis. *Rev Med Chil* 2001; 129(10): 1212–1221.
13. Starc R, Bunc M. Patofiziologija akutnih koronarnih sindromov. *Med razgl* 2002; 41: 41–49.

14. Bajrović F, Šuput D. Ateroskleroza, Temelji patološke fiziologije, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2005; 175–184.
15. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420: 868–874.
16. Glass C, Witztum J. Atherosclerosis: The road ahead. *Cell* 2001; 104(4):503–516.
17. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352(16): 1685–1695.
18. Badimón L, Vilahur G, Padró T. Lipoproteínas, plaquetas y aterotrombosis. *Rev Esp Cardiol* 2009; 62(10): 1161–1178
19. Yadav A, Saini V, Arora S. CCL2: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin Chim Acta* 2010; 411(21-22): 1570–1579.
20. Melgarejo E, Medina MA, Sánchez-Jiménez F, Urdiales JL. Monocyte chemoattractant protein-1: A key mediator in inflammatory disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41(5): 998–1001.
21. Han KH, Han KO, Green SR, Quehenberger O. Expression of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 is increased in hypercholesterolemia: Differential effects of plasma lipoproteins on monocyte function. *J Lipid Res* 1999; 40: 1053–1063.
22. Jiang Y, Beller DI, Frenzl G, Graves DT. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol* 1992; 148, 2423–2428.
23. Viedt C, Vogel J, Anthanasiou T, Shen W, Orth SR, Kübler W, Kreuzer J. Monocyte chemoattractant protein-1 induces proliferation and interleukin-6 production in human smooth muscle cells by differential activation of nuclear factor-kappaB and activator protein-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(6): 914–920.
24. Schecter AD, Rollins BJ, Zhang YJ, et al. Tissue factor is induced by monocyte chemoattractant protein-1 in human aortic smooth muscle and THP-1 cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 28568–28573.
25. Niu J, Azfer A, Zhelyabovska O, Fatma S, Kolattukudy PE. Monocyte chemotactic protein (MCP)-1 promotes angiogenesis via a novel transcription factor, CCL2-induced protein (MCPIP). *J Biol Chem* 2008; 283: 14542–14551.
26. Zhou L, Azfer A, Niu J, Graham S, Choudhury M, Adamski FM, Younce C, Binkley PF, Kolattukudy PE. Monocyte chemoattractant protein-1 induces a novel

- transcription factor that causes cardiac myocyte apoptosis and ventricular dysfunction. *Circ Res* 2006; 98(9): 1177–85.
27. Elektronski vir: <http://www.gladstone.ucsf.edu/gladstone/site/gicd/section/1880>
 28. Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. Monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 as a biomarker in acute coronary syndromes. *Curr Atheroscler Rep* 2009; 11(2):131-138.
 29. Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res.*2004; 95(9): 858-66.
 30. Frangogiannis NG. The prognostic value of monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50(22): 2125–2127.
 31. Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb Haemost* 2007; 97: 738–747.
 32. Deo R, Khera A, McGuire DK, Murphy SA, Meo Neto Jde P, Morrow DA, de Lemos JA. Association among plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1, traditional cardiovascular risk factors and subclinical atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44(9): 1812–8.
 33. McDermott DH, Yang Q, Kathiresan S, Cupples LA, Massaro JM, Keaney JF Jr, Larson MG, Vasani RS, Hirschhorn JN, O'Donnell CJ, Murphy PM, Benjamin EJ. *CCL2* polymorphisms are associated with serum monocyte chemoattractant protein-1 levels and myocardial infarction in The Framingham heart study. *Circulation* 2005; 112(8): 1113–1120.
 34. Hoogeveen RC, Morrison A, Boerwinkle E, Miles JS, Rhodes CE, Sharrett AR, Ballantyne CM. Plasma CCL2 level and risk for peripheral arterial disease and incident coronary heart disease: atherosclerosis risk in communities study. *Atherosclerosis* 2005; 183(2): 301–307.
 35. Nishiyama K, Ogawa H, Yasue H, Soejima H, Misumi K, Takazoe K, Yoshimura M, Kugiyama K, Tsuji I, Kumeda K. Simultaneous elevation of the levels of circulating monocyte chemoattractant protein-1 and tissue factor in acute coronary syndromes. *Jpn Circ J* 1998; 62(9): 710–712.
 36. de Lemos J, Morrow D, Sabatine M, Murphy S, Gibson C, Antman E, McCabe C, Cannon C, and Braunwald E. Association between plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003; 107: 690–695.

37. Lunder M, Žiberna L, Drevenšek G, Šabovič M. Zaščitni pleiotropni učinki statinov. *Zdrav Vestn* 2011; 80: 39–49.
38. Wang CY, Liu PY, Liao JK. Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. *Trends Mol Med* 2008; 14(1): 37–44.
39. Nohria A, Prsic A, Liu PY, Okamoto R, Creager MA, Selwyn A, Liao JK, Ganz P. Statins inhibit Rho kinase activity in patients with atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2009; 205(2): 517–521.
40. Dichtl W, Dulak J, Frick M, Alber HF, Schwarzacher SP, Ares MP, Nilsson J, Pachinger O, Weidinger F. HMG-CoA reductase inhibitors regulate inflammatory transcription factors in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(1): 58–63.
41. Corpataux JM, Naik J, Porter KE, London NJ. The effect of six different statins on the proliferation, migration, and invasion of human smooth muscle cells. *J Surg Res* 2005; 129(1): 52–56.
42. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(11):1712–1719.
43. Romano M, Diomedede L, Sironi M, Massimiliano L, Sottocorno M, Polentarutti N, Guglielmotti A, Albani D, Bruno A, Fruscella P, Salmona M, Vecchi A, Pinza M, Mantovani A. Inhibition of monocyte chemotactic protein-1 synthesis by statins. *Lab Invest* 2000; 80(7):1095–1100.
44. Rezaie-Majd A, Maca T, Bucek RA, Valent P, Müller MR, Husslein P, Kashanipour A, Minar E, Baghestanian M. Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin-6, interleukin-8, and monocyte chemoattractant protein-1 in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(7): 1194–1199.
45. Xu ZM, Zhao SP, Li QZ, Nie S, Zhou HN. Atorvastatin reduces plasma MCP-1 in patients with acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta* 2003; 338(1-2): 17–24.
46. Wood D, De Backer G, Faergeman O, Graham I, Mancia G, Pyörälä K. Prevention of coronary heart disease in clinical practice: recommendations of the Second Joint Task Force of European and other Societies on Coronary prevention. *Atherosclerosis* 1998; 140: 199–270.

47. <http://www.qiagen.com/literature/default.aspx?page=2&Term=&Language=EN&LiteratureType=1&ProductCategory=232&r=1281> (Povezava za QIAamp® MinElute® Virus Spin Handbook, 2010)
48. Arko B. Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. *Farm Vestn* 2004; 55: 215–220.
49. http://www.asuragen.com/Services/services/gene_expression/ab_taqman.aspx
50. <http://www.rt-pcr.com>
51. Chen YL, Chang YJ, Jiang MJ. Monocyte chemotactic protein-1 gene and protein expression in atherogenesis of hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis* 1999; 143(1): 115–123.
52. Ylä-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Särkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, Witztum JL, Steinberg D. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(12): 5252–5256.
53. Yu X, Dluz S, Graves DT, Zhang L, Antoniades HN, Hollander W, Prusty S, Valente AJ, Schwartz CJ, Sonenshein GE. Elevated expression of monocyte chemoattractant protein-1 by vascular smooth muscle cells in hypercholesterolemic primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(15):6953–6957.
54. Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest* 1991; 88(4): 1121–1127.
55. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO 3rd, Criqui M, Fadl YY, Fortmann SP, Hong Y, Myers GL, Rifai N, Smith SC Jr, Taubert K, Tracy RP, Vinicor F. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003; 107(3): 499–511.
56. Lewandowski M, Kornacewicz-Jach Z, Millo B, Zielonka J, Czechowska M, Kaliszczak R, Płońska E, Goracy J, Kaźmierczak J, Naruszewicz M. The influence of low dose atorvastatin on inflammatory marker levels in patients with acute coronary syndrome and its potential clinical value. *Cardiol J* 2008; 15, 357–364.
57. Bustos C, Hernández-Presa MA, Ortego M, Tuñón J, Ortega L, Pérez F, Díaz C, Hernández G, Egido J. HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces

- neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 1998; 32(7): 2057–2064.
58. Ortego M, Bustos C, Hernández-Presa MA, Tuñón J, Díaz C, Hernández G, Egido J. Atorvastatin reduces NF- κ B activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells. *Atherosclerosis* 1999; 147(2): 253–261.
59. Hernández-Presa MA, Martín-Ventura JL, Ortego M, Gómez-Hernández A, Tuñón J, Hernández-Vargas P, Blanco-Colio LM, Mas S, Aparicio C, Ortega L, Vivanco F, Gerique JG, Díaz C, Hernández G, Egido J. Atorvastatin reduces the expression of cyclooxygenase-2 in a rabbit model of atherosclerosis and in cultured vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2002; 160(1): 49-58.
60. Veillard NR, Braunersreuther V, Arnaud C, Burger F, Pelli G, Steffens S, Mach F. Simvastatin modulates chemokine and chemokine receptor expression by geranylgeranyl isoprenoid pathway in human endothelial cells and macrophages. *Atherosclerosis.* 2006;188(1):51–58.
61. Martin T, Cardarelli PM, Parry GC, Felts KA, Cobb RR. Cytokine induction of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in human endothelial cells depends on the cooperative action of NF-kappa B and AP-1. *Eur J Immunol* 1997; 27(5): 1091–1097.
62. Ortego M, Hernández AG, Bustos C, Blanco-Colio LM, Hernández-Presa MA, Tuñón J, Egido J. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors increase the binding activity and nuclear level of Oct-1 in mononuclear cells. *Eur J Pharmacol.* 2002 19; 448(2-3): 113–21.