

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BRIGITA PIHLER VESELIČ

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BRIGITA PIHLER VESELIČ

**VPLIV ATORVASTATINA IN VALSARTANA NA FUNKCIONALNE IN
MORFOLOŠKE SPREMEMBE ARTERIJ BUDER, POVZROČENE Z
ATEROGENO DIETO**

**EFFECT OF ATORVASTATIN AND VALSARTAN ON FUNCTIONAL AND
MORPHOLOGICAL ARTERIAL WALL CHANGES OF GUINEA PIGS FED
WITH ATHEROGENIC DIET**

Diplomska naloga

Ljubljana, 2012

Eksperimentalni del diplomske naloge sem opravila v Laboratoriju za eksperimentalno srčno-žilno farmakologijo, na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in somentorstvom viš. zn. sod. dr. Gorazda Drevenška, univ. dipl. biol.

ZAHVALE

Zahvaljujem se mentorju, prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm., za mentorstvo pri nalogi in za vse napotke pri nastajanju tega dela. Hvala tudi somentorju, viš. zn. sod. dr. Gorazdu Drevenšku, univ. dipl. biol., da mi je omogočil delo na področju, ki me veseli in za vse tehtne pripombe. Iskrena hvala Mojci Lunder, dr. med., za uvajanje v laboratorijsko delo, za vsestransko pomoč, praktične nasvete in usmerjanje pri pisanju. Hvala Petri Ponebšek za tehnično pomoč pri delu.

Posebna zahvala tudi Urošu, mami, prijateljem in sošolcem za podporo, potrpežljivost in lepe trenutke skozi študentska leta.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in somentorja viš. zn. sod. dr. Gorazda Drevenška, univ. dipl. biol..

Ljubljana, 2012

Brigita Pihler Veselič

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Odon Planinšek, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Janez Mravljak, mag. farm.

VSEBINA

POVZETEK	IV
ABSTRACT	V
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
1 UVOD.....	1
1.1 Zgradba arterijske stene	1
1.2 Krčenje in sprostitve gladkih mišičnih celic	2
1.3 Vloga endotelija pri uravnavanju žilne homeostaze	5
1.3.1 Dušikov oksid (NO)	6
1.3.2 Adrenergični in muskarinski receptorji v žilni steni	7
1.4 ATEROSKLEROZA	8
1.4.1 Dejavniki tveganja	8
1.4.2 Koncept ateroskleroze	9
1.4.3 Zapleti	12
1.4.4 Možnosti zdravljenja	12
1.5 Atorvastatin	13
1.5.1 Mehanizem delovanja	14
1.5.2 Pleiotropni učinki statinov	15
1.6 Valsartan	15
1.6.1 Mehanizem delovanja	16
1.6.2 Pleiotropni učinki sartanov	17
1.7 Budre ali morski prašički (<i>Cavia porcellus</i>)	17
1.7.1 Vpliv prehrane na metabolizem holesterola in lipoproteinov	18
1.7.2 Vpliv učinkovin na metabolizem holesterola in lipoproteinov	19
1.7.3 Budre kot modeli za preučevanje ateroskleroze in vnetja	20
2 NAMEN DELA	21
3 MATERIALI IN METODE	22
3.1 Uporabljeni reagenti in raztopine	22
3.1.1 Sestavine, uporabljene pri pripravi krme	22
3.1.2 Reagenti, uporabljeni pri izolaciji žil	23
3.1.3 Reagenti, uporabljeni pri merjenju odzivnosti žilnih obročkov	23
3.1.4 Reagenti, uporabljeni pri morfometriji	24

3.2	Aparature, pribor in oprema.....	24
3.3	Poskusne živali	25
3.4	Sestava diete	26
3.5	Krmljenje	27
3.6	Žrtvovanje.....	27
3.7	Poskusi na izoliranih torakalnih aortah buder.....	29
3.7.1	Naprava za poskuse na izoliranih žilah	29
3.7.2	Protokol poskusov	30
3.7.3	Obdelava podatkov	32
3.8	Morfometrija.....	33
4	REZULTATI	35
4.1	Poskusi na izoliranih torakalnih aortah buder.....	35
4.1.1	Meritve sposobnosti sprostitve žilnih obročkov z acetilholinom	35
4.1.2	Meritve sposobnosti skrčitve žilnih obročkov s fenilefrinom	38
4.2	Morfometrija.....	40
5	RAZPRAVA.....	42
5.1	Razprava o materialih in metodah	42
5.1.1	Sestavine, uporabljene za pripravo krme.....	42
5.1.2	Poskusne živali	44
5.2	Razprava o rezultatih	48
5.2.1	Poskusi na izoliranih torakalnih aortah buder	48
5.2.2	Morfometrija.....	52
6	SKLEP.....	55
7	LITERATURA	56

POVZETEK

S staranjem populacije se pojavnost različnih bolezni veča. Glavno skupino predstavljajo bolezni srca in ožilja, med katere prištevamo aterosklerozo in njene zaplete. Pomembno je, da lahko bolezen in mehanizme njenega nastanka pri človeku razložimo s pomočjo podatkov, ki so bili pridobljeni v poskusih na živalih. Budre (*Cavia porcellus*) so se v številnih raziskavah izkazale kot ustrezen živalski model za razumevanje mehanizmov aterogeneze, saj imajo sestavo lipoproteinov in holesterola zelo podobno človeku, hkrati pa se dobro in hitro odzivajo na različno prehrano in dodatke zdravilnih učinkovin. V raziskavi smo preučevali funkcionalne in morfološke spremembe arterij buder, ki nastanejo kot posledica kroničnega krmljenja z aterogeno dieto. Preučili smo tudi, ali lahko z dodatkom nizkih odmerkov atorvastatina, valsartana ali kombinacije obeh učinkovin k aterogeni dieti, izboljšamo žilno funkcijo oziroma zmanjšamo nastanek teh sprememb. Budre smo razdelili v pet skupin, jih 8 tednov krmili z različnimi vrstami krme (osnovna prehrana, aterogena dieta, aterogena dieta z atorvastatinom, aterogena dieta z valsartanom ter aterogena dieta z atorvastatinom in valsartanom) in nato preučevali njihovo žilno funkcijo. Odzivnost žilnih obročkov torakalne aorte smo merili s pomočjo izometričnega mehansko-električnega pretvornika. Sposobnost sprostitve žilnih obročkov, predhodno skrčenih z 0,1 mmol/L fenilefrina, smo preverili s kumulativnim dodajanjem acetilholina, sposobnost skrčitve pa s kumulativnim dodajanjem fenilefrina. Prisotnost maščobnih leh na abdominalni aorti smo določali tako, da smo aorte vzdolžno prerezali in žilni lumen barvali z raztopino Oil Red O. Rezultate smo statistično ovrednotili z uporabo enofaktorske ali dvofaktorske analize variance in Bonferronijevega post-hoc testa. Opazili smo, da se sprostitveni odziv žil vseh petih skupin med seboj statistično značilno razlikuje, medtem ko v skrčitvenem odzivu ni opaznih razlik. Ugotovili smo, da dodatek učinkovin ali njune kombinacije k aterogeni dieti izboljša žilno funkcijo. Pri teh skupinah živali smo opazili boljšo sposobnost sprostitve žil kot pri skupini, krmljeni z aterogeno dieto. Morfološka analiza žil je pokazala, da je prisotnost maščobnih leh v žilnem lumnu abdominalne aorte manjša ob dodatku atorvastatina in/ali valsartana. Sklepamo, da je kombinacija obeh učinkovin učinkovitejša kot posamezni učinkovini, saj smo ugotovili manjše funkcionalne in morfološke spremembe arterij pri skupini, ki je prejela kombinacijo atorvastatina in valsartana kot pa pri skupinah, ki sta prejemale le eno izmed učinkovin.

ABSTRACT

The incidence of various diseases is increasing with the aging of population. The major group represents cardiovascular diseases which include atherosclerosis and its complications. It is important that the disease and the mechanisms of its development in humans can be explained by using the data obtained in animal experiments. Many studies have shown that guinea pigs (*Cavia porcellus*) are an appropriate animal model for understanding of mechanisms of atherogenesis, since the composition of lipoproteins and cholesterol is similar to human. In addition, they have good and rapidly responses to different kinds of food and drugs. In this study we investigated the functional and morphological changes in arteries of guinea pigs that were chronically fed with atherogenic diet. We have also examined whether the addition of low doses of atorvastatin, valsartan or their combination to the atherogenic diet improves vascular function or reduces the formation of these changes. Guinea pigs were divided into five groups, fed with different types of diets for 8 weeks (basic diet, atherogenic diet, atherogenic diet with atorvastatin, atherogenic diet with valsartan and atherogenic diet with atorvastatin and valsartan) and then their vascular functions were studied. Responsiveness of vascular thoracic aortic rings was measured using isometric converter, which converts mechanical work into electrical impulses. Relaxation of vascular rings previously contracted with 0.1 mmol/L phenylephrine was analyzed by cumulative addition of acetylcholine and contraction was analyzed by cumulative addition of phenylephrine. Abdominal aortas were cut lengthwise and their vascular lumen was stained with an Oil Red O solution to determine the possible presence of fatty plaques. Results were statistically evaluated by using one- or two-way analysis of variance and Bonferroni post-hoc test. We observed statistically different responses of vascular relaxation between all five groups, while responses of contraction did not differ significantly. We noticed that the addition of substances or their combination to atherogenic diet improves vascular function. In these groups of animals we observed a better ability to relax blood vessels than in the group fed with atherogenic diet. Morphological analysis of aortas showed decreased presence of fatty plaques in groups fed with addition of atorvastatin and/or valsartan. We found less functional and morphological changes of the arteries in the group receiving the combination of atorvastatin and valsartan than in groups that were treated only with one substance. In conclusion, the combined use of both substances is more effective than the monotherapy with either substance.

SEZNAM OKRAJŠAV

AC	adenilatna ciklaza
ACAT	acil-CoA-holesterol-aciltransferaza
ACE	angiotenzinska konvertaza
Ach	acetilholin
ApoB	apolipoprotein B
AT₁	angiotenzinski receptor tipa 1
AT₂	angiotenzinski receptor tipa 2
ATP	adenozin trifosfat
[Ca²⁺]_i	znotrajcelična koncentracija kalcijevih ionov
cAMP	ciklični adenzin monofosfat
CETP	holesteril-ester prenosni protein
cGMP	ciklični gvanozin monofosfat
CRP	C-reaktivni protein
DAG	diacilglicerol
EDHF	hiperpolarizacijski dejavnik endotelijskega izvora
EDRF	sprostitutveni dejavnik endotelijskega izvora
GC	gvanilatna ciklaza
HDL	lipoproteini visoke gostote
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metilglutaril koencim A

ICAM-1	medcelična adhezijska molekula-1
IL	interlevkini
IP₃	inozitol-1,4,5-trifosfat
LCAT	lecitin-holesterol-acil-transferaza
LDL	lipoproteini nizke gostote
LPL	lipoprotein lipaza
MCP-1	monocitni kemotaktični protein 1
MCSF	makrofagno kolonije stimulirajoči dejavnik
MLCK	kinaza lahke verige miozina
MMP-9	matriksna metaloproteinaza 9
NO	dušikov oksid
NOS	NO sintaza
PDGF	trombocitni rastni dejavnik
PGE₂	prostaglandin E ₂
PGI₂	prostaciklin
Phe	fenilefrin
PKA	proteinska kinaza A
PKC	proteinska kinaza C
PLA₂	fosfolipaza A ₂
PLC	fosfolipaza C
ROS	reaktivne kisikove spojine
SR	sarkoplazemski retikulum

TF	tkivni faktor
TNF-α	dejavnik tumorske nekroze α
TPA	tkivni aktivator plazminogena
TXA₂	tromboksan A ₂
VCAM-1	adhezijske molekule žilnih celic
VLDL	lipoproteini zelo nizke gostote
vWF	von Willebrandov faktor

1 UVOD

Bolezni srca in ožilja, ki nastanejo kot posledica ateroskleroze, spadajo med tiste kronične nenalezljive bolezni, ki so tako pri nas kot v svetu najpogostejši vzrok obolevanja, invalidnosti ter umiranja prebivalstva in so zato najhujši zdravstveni in ekonomski problem razvitih družb. Prebivalstvo se stara, delež starejšega prebivalstva raste, obolevnost za boleznimi srca in ožilja pa je zagotovo večja med starejšim prebivalstvom kot med mlajšimi. Če te bolezni dovolj zgodaj odkrijemo in pravilno zdravimo, še posebej pa, če preprečujemo, da bi se sploh razvile, izboljšamo tako zdravje posameznika kot zdravstveno stanje populacije. Zdravilne učinkovine imajo pomembno vlogo pri primarnem, še bolj pa pri sekundarnem preprečevanju srčno-žilnih bolezni. S preventivnimi ukrepi v skladu s smernicami Svetovne zdravstvene organizacije smo dosegli upadanje umrljivosti zaradi bolezni obtočil, pri oceni ogroženosti pa je Slovenija od letošnjega leta uvrščena med države z majhno ogroženostjo (1).

1.1 Zgradba arterijske stene

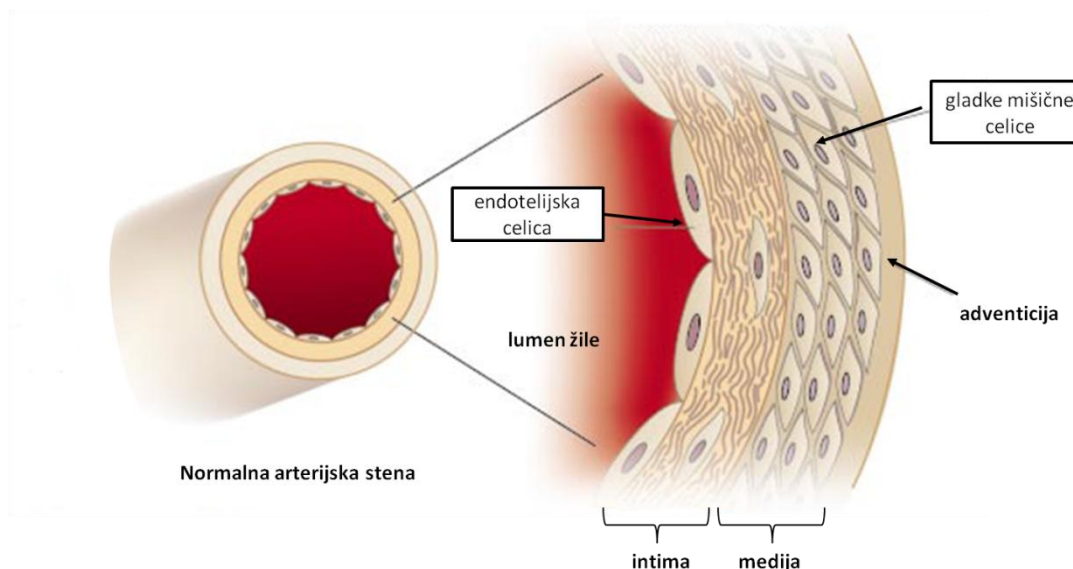
Srčno-žilni sistem sestavljajo srce, ki kri prečrpa, ter arterijski, kapilarni, venski in limfni sistem (2). Žile se med seboj razlikujejo v zgradbi stene in funkciji. Glavna funkcija arterij je dovajanje krvi mikrocirkulaciji (arteriolam, kapilaram, venulam) in uravnavanje krvnega tlaka. Normalna arterijska stena je neprepustna za celične sestavine krvi (2, 3).

Žilno steno od lumna navzven sestavljajo tri plasti (slika 1):

Intima je notranja plast žilne stene, ki je v stiku s krvjo. Sestavljena je iz bazalne lamine in enojne plasti endotelijskih celic, ki vsebujejo številne receptorje za vazoaktivne snovi, imajo antitrombotično in antiadhezijsko funkcijo, delujejo kot selektivna pregrada za sestavine krvi, uravnavajo pa tudi razraščanje gladkih mišičnih celic spodnje plasti. Sestavni del intime so tudi subendotelijsko rahlo vezivo, redke gladkomišične celice in notranja fenestrirana elastična membrana, ki predstavlja mejo med intimo in medijo (2, 4).

Medija je srednja, najdebelejša plast žilne stene. Tvorijo jo krožno razporejeni sloji gladkih mišičnih celic, ki s svojim krčenjem in sprostitvijo spreminjajo tonus arterijske stene, ter zunajcelični matriks (predvsem kolagen in elastin), ki vzdržuje obliko stene. Medijo in adventicijo ločuje zunanja elastična membrana (2, 4).

Adventicija je zunanja plast žilne stene. Sestavljena je iz rahlega veziva (fibroblasti, zunajcelični matriks) in drobnih žil (arteriol, venul, kapilar), ki jih imenujemo *vasa vasorum*. Njihova funkcija je oskrbovanje srednje in zunanje plasti žil s hranili in kisikom. V adventiciji se nahajajo tudi živčni končiči avtonomnega živčnega sistema, ki oživčujejo gladke mišične celice (2, 4, 5).



Slika 1: Zgradba zdrave arterijske stene. Prirejeno po (6).

Ločimo dva tipa arterij, in sicer arterije elastičnega tipa, ki delujejo kot pomožne tlačilke (aorta in veje, ki izhajajo iz aortnega loka, pljučne arterije), in arterije mišičnega tipa, ki omogočajo prenos krvi do periferije (srednje arterije, npr. možganska, renalna arterija). Med obema tipoma arterij je ključna razlika v histološki zgradbi medije. Arterije elastičnega tipa vsebujejo veliko elastina in manj gladkomišičnih celic, arterije mišičnega tipa pa nasprotno manj elastina in več gladkomišičnih celic (2, 4).

1.2 Krčenje in sprostitvev gladkih mišičnih celic

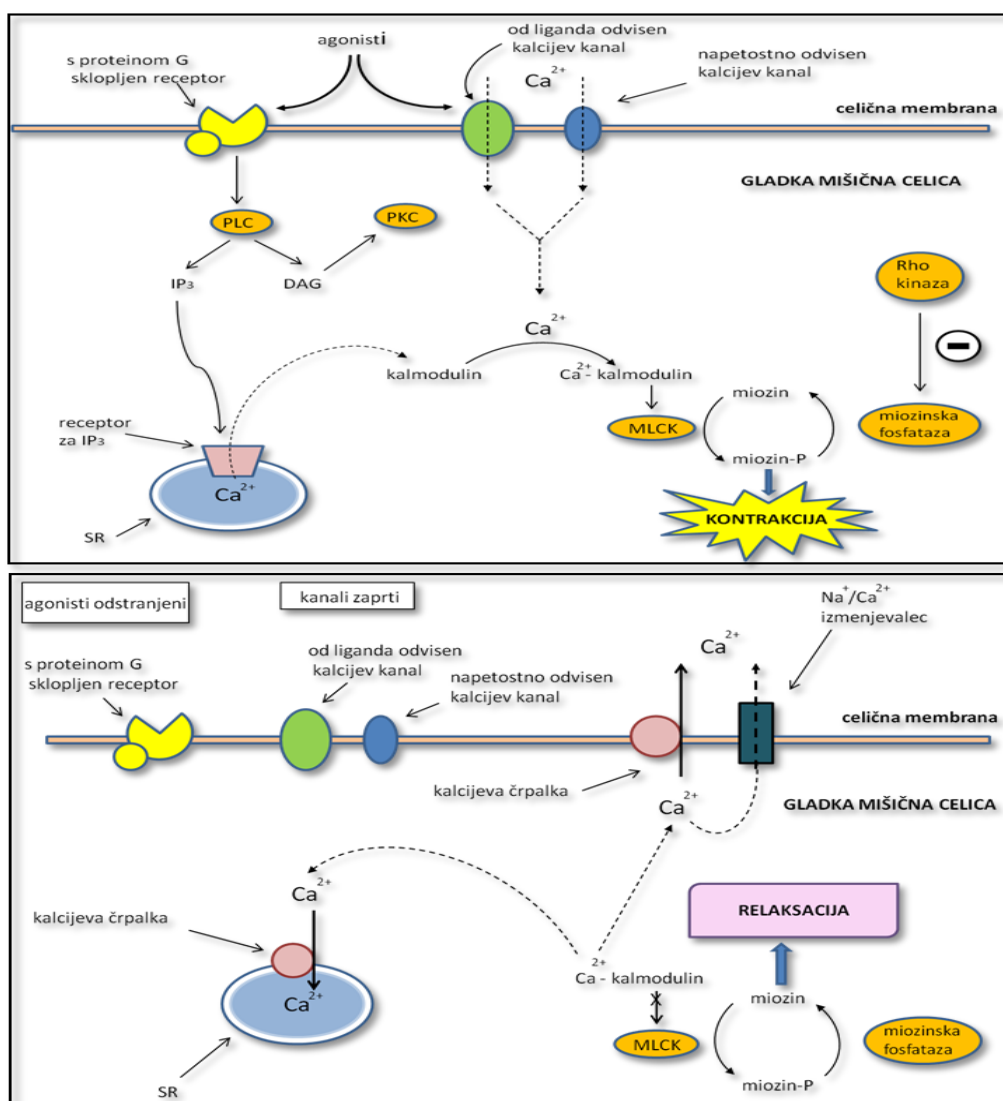
Pravilno delovanje žilne stene je pogoj za normalno delovanje celotnega srčno-žilnega sistema. Pri tem sta pomembna predvsem žilni tonus in njegova ustrezna regulacija. Skrčenje žil je neposredno odvisno od delovanja gladkih mišičnih celic žil in ni pod vplivom človekove svobodne volje, temveč avtonomnega živčnega sistema. Skrčitev gladkih mišičnih celic uravnavajo snovi, ki se sproščajo iz simpatičnih živčnih končičev,

hormoni v krvnem obtoku in snovi, ki jih izloča endotelij (5, 7, 8). Vsem mehanizmom sta skupna dvig znotrajcelične koncentracije kalcijevih ionov ($[Ca^{2+}]_i$) v gladkomišični celici in povečana občutljivost znotrajceličnih struktur zanje, ki predstavljata ključni korak v procesu skrčitve gladkomišičnih celic. $[Ca^{2+}]_i$ je odvisna od kalcija, ki vstopa iz zunajceličnega prostora, kalcija, ki se sprošča iz sarkoplazemskega retikuluma (SR) in od kalcija, odstranjenega iz celice (preko od ATP odvisne kalcijeve črpalke ali Na^+/Ca^{2+} izmenjevalca) ali v znotrajcelično skladišče SR (9).

Krčenje gladke mišice lahko povzročimo z mehaničnim, električnim ali kemičnim draženjem. Dražljaj povzroči depolarizacijo membrane gladke mišične celice in odpre kalcijeve napetostne kanalčke na sarkolemi, skozi katere vstopa kalcij v celico. Kalcij lahko vstopa v celico tudi po vezavi agonista na od liganda odvisne kalcijeve kanale. Krčenje gladkih mišičnih celic povzroči še vezava različnih agonistov (nevrotransmiterjev, hormonov) na specifične receptorje, sklopljene z G proteinom. Posledično se poveča aktivnost fosfolipaze C (PLC), nastaneta sekundarna prenašalca diacilglicerol (DAG) in inozitol-1,4,5-trifosfat (IP_3). IP_3 povzroči sprostitve Ca^{2+} ionov iz sarkoplazemskega retikuluma, DAG pa skupaj s Ca^{2+} ioni aktivira proteinsko kinazo C (PKC), ta pa sodeluje pri krčenju preko fosforilacije specifičnih tarčnih proteinov (7, 9). V reakciji krčenja sta pomembna encima miozin kinaza (kinaza lahke verige miozina, MLCK) in miozin fosfataza, ki fosforilirata oz. defosforilirata specifična mesta na lahki verigi miozina (10). Ca^{2+} ioni s kalmodulinom tvorijo kompleks, ki aktivira MLCK. Poteče fosforilacija neaktivnega miozina, pri tem pa se porablja energija iz ATP. S tem je omogočena interakcija miozina z aktinom znotraj gladke mišične celice ter ciklizacija prečno povezanih aktinsko-miozinskih mostičkov. Posledično pride do tonične skrčitve gladke mišice. Kontrakcija gladkih mišic poteka, dokler so lahke verige miozina fosforilirane, to pa je odvisno od $[Ca^{2+}]_i$ in ATP (7). Do skrčenja pride tudi po poti, neodvisni od Ca^{2+} ionov, in sicer preko Rho-kinaze, ki inhibira miozin fosfatazo in s tem preprečuje defosforilacijo (slika 2) (8, 9, 10).

Do sprostitve gladkih mišičnih celic pride po odstranitvi agonistov z receptorjev ali pod direktnim vplivom snovi, ki zavirajo krčenje oz. povzročijo relaksacijo (9). Za sprostitve je potrebna zmanjšana $[Ca^{2+}]_i$ in povečana aktivnost miozin fosfataze. Ca^{2+} ioni se iz citosola odstranjujejo preko Ca^{2+} črpalke (v sarkoplazemski retikulum in iz celice) in Na^+/Ca^{2+} izmenjevalca (iz celice). Ko pade $[Ca^{2+}]_i$, MLCK preneha z delovanjem, miozinska

fosfataza pa defosforilira miozin in nastopi sprostitvev gladkomišičnih celic. Oba encima, MLCK in miozinska fosfataza, sta regulirana tudi s cikličnimi nukleotidi (cAMP in cGMP) (7). Aktivacija adenilat ciklaze (AC) povzroči nastajanje cAMP, le-ta pa preko inhibicije encima MLCK privede do zmanjšane fosforilacije lahke verige miozina ter sprostitvev gladkomišičnih celic. NO pa aktivira gvanilat ciklazo (GC), ki tvori cGMP. Porast cGMP zavira vdor kalcija v celico, znižuje IP_3 , pospešuje izhod kalcija iz celice in stimulira defosforilacijo miozinskih lahkkih verig z miozinsko fosfatazo. Posledica zmanjšane $[Ca^{2+}]_i$ je sprostitvev gladkomišične celice (slika 2). Delovanje MLCK in miozinske fosfataze je ves čas uravnoteženo, kar vodi bodisi h krčenju bodisi k sprostitvi gladkih mišičnih celic (7, 10).



Slika 2: Shematski prikaz kontraksije in relaksacije gladkomišične celice.

1.3 Vloga endotelija pri uravnavanju žilne homeostaze

Endotelij je notranja plast žilne stene, ki je v stiku s krvjo. Sestavljen je iz enega sloja endotelijskih celic, ki ležijo tesno skupaj, zato je površina notranjega dela žile gladka. Pokriva notranjo površino arterij, arteriol, ven in venul (4). Dolgo je veljalo, da je endotelij samo pasivna bariera, skozi katero selektivno prehajajo različne molekule iz krvi v sosednja tkiva in obratno. Zadnja desetletja pa velja spoznanje, da je žilni endotelij tudi pomembni metabolni in endokrini organ, ki sodeluje pri uravnavanju žilne homeostaze, vpliva na strjevanje krvi in igra pomembno vlogo pri vnetnih procesih ter pri preoblikovanju žilne stene (11). Samostojno ali kot odgovor na različne dražljaje izloča vazoaktivne snovi, ki arterijo bodisi razširijo (vazodilatatorji) bodisi skrčijo (vazokonstriktorji), in preko tega vzdržuje žilni tonus (12). Razširitev povzročijo dušikov oksid (NO), prostaciklin (prostaglandin I₂, PGI₂), C- tip natriuretičnega peptida, bradikinin in iz endotelija izvirajoči hiperpolarizacijski dejavnik (*ang. Endothelium-derived hyperpolarizing factor*, EDHF) (7, 13). Slednji vključuje še ne v celoti poznane posrednike, med katere prištevamo nekatere presnovke arahidonske kisline in endokanabinoide. Preko povečanega izločanja kalija iz celice povzročijo hiperpolarizacijo celične membrane in posledično sprostitvev gladkih mišičnih celic. V večjih arterijah tako NO kot EDHF povzročata sprostitvev žil, vendar prevladuje prispevek NO (14, 15). Skrčenje žil pa je posledica izločanja endotelina-1 (ET-1), angiotenzina II, nekaterih presnovkov arahidonske kisline, tromboksana A₂ (TXA₂), urotenzina II in reaktivnih kisikovih spojin (ROS) (7, 13). Endotelij preko uravnavanja izločanja vazokonstriktorjev in vazodilatatorjev vpliva na tok krvi in širino žilnega lumna. V normalnih fizioloških razmerah prevladuje sprostitvena vloga endotelija. V patofizioloških razmerah (kot so hipoksija, hipertenzija, ateroskleroza) pa so v ospredju funkcije endotelija, od katerih je odvisno skrčenje žil (7).

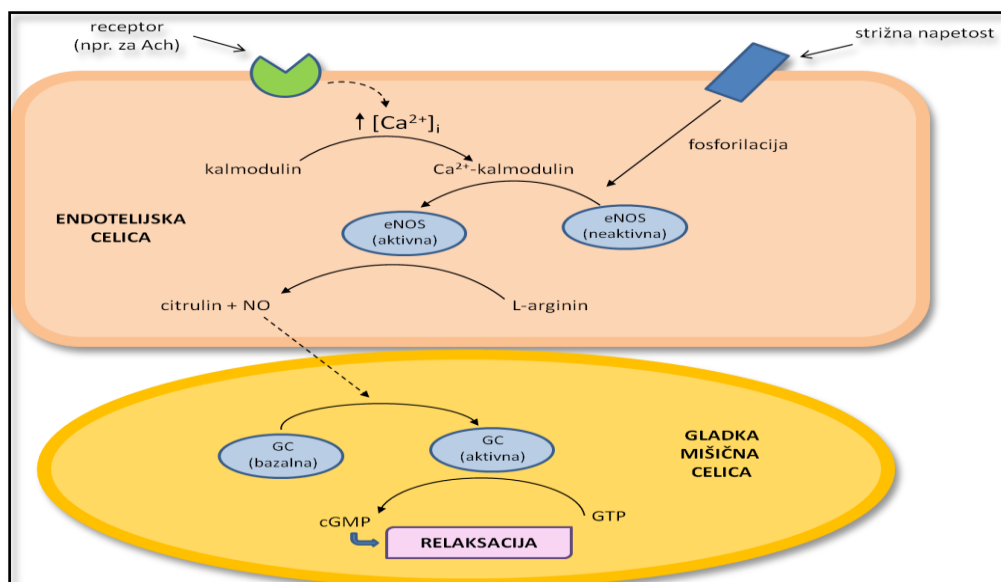
Endotelijske celice izločajo tudi spojine, ki s svojim antitrombotičnim (zavirajo agregacijo trombocitov, npr. prostaciklin in tkivni aktivator plazminogena, tPA) in fibrinolitičnim (razgrajujejo krvne strdke, npr. plazmin) delovanjem varujejo ožilje. Nasprotno pa imajo nekatere druge snovi, ki jih izloča endotelij (npr. angiotenzin II in ET-1), škodljivo delovanje na ožilje, saj spodbujajo prekomerno razraščanje gladkomišičnih celic in s tem pospešujejo aterosklerozo. Poškodovane endotelijske celice izločajo protrombogene snovi (von Willenbrandov faktor (vWF), inhibitor aktivacije plazminogena) (4).

1.3.1 Dušikov oksid (NO)

Dušikov oksid ima poglavitno vlogo pri vzdrževanju žilnega tonusa, saj pod njegovim vplivom pride do največje sprostitve gladkomišičnih celic v žilni steni. Sprva je bil poimenovan sprostitveni dejavnik endotelijskega izvora (EDRF). NO nastaja iz L-arginina in molekularnega kisika v reakciji, ki jo katalizira encim NO-sintaza (NOS) (slika 3). Poznamo tri strukturno različne izo-oblike NO-sintaze. V endotelijskih celicah, kardiomiocitih in trombocitih je prisotna konstitutivna endotelijska NO-sintaza (eNOS). Poznamo pa še nevronske NO-sintazo (nNOS), ki je prisotna v nevronih, ter inducibilno obliko NO-sintaze (iNOS), ki nastaja v endotelijskih celicah in gladkomišičnih celicah v patofizioloških stanjih, kot je npr. vnetje. NO je lipofilna, parakrino delujoča molekula s kratko življenjsko dobo, saj se po nekaj sekundah delovanja deaktivira z oksidacijo v nitrit in nitrat, ki se izločata z urinom (7).

Po osnovni poti preko eNOS poteka 95% sinteze NO. Glavni dražljaj za aktivacijo eNOS je povečanje $[Ca^{2+}]_i$ v endotelijski celici. Ca^{2+} ioni se vežejo na kalmodulin, kompleks kalcij-kalmodulin se veže na eNOS, nastaneta citrulin in NO. Druga, od kalcija neodvisna pot aktivacije eNOS je preko njene fosforilacije. V tem primeru aktivacijo sproži porast strižne napetosti, posledično se zviša koncentracija NO. Po sprostitvi iz endotelija NO difundira do gladkomišičnih celic ter preko aktivacije citosolnega encima GC in posledično povišane koncentracije cGMP povzroči defosforilacijo miozina in s tem sprostitvev gladkomišičnih celic (slika 3) (15).

Dušikov oksid deluje antiaterogeno. V zgodnjih fazah aterogeneze preprečuje pritrditev monocitov na endotelij in njihovo prehajanje v žilno steno, zmanjša pa tudi izražanje kemotaktičnih in adhezijskih molekul (VCAM-1, ICAM-1) ter tkivnega faktorja (TF). V kasnejših fazah deluje zaščitno preko zaviranja sinteze DNA, razraščanja in migracije gladkomišičnih celic iz medije v intimo, agregacije trombocitov in njihove pritrditve na žilno steno, preprečuje pa tudi sproščanje trombocitnega rastnega dejavnika (PDGF) in ima fibrinolitičen učinek (15, 16).



Slika 3: Shematski prikaz sinteze in delovanja NO.

1.3.2 Adrenergični in muskarinski receptorji v žilni steni

Gladke mišične celice žil in endotelijske celice so oživčene z vlakni avtonomnega živčnega sistema. Glavna nevrottransmiterja v avtonomnem živčnem sistemu sta acetilholin in noradrenalin. Acetilholin se veže na nikotinske in muskarinske receptorje, noradrenalin pa na adrenergične receptorje α in β . V gladkih mišicah žil in na površini endotelija najdemo adrenergične α_1 , α_2 in β_2 receptorje ter muskarinske receptorje M_3 . Gre za membranske, z G-proteinom sklopljene receptorje oz. metabotropne receptorje. G-proteini imajo pomembno vlogo v transmembranskem prenašanju signala, so namreč posredniki med receptorji in efektornimi proteini znotraj celice (7, 8).

Stimulacija adrenergičnih receptorjev α_1 povzroči serijo dogodkov, ki preko aktivacije fosfolipaze C (PLC) in posledično preko DAG in IP_3 privedejo do povečanja $[Ca^{2+}]_i$ in vazokonstrikcije (17). Tak mehanizem delovanja ima fenilefrin, ki je selektivni α_1 agonist. Ima močno vazokonstriktorno delovanje na gladke mišice krvnih žil, njegovi učinki na srce in centralni živčni sistem pa so slabo izraženi (7). Aktivacija α_2 receptorjev preko inhibitornega G-proteina povzroči inhibicijo AC in posledično pade koncentracija cAMP, inhibirani pa so tudi kalcijevi kanali. Pride do vazodilatacije. Preko G-proteina pa poteče tudi aktivacija kalijevih kanalov, ki vodi v hiperpolarizacijo celične membrane. Stimulacija α_2 receptorjev pa lahko vodi tudi v vazokonstrikcijo. Preko aktivacije PLC in mobilizacije arahidonske kisline se poveča hidroliza fosfoinozitida v DAG in IP_3 in naraste $[Ca^{2+}]_i$, kar vodi v vazokonstrikcijo (18).

Vezava agonista na adrenergični β_2 receptor preko stimulatornega G-proteina povzroči aktivacijo AC, ki katalizira nastanek sekundarnega prenašalca cAMP, ta pa fosforilira tarčne proteine. Vse to privede do znižanja $[Ca^{2+}]_i$ in vazodilatacije (18).

Stimulacija muskarinskih receptorjev M_3 na endotelijskih celicah žilne stene povzroči aktivacijo PLC, ki vodi v nastanek sekundarnih prenašalcev IP_3 in DAG. IP_3 povzroči sprostitvev Ca^{2+} iz endoplazmatskega retikuluma, Ca^{2+} se poveže s kalmodulinom, to pa aktivira od kompleksa Ca^{2+} -kalmodulin odvisno endotelijsko NOS. NO difundira do gladkih mišičnih celic žil in povzroči njihovo relaksacijo. Muskarinski M_3 receptorji pa se nahajajo tudi v samih gladkih mišicah žil, le da tam vezava acetilholina in posledično dvig Ca^{2+} povzroči kontrakcijo. Stimulacija muskarinskega receptorja M_3 aktivira tudi fosfolipazo A_2 , kar vodi v sproščanje arahidonske kisline in sintezo eikozanoidov. To pa povzroči stimulacijo AC in povečanje cAMP ter zvečano koncentracijo Ca^{2+} in posledično kontrakcijo (18).

1.4 ATEROSKLEROZA

Ateroskleroza je kronični proces, ki najprej prizadene notranjo plast arterijske stene in je tesno povezan z boleznimi srca in ožilja. Zanj je značilno kopičenje lipidov in nekrotičnega materiala v arterijski steni, ki ga spremlja kronično vnetje. Ateroskleroza je sistemska bolezen, kar pomeni, da je lahko prizadet katerikoli odsek arterijskega krvnega obtoka (19). Aterosklerotične spremembe se praviloma najprej pojavijo v centralno ležečih arterijah (kot je abdominalna aorta), lokalizirane pa so predvsem na razcepiščih arterij in neposredno za njimi, saj nenehno vrtnčenje (turbulenca) na teh mestih okvarja arterijsko steno in ta postane dovzetnejša za njihov nastanek in razvoj (16, 19).

1.4.1 Dejavniki tveganja

Ateroskleroza je neizbežna bolezen, njen potek pa je močno odvisen od številnih genetskih dejavnikov in dejavnikov okolja. Proces aterogeneze se začne že v otroštvu oz. mladosti, klinično zaznaven postane v kasnejših življenjskih obdobjih. Čim več nevarnostnih dejavnikov ima neka oseba, tem večja je verjetnost, da se bo ateroskleroza razvila v zgodnejših življenjskih obdobjih (20).

Dejavnike tveganja lahko razdelimo v tri skupine:

- a) Dejavniki, ki so pogojeni z dednostjo ali biološkimi vplivi (nanje nimamo vpliva): spol, starost, genetska podvrženost
- b) Dejavniki, ki so posledica načina življenja in družbenih vplivov (možno jih je odpraviti s spremembo življenjskega sloga): nezdravo prehranjevanje in povečan indeks telesne teže, telesna neaktivnost, kajenje, prekomerno uživanje alkohola, stres
- c) Dejavniki, ki izhajajo iz določenih bolezenskih stanj (delno lahko vplivamo):
 - dislipidemija (zvečano tveganje predstavljajo povišana vrednost LDL holesterola in trigliceridov ter znižana vrednost HDL holesterola v krvi)
 - povišan krvni tlak
 - sladkorna bolezen (glikacija pospeši proces vnetja in nastajanje vnetnih posrednikov)
 - okužba z nekaterimi bakterijami in virusi (npr. *Helicobacter pylori*, *Chlamidia pneumoniae*, virus herpesa simpleksa in citomegalovirus) (19, 20)

Skupek sočasno prisotnih dejavnikov tveganja ima lahko potenciran učinek, saj se delovanje posameznih dejavnikov tveganja množi in ne seštevata. Tako je lahko posameznik s številnimi, čeprav količinsko zmerno izraženimi dejavniki tveganja, bistveno bolj ogrožen za pojav bolezni srca in ožilja od osebe z enim samim, močnejše izraženim dejavnikom tveganja. Odpravljanje obvladljivih dejavnikov tveganja predstavlja pomemben člen v preprečevanju ateroskleroze (21).

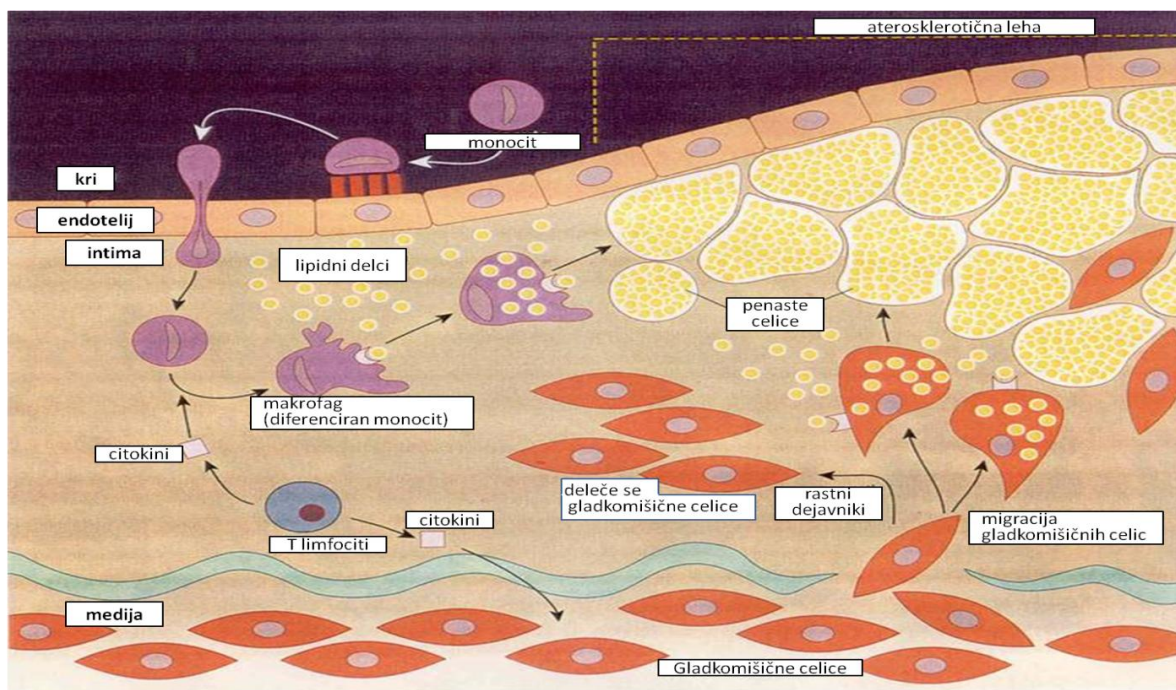
1.4.2 Koncept ateroskleroze

Obstaja več teorij o sproženju procesa ateroskleroze. Najširše sprejeta je hipoteza o poškodbi endotelija, ki ji sledi vnetni odgovor. Dejavnike, ki lahko poškodujejo žilni endotelij, delimo na fizikalne (turbulentni tok krvi, povišan krvni tlak), kemične (ogljikov monoksid, nikotin), presnovne (holesterol, homocistein) in biološke (bakterije, virusi, kompleksi antigen-protitelo, aktivirani trombociti in levkociti) (19). Pojavi se nesorazmerje med delovanjem spojin iz endotelija, ki žilo širijo ali krčijo, ravnotežje se prevesi v smer nastajanja tistih, ki žilo krčijo (11). Posledično je motena od endotelija odvisna razširitvena sposobnost arterij, ki nastane predvsem zaradi motnje v sintezi, sproščanju in razpoložljivosti NO (15, 16). Poznamo več možnih mehanizmov, ki privedejo do znižanja

koncentracije NO: zaviranje izražanja eNOS, zmanjšanje aktivnosti eNOS, zmanjšana razpoložljivost substrata/kofaktorjev, povečana razgradnja NO (7, 13).

V zdravih arterijah je žilni endotelij neprepusten za celične sestavine krvi, prav tako je preprečeno prilepljanje levkocitov. Posledica endotelijske disfunkcije je povečana prepustnost endotelija, ki privede do kopičenja celičnih sestavin krvi, holesterola in lipoproteinov v intimi, še posebno, če je njihova koncentracija v krvi povišana. Lipoproteini v zunajceličnem prostoru intime se lahko kemično spremenijo, s pomočjo reaktivnih kisikovih in dušikovih spojin poteče oksidativna modifikacija delcev LDL (22). Sočasno s kopičenjem lipoproteinov poteka pospešeno prilepljanje levkocitov (monocitov, limfocitov T) na aktivirane endotelijske celice in njihovo prehajanje v intimo arterijske stene preko stikov med endotelijskimi celicami. Pritrjanje levkocitov omogočajo adhezijske molekule (VCAM-1 in ICAM-1), ki jih aktivirane endotelijske celice izražajo na svoji površini pod vplivom oksidativnega stresa in turbulentnega toka krvi. Vstopanje levkocitov v intimo spodbujajo številne kemotaktične molekule, t.i. kemokini (npr. MCP-1, IL-8, IL-6). Po vstopu v intimo se monociti pod vplivom M-CSF diferencirajo v makrofage. Ta proces je eden ključnih pri razvoju aterosklerotične lehe. Makrofagi fagocitirajo oksidirane delce LDL preko dveh posebnih tipov receptorjev na površini makrofagov (tollu-podobni receptorji, odstranjevalni receptorji) (23). Znotrajcelični holesterol, ki je poglavitni produkt razgradnje oksidiranih delcev LDL, se v obliki kapljic kopiči v citosolu makrofagov. Iz makrofaga postopoma nastaja penasta celica. Penaste celice kasneje zaradi nekroze in apoptoze odmrejo in se kopičijo v intimi, kar vodi do nastanka maščobne lehe-majhne maščobne zadebelitve v žilni steni (slika 4) (22, 23).

Začetnemu obdobju ateroskleroze sledi napredovanje bolezni s potovanjem in razmnoževanjem gladkomišičnih celic, sintezo zunajceličnega matriksa in razvojem kompleksnosti aterosklerotičnih leh (Slika 4). V intimi se nalagata kolagen in elastin, kar vodi do nastanka fibroznega pokrova. Maščobna leha tako sčasoma napreduje v aterosklerotično leho (plak, aterom), vanjo pa se pogosto odlagajo tudi kalcijeve soli s prostimi maščobnimi kislinami, zato postane arterijska stena trda in neelastična (ireverzibilno/nepovratno stanje) (22).



Slika 4: Nastajanje aterosklerotične lehe v arteriji. Prirejeno po (24).

Z vstopanjem levkocitov v intimo se v arterijski steni začne kronično vnetje, ki predstavlja osrednji mehanizem aterogeneze. Aktivirani makrofagi sintetizirajo velike količine posrednikov nespecifične imunosti, kot so citokini, rastni dejavniki, proteaze in citotoksične reaktivne kisikove in dušikove spojine, ki spodbujajo vstop monocitov in njihovo preobrazbo v makrofage, prehajanje in razmnoževanje gladkomišičnih celic ter sintezo zunajceličnega matriksa. Poleg nespecifične je za kronično vnetje v aterosklerotičnih lehah pomembna tudi specifična imunost, pri čemer sodelujejo limfociti T. Ob vezavi antigenov (kot so modificirani lipoproteini, infekcijski agensi) na limfocite T pride do tvorbe številnih citokinov, površinskih molekul in encimov. Možna sta dva odgovora celic T pomagalk: Th-1 in Th-2 odgovor (22, 23). Znotraj lehe je pogostejši Th-1 odgovor, ki spodbudi vnetni odgovor z izločanjem citotoksičnih dejavnikov ter spodbuja razvoj ateroskleroze. Nasprotno pa Th-2 odgovor deluje antiaterosklerotično preko izločanja protivnetnih citokinov (npr. IL-10). Ravnotežje med pro- in protivnetno aktivnostjo uravnava napredovanje ateroskleroze (23). Citokini limfocitov T povzročijo nastanek velikih količin molekul nižje v citokinski kaskadi, posledično lahko v periferni krvi zaznamo povišan nivo interleukina 6 in C-reaktivnega proteina (CRP). Koncentracija CRP je zvišana pri bolnikih z akutnim srčnim infarktom, pri bolnikih s koronarno srčno boleznijo pa ima pomembno napovedno vrednost za ponovni pojav ishemične okvare (25).

1.4.3 Zapleti

Klinični potek bolezni se lahko med posamezniki precej razlikuje. Pri nekaterih se kljub močno razširjeni aterosklerozi klinična slika nikoli ne izrazi, pri drugih pa se zapleti izrazijo že zelo zgodaj. Za akutne zaplete, kot so miokardni infarkt, možganska kap in ishemija uda, so nevarne zlasti nestabilne lehe (22). Značilnosti nestabilne lehe so: velika maščobna sredica, ki nastane kot rezultat smrti penastih celic in s kopičenjem maščob v zunajceličnem prostoru, tanek fibrozni pokrov, večje število vnetnih celic (zlasti limfocitov T) in zmanjšano število gladkomišičnih celic znotraj lehe, povečana angiogeneza (tvorba novih kapilar) v intimi in mediji. Aktivirani limfociti izločajo proteolitične encime (večinoma matriksne metaloproteinaze), ki razgrajujejo vezivno ogrodje aterosklerotične lehe, in s tem povzročijo njeno neodpornost za hemodinamski stres. Nestabilna leha lahko poči, kar pomeni, da se pretrga njena vezivna ovojnica in maščobna sredica, ki je močno trombogena, je izpostavljena krvi. Tkivni faktor je tako v stiku z drugimi faktorji strjevanja krvi, aktivirata se intrinzična in ekstrinzična pot strjevanja. Na površini lehe se zato tvori krvni strdek. Ob nastanku večjega krvnega strdka, ki zapre žilno svetlino, pride do akutnih zapletov z značilnimi kliničnimi posledicami. Če nastane manjši krvni strdek, ki ne moti pretoka krvi, taka sprememba običajno ne povzroči klinično zaznavnih posledic. Takšen krvni strdek preraste vezivo, s tem pa se aterosklerotična leha postopoma veča (22, 23). Zanimivo je, da se pri nekaterih bolnikih tudi popolna zopora arterije klinično ne izrazi, kar si lahko razlagamo z izravnalnimi/kompenzatornimi mehanizmi, kot sta kolateralni krvni obtok in prilagoditev tkiva na hipoksijo (5). Klinično se ateroskleroza lahko kaže tudi kronično, npr. s stabilno angino pectoris ob naporu, intermitentnimi klavdikacijami spodnjih okončin ali renovaskularno hipertenzijo (19).

1.4.4 Možnosti zdravljenja

Aterosklerozo lahko zdravimo oz. v zgodnjih fazah tudi preprečujemo. Zdravljenje ateroskleroze vključuje upočasnitev aterogeneze in zmanjšanje tveganja za njene zaplete, to pa lahko dosežemo bodisi z nefarmakološkimi bodisi s farmakološkimi ukrepi. Vselej začnemo z nefarmakološkimi pristopi, po zdravlilih posegamo kasneje (26).

Med nefarmakološke ukrepe sodi sprememba življenjskega sloga, ki vključuje:

- redno telesna aktivnost
- opustitev kajenja

- zdravo prehranjevanje (zadostno uživanje sadja in zelenjave, hrane bogate z vlakninami, rib, energijsko skromne hrane, nenasičenih maščobnih kislin, primerno slane hrane, hrane bogate s kalcijem in ne prepogosto uživanje hitro razgradljivih ogljikovih hidratov)
- normalizacija telesne teže (najmočnejši dejavnik tveganja za razvoj bolezni srca in ožilja je tip debelosti, kjer se maščobno tkivo nabira predvsem na trebuhu)
- obvladovanje stresa

Drugi pristop je farmakološka modulacija različnih mehanizmov, ki so vključeni v proces aterogeneze:

- zdravljenje dislipidemije (statini, smole, ki vežejo žolčne kisline, derivati fibrične kisline-fibrati, nikotinska kislina, zdravila, ki zavirajo absorpcijo holesterola iz hrane-ezetimib, probukol)
- zdravila, ki izboljšajo delovanje endotelija (donorji NO, L-arginin, ACE inhibitorji, sartani)
- zdravila, ki vplivajo na pritok Ca^{2+} ionov v celico (kalcijevi antagonisti)
- zdravila, ki vplivajo na oksidacijski stres (antioksidanti)
- zdravila s protivnetnim delovanjem
- zaviralci agregacije trombocitov (acetilsalicilna kislina)
- antikoagulacijska zdravila
- zdravila, ki vplivajo na razraščanje gladkomišičnih celic (7, 26)

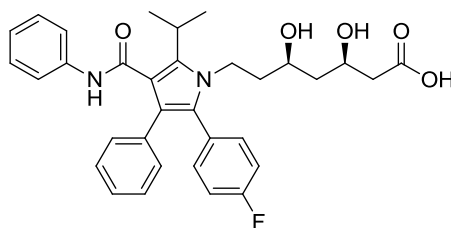
Eden od novejših načinov zdravljenja ateroskleroze je imunska modulacija (imunosupresivna zdravila in cepljenje), za zdravljenje zapletov napredovale ateroskleroze pa so primerni kirurški pristopi (26).

1.5 Atorvastatin

Statini so najbolj učinkovita in najpogosteje predpisana zdravila za zniževanje serumskih vrednosti holesterola. Gre za heterogeno skupino spojin, ki specifično, reverzibilno in kompetitivno zavirajo glavni encim v sintezni poti holesterola: 3-hidroksi-3-metilglutaril-koencim A (HMG-CoA) reduktazo. Ta encim je odgovoren za pretvorbo HMG-CoA v mevalonat (slika 6). Učinkovitost teh spojin je precej odvisna od njihovih fizikalno-kemijskih in farmakokinetičnih lastnosti, kot so hidrofilnost/lipofilnost, absorpcija, tkivna specifičnost in metabolizem. Statini po absorpciji iz želodca podležejo metabolizmu

prvega prehoda v jetrih (7). Na slovenskem trgu so trenutno dostopni atorvastatin, simvastatin, rosuvastatin, fluvastatin, lovastatin in pravastatin (27).

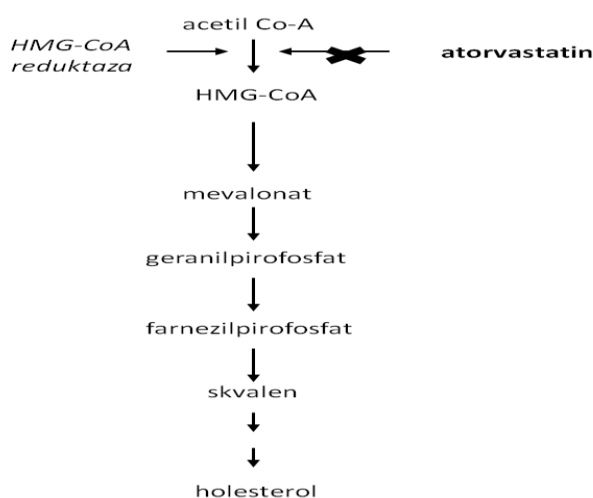
Atorvastatin je sintezna učinkovina, ki se uporablja v obliki kalcijeve soli. Njegovo kemijsko ime je (3*R*,5*R*)-7-[2-(4-fluorofenil)-3-fenil-4-(fenilkarbamoil)-5-(propan-2-il)-1*H*-pirol-1-il]-3,5 dihidroksiheptanojska kislina (slika 5) (28). Uporablja se za zdravljenje hiperholesterolemije in za preprečevanje srčno-žilnih bolezni (29).



Slika 5: Strukturna formula atorvastatina.

1.5.1 Mehanizem delovanja

Statini s selektivnim zaviranjem encima HMG-CoA reduktaze zmanjšujejo endogeno sintezo holesterola. Z naravnim substratom (HMG-CoA) tekmujejo za vezavo na aktivno mesto encima, njihova afiniteta do HMG-CoA reduktaze je 1000-krat večja kot je afiniteta substrata. Jetrne celice zaradi zmanjšane sinteze holesterola kompenzatorno povečajo izražanje LDL receptorjev na svoji površini, posledično se poveča privzem holesterola iz krvi. Statini poleg znižanja serumskih koncentracij celokupnega holesterola in LDL holesterola povzročijo tudi povišanje plazemskih vrednosti HDL (29, 30).



Slika 6: Shematski prikaz sintezne poti holesterola.

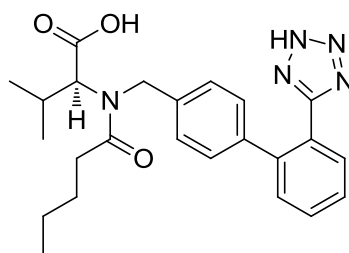
1.5.2 Pleiotropni učinki statinov

Poleg osnovnih učinkov imajo statini tudi dodatne, pleiotropne učinke, ki niso odvisni od neposrednega učinka na holesterol. Gre za učinke, ki so najverjetneje posledica zaviranja nastanka izoprenoidnih intermediatov. Le-ti nastajajo v sintezni poti holesterola in so vključeni v aktivacijo znotrajceličnih signalnih molekul, kot so GTP-vezavni proteini (30-32). Statini s svojim antiaterogenim delovanjem izkazujejo številne zaščitne učinke na ožilje. Preko vpliva na sintezo in sproščanje vazoaktivnih prenašalcev (zavirajo izražanje in nastajanje vazokonstriktorja endotelina-1 ter povečajo biološko uporabnost NO, ki širi žile) izboljšajo delovanje endotelija. Imajo protivnetno (zmanjšujejo vrednosti označevalcev vnetja, kot so CRP, interleukini in interferoni) in antiadhezijsko delovanje (zavirajo nastanek adhezijskih molekul in tako preprečujejo kopičenje monocitov v žilni steni). Zavirajo agregacijo trombocitov in pospešujejo fibrinolizo (povečano sproščanje tPA, zmanjšano PAI-1). Delujejo antioksidativno, saj značilno zmanjšajo nastajanje reaktivnih kisikovih in dušikovih zvrsti ter preprečujejo nastanek oksidiranih delcev LDL. Hkrati tudi stabilizirajo aterosklerotične plake. Povečajo namreč vsebnost kolagena v plaku, zavirajo vnetne procese in aktivnost metaloproteinaz, ki razgrajujejo fibrozni pokrov plaka, ter zmanjšajo velikost lipidne sredice. Pomembno je tudi njihovo imunomodulatorno delovanje. Vplivajo na diferenciacijo, proliferacijo in sekretorno dejavnost monocitov, makrofagov in limfocitov T (22, 23, 32). Poleg tega zaščitno delujejo tudi na srčno mišico, osrednje živčevje, ledvice in druge organe (31). Povzročijo lahko tudi izboljšanje učinka zaviralcev angiotenzinskih receptorjev, saj zmanjšajo izražanje AT₁ receptorjev na gladkih mišičnih celicah (33).

1.6 Valsartan

Sartani so skupina učinkovin, ki delujejo kot zaviralci angiotenzinskih receptorjev in tako preprečujejo nastanek negativnih učinkov angiotenzina II na srce in žilje (34). V Sloveniji so registrirani: losartan, valsartan, irbesartan, kandesartan, telmisartan, eprosartan (27).

Valsartan je sintezna učinkovina. Njegovo kemijsko ime je (S)-3-metil-2-[N-({4-[2-(2H-1,2,3,4-tetrazol-5-il)fenil]fenil}metil)pentanamido]butanojska kislina (slika 7) (35). Uporablja se za zdravljenje hipertenzije, simptomatskega srčnega popuščanja in pri bolnikih po nedavnem miokardnem infarktu (34).

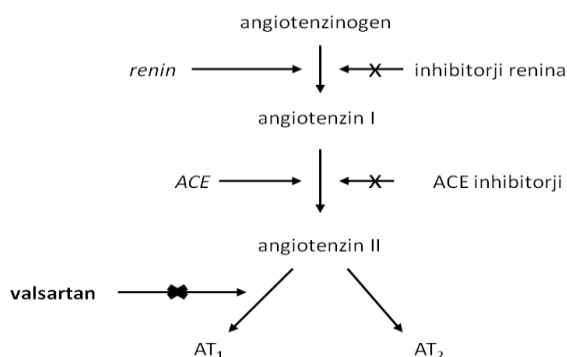


Slika 7: Strukturna formula valsartana.

1.6.1 Mehanizem delovanja

Zaviralci receptorjev angiotenzina II delujejo na renin-angotenzin-aldosteronski sistem. Gre za hormonski sistem, ki je ključnega pomena za uravnavanje arterijskega krvnega tlaka, elektrolitskega ravnotežja in volumna zunajcelične tekočine v telesu. Klasična pot tega sistema se začne s sproščanjem renina iz ledvic v krvni obtok in se nadaljuje preko biološko neaktivnega angiotenzina I in biološko aktivnega angiotenzina II, ki je močan vazokonstriktor, ter aldosterona, ki je glavni regulator elektrolitov v telesu (36) (Slika 8).

Valsartan je specifičen antagonist receptorjev za angiotenzin II. Selektivno deluje na receptorje podvrste AT_1 , ki so odgovorni za učinke angiotenzina II: vazokonstrikcijo, stimulacijo sinteze aldosterona ter zadrževanje vode in natrija, kar lahko vodi v hipertrofijo srčne mišice in žilne medije. Posledica kompetitivnega delovanja zaviralcev je vazodilatacija in s tem zmanjšanje perifernega upora, kar vodi do znižanja krvnega tlaka. Po zaviranju receptorja AT_1 z valsartanom lahko povečana koncentracija angiotenzina II v plazmi spodbudi nezasedene receptorje AT_2 , ki izravnajo učinek receptorjev AT_1 : povzročijo vazodilatacijo, zmanjšanje hipertrofije srčne mišice in žilne stene ter s tem ščitijo delovanje srca in žilja (34, 37).



Slika 8: Shematski prikaz renin-angiotenzinskega sistema.

1.6.2 Pleiotropni učinki sartanov

Zaviralci receptorjev angiotenzina II so bili primarno namenjeni za zdravljenje hipertenzije, izkazalo pa se je, da neodvisno od znižanja krvnega tlaka ugodno vplivajo še na ledvično funkcijo in srce, zmanjšajo pa tudi tveganje za možgansko kap (38). Angiotenzin II ima številne lokalne in sistemske učinke. Ob delovanju na AT₁ receptor je močan vazokonstriktor, s čimer preko povečanja arterijskega tlaka in s tem srčne preobremenitve škodljivo učinkuje na srce in žilje. Vsi ti učinki vodijo do preoblikovanja žilne stene, povečana je njena občutljivost na vazokonstriktorne snovi, potencirano je delovanje simpatičnega živčevja in zmanjšano sproščanje NO, kar vodi v nastanek arterijske hipertenzije in ateroskleroze. Žilna stena se zadebeli, pospešeno je nastajanje aterosklerotičnih plakov, ki so tudi manj stabilni zaradi aktivnejšega vnetja v žilni steni (38, 39). Sartani zaradi preprečevanja vezave angiotenzina II zmanjšajo vse te negativne učinke. Poleg tega zmanjšajo izražanje lektinu podobnih receptorjev (LOX-1 receptor) na površini endotelijskih celic, na katere se vežejo in preko njih v intimo žilne stene prehajajo oksidirani LDL delci. Zmanjšujejo tudi oksidativni stres preko stimulacije superoksid dismutaze, ki deaktivira ROS (39). Zmanjšano je izražanje proinflammatoryh citokinov, rastnih faktorjev in adhezijskih molekul, razmnoževanje in razraščanje gladkomišičnih celic ter agregacija trombocitov (36).

Sartani imajo antihipertenzivni učinek preko zaviranja podtipa receptorjev AT₁, pleiotropni učinki pa so posledica vezave angiotenzina II na AT₂ receptorje, s čimer se sprožijo zaščitni mehanizmi na srčno-žilni sistem. Selektivnost oz. afiniteta sartanov do podtipa receptorjev je odločilna za dober profil pleiotropnih učinkov (33).

1.7 Budre ali morski prašički (*Cavia porcellus*)

Za preučevanje in razumevanje mehanizmov, po katerih potekajo metabolizem lipoproteinov, ateroskleroza in vnetje, je potrebno najti ustrezni živalski model. Mnogi živalski modeli so bili uporabljeni za preučevanje vpliva prehrane, različnih učinkovin, spola, hormonov in telesne aktivnosti na metabolizem holesterola in lipoproteinov, vendar se njihove presnovne poti in distribucija lipoproteinov v plazmi preveč razlikujejo od človeških in imajo zato omejeno uporabnost. V ta namen so uporabljali predvsem transgene miši z izbitim genom za apo B receptor (40).

Budre so se v številnih raziskavah izkazale kot ustrezen živalski model za preučevanje sprememb v metabolizmu holesterola in lipoproteinov, ki so nastale kot posledica diete in vpliva različnih učinkovin. Največja podobnost med človekom in budrami je, da oboji večino holesterola (40-50%) prenašamo v obliki LDL lipoproteinov. Druge pomembne podobnosti so še:

- Podobno HDL/LDL razmerje.
- V jetrih so večje koncentracije prostega kot zaestrenega holesterola.
- Imajo aktivne naslednje encime: holesteril-ester prenosni protein (CETP), ki sodeluje pri reverznem transportu holesterola v jetra (ta pot preprečuje visoko koncentracijo plazemskega holesterola) ter lecitin-holesterol-acil-transferazo (LCAT) in lipoprotinsko lipazo (LPL), ki imata pomembno vlogo pri preoblikovanju lipoproteinov.
- Izkazujejo primerno stopnjo sinteze in razgradnje jetrnega holesterola.
- Vezavna domena za LDL receptor se razlikuje med normalno in mutirano obliko apo B.
- Za razliko od ostalih glodavcev budre ne morejo same sintetizirati vitamina C, zato je potreben njegov zadosten vnos s hrano.
- Samice imajo višjo koncentracijo HDL holesterola kot samci, v primeru odstranitve jajčnikov pa imajo podoben plazemski lipidni profil kot postmenopavzalne ženske.
- S telesno vadbo se jim zniža plazemska vrednost trigliceridov in zviša vrednost HDL.
- Budre se odzivajo na dieto in zdravljenje z učinkovinami z znižanjem vrednosti LDL holesterola (41).

Budre so zaradi naštetih lastnosti uporaben model za preučevanje dislipidemije in vpliva učinkovin na zniževanje serumskih vrednosti holesterola. Njihova prednost je tudi, da imajo dober in hiter odziv na vnos hrane, bogate s holesterolom, vlakninami in nasičenimi maščobami (42).

1.7.1 Vpliv prehrane na metabolizem holesterola in lipoproteinov

a) Vnos nasičenih maščobnih kislin

Raziskave kažejo, da večkrat nenasičene maščobne kisline v primerjavi z nasičenimi maščobnimi kislinami znižujejo plazemski LDL holesterol, kar je posledica večjega izražanja LDL receptorja in zmanjšane pretvorbe VLDL do LDL. Preučevali so tudi vpliv

dolžine verige maščobnih kislin na presnovo jetrnega holesterola in lipoproteinov ter ugotovili, da daljša kot je veriga, večji učinek na znižanje plazemskega holesterola ima. Hrana, bogata z lavrinsko (12C) in miristinsko (14C) kislino, ima največji učinek na povišanje holesterola, in sicer zaradi povečane sinteze VLDL in večje aktivnosti encima acil-CoA-holesterol-aciltransferaze (ACAT) v jetrih. Po vnosu stearinske (18C) in palmitinske kisline (16C) so opazili nižje plazemske koncentracije holesterola (41).

b) Vnos holesterola

Budre se na vnos holesterola odzovejo podobno kot ljudje. Povečan vnos holesterola s hrano se kaže kot kopičenje holesterola v jetrih in posledično povišanje njegove plazemske koncentracije. Budre se na to odzovejo s kompenzatornimi mehanizmi, najprej z zaviranjem aktivnosti encima HMG-CoA reduktaze, posledično se zmanjša sinteza endogenega holesterola. Poveča se tudi aktivnost ACAT, število LDL receptorjev na membranah hepatocitov pa se zmanjša (41). V splošnem velja, da ima s hrano vnesen holesterol večji vpliv na koncentracijo holesterola v plazmi in jetrih ter aktivnosti HMG-CoA reduktaze kot pa nasičene maščobe (43).

c) Vnos ogljikovih hidratov

V raziskavah so dokazali, da se je pri budrah, ki so dobivale hrano z nizko vsebnostjo ogljikovih hidratov (tudi če je bila vsebnost holesterola visoka), pojavilo manjše število srednjih in majhnih LDL delcev, ki predstavljajo tveganje za srčno-žilne bolezni. Posledica zmanjšane vnosa ogljikovih hidratov je tvorba večjih LDL, ki so manj aterogeni, saj manj prehajajo skozi arterijsko steno. Posledično je zmanjšana tvorba oksidiranih LDL delcev, penastih celic in pro-vnetnih citokinov, ki so odgovorni za vnetje. Zmanjšano je tudi kopičenje holesterola v aorti (44).

1.7.2 Vpliv učinkovin na metabolizem holesterola in lipoproteinov

Budre so dober model za preučevanje vpliva učinkovin na znižanje plazemskih koncentracij holesterola, predvsem inhibitorjev HMG-CoA reduktaze. Opazili so značilno znižanje plazemskih koncentracij celokupnega in LDL holesterola tudi pri nizkih odmerkih statinov. Glavni mehanizem, preko katerega deluje večina statinov, je povišanje števila LDL receptorjev na površini hepatocitov, večji je privzem LDL iz cirkulacije v jetra. Atorvastatin znižuje LDL holesterol preko zmanjšane izločanja apo B iz jeter, posledično nastane manj LDL iz VLDL. Kažejo se razlike v velikosti LDL delcev,

zmanjšana pa je tudi njihova sposobnost oksidacije. Klinične študije na ljudeh so pokazale vpliv atorvastatina na povišanje plazemske koncentracije HDL holesterola, medtem ko pri budrah le-ta ostaja nespremenjena (45).

Podobne rezultate dajejo tudi študije solestiraminom, probukolom, smolami, ki vežejo žolčne kisline in ostalimi učinkovinami, ki se uporabljajo za zdravljenje hiperholesterolemije (45).

1.7.3 Budre kot modeli za preučevanje ateroskleroze in vnetja

Številne raziskave so pokazale, da lahko budram z ustrezno prehrano v kratkem času induciramo aterosklerozo. Na razvoj aterosklerotičnih plakov vplivata tudi spol in hormonski status. Diete z visoko koncentracijo holesterola povzročijo kopičenje holesterola v aorti (46), nasprotno pa lahko določene komponente v hrani (vitamin C in E, vlaknine, polifenoli) in zdravilne učinkovine njegovo koncentracijo zmanjšajo kljub povišanemu vnosu holesterola (41).

Za preučevanje ateroskleroze je pomembno, da je živalski model čim bolj podoben človeku ne samo v presnovi holesterola in lipoproteinov, temveč tudi v procesih vnetja, ki je temeljni mehanizem aterogeneze. Izvedli so študijo, v kateri so preučevali vnetne komponente, ki nastanejo v procesu prehransko inducirane ateroskleroze. Opazili so značilno povišanje provnetnih citokinov in ekspresijo mRNA v aortah buder, krmljenih z dieto, ki je vsebovala veliko holesterola, v primerjavi z budrami, ki so prejemale krmo z nizko vsebnostjo holesterola. Zmanjšano ekspresijo vnetnih citokinov je opaziti tudi pri zmanjšanem vnosu ogljikovih hidratov (41).

2 NAMEN DELA

Številni avtorji navajajo, da so budre zaradi mnogih podobnosti s človekom dober živalski model za preučevanje procesa ateroskleroze in da jim lahko v kratkem času z ustrezno dieto induciramo zaznavne aterosklerotične spremembe na arterijah. Imajo pa tudi dober odziv na terapijo z zdravilnimi učinkovinami. Glede na izsledke študij izkazujeta atorvastatin in valsartan zaščitne učinke na srčno-žilni sistem.

Namen naše raziskave je preučiti, ali lahko z dodatkom atorvastatina, valsartana in kombinacije obeh učinkovin vplivamo na funkcionalne in morfološke spremembe arterij pri budrah, ki nastanejo kot posledica kroničnega krmljenja z aterogeno dieto. Ugotoviti želimo, ali so te spremembe manjše, če živali ob aterogeni dieti prejemajo še nizke odmerke navedenih učinkovin ter ali ima kombinacija obeh učinkovin močnejše delovanje kot vsaka učinkovina posebej. V ta namen bomo živali razdelili v več skupin in jih krmili s proaterogeno dieto z ali brez učinkovin.

Odzivnost žil bomo preverili z acetilholinom, ki se veže na muskarinske receptorje tipa M_3 in žile sprošča, ter s fenilefrinom, ki preko vezave na adrenergične α_1 receptorje žile krči. Funkcionalne spremembe se kažejo kot zmanjšan sprostivni odziv na acetilholin. Rezultate bomo primerjali z dvofaktorsko analizo variance in Bonferronijevim post-hoc testom. Na abdominalni aorti bomo s pomočjo barvanja z raztopino Oil red O določili morebitno prisotnost maščobnih leih (t.i. morfološke spremembe) in med skupinami buder primerjali deleže površin maščobnih leih glede na celotno površino aorte.

Naše delovne hipoteze so:

1. Z ustrezno aterogeno dieto lahko v 8 tednih induciramo zaznavne funkcionalne in morfološke spremembe na arterijah buder.
2. Pod vplivom atorvastatina v nizkem odmerku so funkcionalne in morfološke spremembe na arterijah manjše.
3. Pod vplivom valsartana v nizkem odmerku so funkcionalne in morfološke spremembe na arterijah manjše.
4. Kombinacija obeh učinkovin ima močnejše delovanje pri zmanjševanju sprememb na srčno-žilnem sistemu kot posamezni učinkovini.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Uporabljeni reagenti in raztopine

Pri delu smo uporabljali spodaj našteje snovi in reagente. Reagenti so navedeni v kronološkem zaporedju.

3.1.1 Sestavine, uporabljene pri pripravi krme

Briketi za osnovno krmljenje buder: (Altromin 3123, Lage, Nemčija) hranila: 89% suhe snovi, od tega: 14% beljakovin, 4% maščob, 19.5% vlaknin, 7.5% pepela in 44% ekstrakta (brez dušika); minerali: 0.8% kalcija, 0.6% fosforja, 0.2% magnezija, 0.2% natrija, 0.9% kalija; elementi v sledovih: 150 ppm železa, 50 ppm mangana, 45 ppm cinka, 13 ppm bakra, 1.2 ppm joda, 0.6 ppm selena, 0.3 ppm kobalta; vitamini; aminokisline.

Briketi za doječe budre: (Altromin 3113, Lage, Nemčija) hranila: 89% suhe snovi, od tega: 15.5% beljakovin, 4% maščob, 19.5% vlaknin, 8% pepela, 42% ekstrakta (brez dušika); minerali: 0.8% kalcija, 0.5% fosforja, 0.2% magnezija, 0.2% natrija, 0.9% kalija; elementi v sledovih: 150 ppm železa, 50 ppm mangana, 45 ppm cinka, 13 ppm bakra, 1.2 ppm joda, 0.6 ppm selena, 0.3 ppm kobalta; vitamini; aminokisline

Jajčni rumenjaki: (jajca Mercator generik, Slovenija) sestava na 100 g: 26,54 g maščob; 1234 mg holesterola; 3,59 g ogljikovih hidratov; 15,86 g beljakovin; 52,31 g vode.

Holesterol (Acros organics, Belgija).

Fruktoza (KEFO, Ljubljana, Slovenija).

Jedilna svinjska mast (Mercator, Slovenija).

Atorvastatin (Krka, Novo mesto, Slovenija) smo uporabili v obliki kalcijeve soli.

Valsartan (Krka, Novo mesto, Slovenija).

3.1.2 Reagenti, uporabljeni pri izolaciji žil

CO₂ (Messer, Ruše, Slovenija): plinska mešanica 75% CO₂ in 25% N₂, ki smo jo uporabili za evtanazijo živali.

Heparin (Krka, Novo mesto, Slovenija) je glikozaminoglikan, ki se veže na trombin III in ga aktivira. Uporablja se kot antikoagulant. V viali je 5 mL raztopine za injiciranje, ki vsebuje 25000 i.e. heparina v obliki natrijeve soli. Pred izolacijo aort smo živalim intraperitonealno vbrizgali heparin v odmerku 1,7 mL/kg telesne teže živali.

Formalin: 10% vodna raztopina formaldehida (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija).

3.1.3 Reagenti, uporabljeni pri merjenju odzivnosti žilnih obročkov

K-H raztopina (modificirana raztopina po Krebs-Henseleitu): pH=7,4

- 118 mmol/L NaCl (Merck, Darmstadt, Nemčija);
- 4,7 mmol/L KCl (Merck, Darmstadt, Nemčija);
- 1,2 mmol/L KH₂PO₄ (Kemika, Zagreb, Hrvaška);
- 1,2 mmol/L MgSO₄ x 7H₂O (Merck, Darmstadt, Nemčija);
- 23,8 mmol/L NaHCO₃ (Merck, Darmstadt, Nemčija);
- 2,5 mmol/L CaCl₂ (Kemika, Zagreb, Hrvaška);
- 11 mmol/L glukoze (Kemika, Zagreb, Hrvaška).

Za vsako serijo poskusov smo pripravili 10 litrov K-H raztopine.

Karbogen (Messer, Ruše, Slovenija): plinska mešanica 95% O₂ in 5% CO₂, ki smo jo uporabili za prepihanje raztopine K-H v kivetah.

KCl (Merck, Darmstadt, Nemčija; M=74,56 g/mol). Pripravili smo matično raztopino koncentracije 3 mol/L.

Acetilholin (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA; $M=181,7$ g/mol). Pripravili smo matično raztopino koncentracije 10 mmol/L.

Fenilefrin (hidroklorid) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija; $M=203,7$ g/mol). Pripravili matično raztopino koncentracije 10 mmol/L.

Vse matične raztopine smo pripravili v bidestilirani vodi ter jih redčili do končnih koncentracij, ki so navedene pri posameznem reagentu.

3.1.4 Reagenti, uporabljeni pri morfometriji

Raztopina Oil red O:

- Oil red O osnovna (»stock«) raztopina: 0,7 g Oil red O (Sigma-Aldrich O-0625, St. Louis, ZDA; $M=408,5$ g/mol); 200 mL izopropanola (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- Oil red O delovna raztopina: 6 delov Oil red O stock, 4 deli demineralizirane vode.

3.2 Aparature, pribor in oprema

Shranjevanje vzorcev:

- Hladilnik, +4 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- Zamrzovalnik, -20 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)

Tehtanje:

- Analizna tehtnica KERN ALS 120-4 (Kern & Son GmbH, Balingen, Nemčija)

Raztapljanje:

- Polavtomatske pipete (Biohit, Helsinki, Finska)
- Ultrazvočna kadička SONIS 2 GT (Iskra PIO d.o.o., Šentjernej, Slovenija)
- Čaše (5 mL, 10 mL, 50 mL, 100 mL)

Izolacija arterij:

- Škarje
- Mala in velika pinceta
- Kirurška prijemalka
- Čaša 20 mL

Poskusi na izolirani torakalni aorti:

- Naprava za izolirane žile (Laboratorij za eksperimentalno srčno-žilno farmakologijo, Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, Medicinska fakulteta, Ljubljana)
- Osebni računalnik
- Polavtomatske pipete (Biohit, Helsinki, Finska)

3.3 Poskusne živali

Pri izvedbi poskusov smo uporabili budre (*Cavia porcellus*) reje DHN (Dunkin Hartley), ki so bile vzrejene na Inštitutu za farmakologijo in toksikologijo. Na začetku poskusa so bile stare med 5 in 8 mesecev. Razdelili smo jih v 5 skupin po 6-9 živali s približno enako težo in starostjo, v posameznih skupinah sta bila prisotna oba spola (tabela I). Vsako skupino smo vzrejali v svoji kletki z neomejeno količino krme določene sestave, ki se je razlikovala med skupinami. Živali so imele ves čas na razpolago poljubno količino vode (*ad libitum*). Krmili smo jih v stalnih klimatskih pogojih pri temperaturi okolja 24 $\pm$ 1 °C in povprečni relativni vlažnosti 51% z menjavo dnevno-nočne osvetlitve na 12 ur ter neprekinjenim prezračevanjem. Poskuse smo opravljali med 8. in 20. uro v času od oktobra do decembra 2011.

Uporabo poskusnih živali v izobraževalne, raziskovalne in druge znanstvene namene v Sloveniji urejajo zakon o zaščiti živali in drugi podzakonski akti, ki vsebinsko povzemajo pravna določila Evropske unije (47, 48). Laboratorij za eksperimentalno srčno-žilno farmakologijo na Inštitutu za farmakologijo je pridobil dovoljenje za poskuse na živalih št. 34401-23/2009/3 pri Veterinarski upravi Republike Slovenije.

Tabela I: Razdelitev buder po skupinah.

VRSTA KRME	KLETKA ŠT.	SKUPNO ŠT. ŽIVALI	ŠTEVILO SAMIC	ŠTEVILO SAMCEV
Osnovna krma	1	8	5	3
Aterogena krma (AK)	2	9	6	3
AK + atorvastatin	3	7	2	5
AK + valsartan	4	6	4	2
AK + kombinacija	5	6	3	3

3.4 Sestava diete

Aterogeno dieto za indukcijo ateroskleroze smo pripravili iz briketov za krmljenje buder in homogene zmesi, s katero smo briquete oblikovali. Homogena zmes je bila sestavljena iz proaterogenih snovi: jajčnih rumenjakov, holesterola, svinjske masti in fruktoze (tabela II). Sestavo diete smo določili na podlagi predhodnih poskusov na budrah, ki so jih opravili v Laboratoriju za srčno-žilno farmakologijo (49). S preizkušanjem različnih kombinacij proaterogenih snovi in njihovih vsebnosti so uspeli pripraviti dieto, ki je bila dovolj obstojna in proaterogena za čim hitrejšo in čim večjo indukcijo ateroskleroze.

Tabela II: Sestava aterogene krme.

SESTAVINE	[%]
Briketi za osnovno hranjenje buder	38,5
Briketi za doječe budre	38,5
Jajčni rumenjaki	8,6
Svinjska mast	5,0
Holesterol	1,0
Fruktoza	8,4

Krmi, ki je bila namenjena skupinam, pri katerih smo preučevali vplive učinkovin, smo dodali ustrezne količine atorvastatina, valsartana ali kombinacije obeh učinkovin. Pri določanju odmerkov učinkovin smo izhajali iz predhodnih poskusov, izvedenih v Laboratoriju za srčno-žilno farmakologijo, le-ti pa so temeljili na preteklih raziskavah, kjer so preučevali vpliv teh učinkovin na srčno-žilni sistem buder. V eni od raziskav so preučevali učinek atorvastatina v odmerku 10 mg/kg/dan. Odmerek valsartana (4,8 mg/kg/dan) je bilo potrebno preračunati glede na losartan (3 mg/kg/dan), ki so ga uporabili v podobni študiji (49). Ker smo v naši raziskavi želeli preveriti vpliv učinkovin v subterapevtskih odmerkih, smo dobljene vrednosti atorvastatina in valsartana prepolovili.

Tabela III: Odmerki učinkovin na budro.

Učinkovina	Odmerek
Atorvastatin	5 mg/kg/dan
Valsartan	2,4 mg/kg/dan

Iz jajčnih rumenjakov, holesterola, svinjske masti, fruktoze in učinkovin smo pripravili tekočo homogeno zmes, v kateri smo med ročnim mešanjem nekaj minut namakali brikete. Enakomerno prepojene brikete smo nato 1 teden sušili pri 25 °C in visokem pretoku zraka, razporejene v čim tanjšem sloju in na čim večji površini.

3.5 Krmljenje

Na začetku poskusa smo za vsako skupino pripravili po 5 kg krme po shemi, prikazani v spodnji tabeli. Novo zalogo krme smo pripravili, ko je kateri izmed skupin krme zmanjkalo. Krmo smo pripravljali po enakem postopku do žrtvovanja živali.

Budre smo krmili 8 tednov po načelu *ad libitum*. Vsak dan so imele na razpolago novo zalogo krme, ki so je lahko pojedle v neomejenih količinah, in poljubno količino vode. Povprečno porabo hrane na dan smo ocenili iz porabljene krme v vseh kletkah in je znašala 50 g na budro.

Tabela IV: Shematski prikaz sestave krme po skupinah.

Vrsta krme	Osnovni briketi (kg)	Briketi za doječe budre (kg)	Jajčni rumenjaki (kom)	Svinjska mast (g)	Holesterol (g)	Fruktoza (g)	Atorvastatin (mg)	Valsartan (mg)
Navadna krma	5	/	/	/	/	/	/	/
Aterogena krma (AK)	1,93	1,93	50	250	50	420	/	/
AK+atorvastatin	1,93	1,93	50	250	50	420	500	/
AK+ valsartan	1,93	1,93	50	250	50	420	/	240
AK+kombinacija	1,93	1,93	50	250	50	420	500	240

3.6 Žrtvovanje

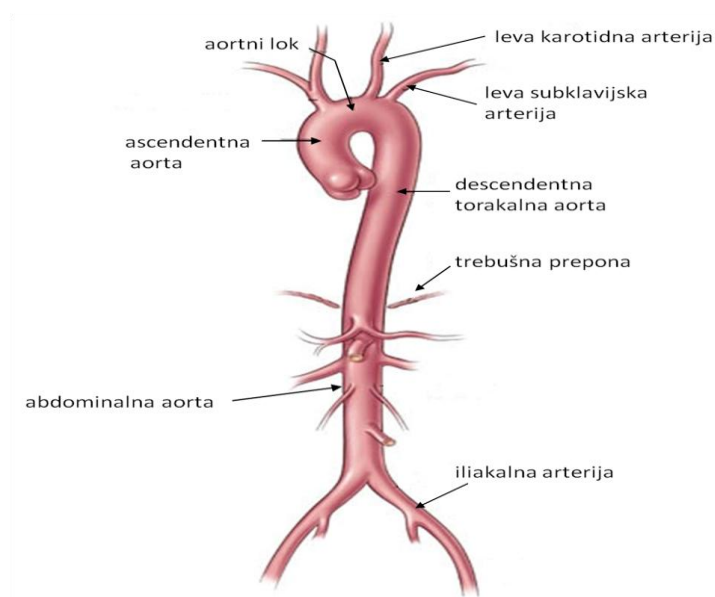
Evtanazijo živali smo izvedli s CO₂ v ustrezni komori s stalnim dotokom plinske mešanice po predpisanem strokovnem postopku. Žival je najprej izgubila zavest, nato je nastopila smrt. Za preprečitev strjevanja krvi smo živalim intraperitonealno vbrizgali heparin (1,7 mL/kg telesne teže živali). Živali smo še nekaj minut pustili v komori, nato smo pričeli z izolacijo žil.

Trebušno steno smo odprli v višini 2 cm pod ksifoidnim izrastkom spodnjega dela prsnice. Z odstranitvijo trebušne prepone smo si prikazali srce in velike žile v prsnem košu in

trebušni votlini buder (slika 9). Žival smo izkrvaveli s prekinitvijo spodnje vene kave. Najprej smo izolirali koronarne arterije, jih shranili v tekočino, ki preprečuje razgradnjo RNA (RNA later) ter čez noč dali v hladilnik in kasneje v zamrzovalnik. Vzorce koronarnih arterij smo shranili za izvajanje genske ekspresije. Nato smo od torakalne aorte odstranili okoliško vezivno in maščobno tkivo ter jo izolirali iz živali. Zgoraj smo aorto prekinili pod izhodiščem leve arterije subklavije, spodaj pa nad trebušno prepono. Iz izolirane torakalne aorte smo pripravili 8 žilnih obročkov, ki so bili premera 5 mm in široki 3-4 mm. Žilne obročke smo namestili v kivete naprave za poskuse na izoliranih žilah, ki so bile napolnjene z raztopino K-H. Od začetka izolacije do namestitve žilnih obročkov je v povprečju preteklo 10-15 minut.

Izolirali smo tudi 1 cm abdominalne aorte, ki se nahaja pod trebušno prepono do razdelitve v levo in desno iliakalno arterijo. Očistili smo jo okolnega maščevja in veziva, nato pa jo fiksirali v 10% pufranem formalinu za 5-7 dni. Izolirano abdominalno aorto smo uporabili za morfometrijo.

Za namen genske ekspresije smo izolirali še karotidne arterije. Shranili smo jih v RNA later, jih čez noč hranili v hladilniku in jih nato dali v zamrzovalnik, kjer morajo biti shranjene do nadaljnjih raziskav. Na enak način smo pripravili in shranili tudi 1-1,5 cm torakalne aorte. Genske ekspresije v naši raziskavi nismo izvajali.



Slika 9: Zgradba aorte. Prirejeno po (50).

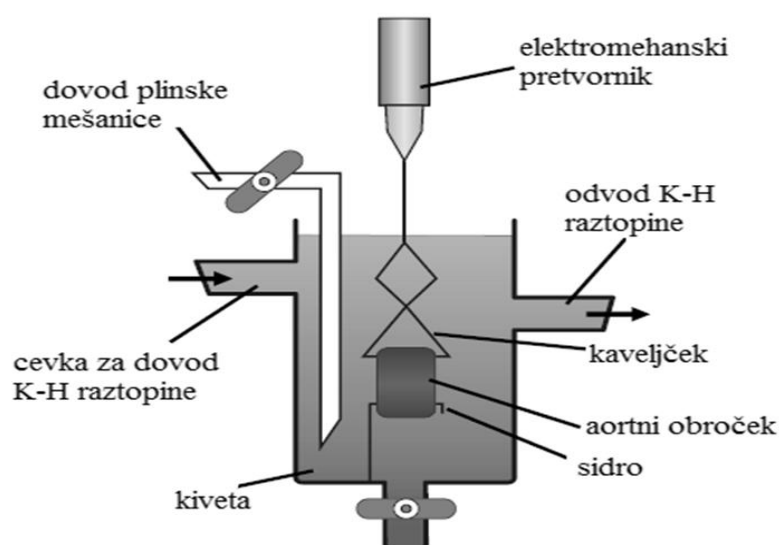
3.7 Poskusi na izoliranih torakalnih aortah buder

3.7.1 Naprava za poskuse na izoliranih žilah

Naprava za poskuse na izoliranih žilah (slika 10) je bila izdelana v Laboratoriju za eksperimentalno srčno-žilno farmakologijo na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Napravo sestavljajo vodna kopel in osem kivet s prostornino 10 ml. Kivete imajo ločen dovodni in odvodni sistem za izmenjavo hranilne K-H raztopine ter dovod plinske mešanice za oksigenacijo raztopine. Za ustvarjanje normoksičnih razmer smo raztopino prepihovali s plinsko mešanico s 95% CO₂ in 5% O₂. Termostatsko nadzorovana vodna črpalka je vzdrževala konstantno temperaturo vodne kopeli pri 37,0 °C ± 0,5 °C. Reagente smo v kivete dodajali skozi zgornjo odprtino s polavtomatskimi pipetami.

Skozi lumen žilnih obročkov smo vstavili dve vzporedni nerjaveči kovinski žici. Spodnja žica (sidro) je bila vpeta na držalo znotraj kivete, zgornja žica (kaveljček) pa je bila povezana z elektromehanskim pretvornikom (ITIS, Ljubljana, Slovenija). Elektromehanski pretvornik je spremembo sile izometričnega krčenja žilnih obročkov (izražene v mN) pretvarjal v spremembo električne napetosti (izražene v mV). Spremembe električne napetosti smo preko ojačevalca in A/D pretvornika (National Instruments, NI PCI-6013, ZDA) zapisovali na trdi disk osebnega računalnika. Dobljene podatke smo nato obdelovali s programsko opremo DEWESoft 6.1 (Dewetron, Trbovlje, Slovenija).



Slika 10: Shematski prikaz naprave za poskuse na izoliranih žilah. Prirejeno po (49).

3.7.2 Protokol poskusov

Število živali, ki smo jih žrtvovali za poskuse na izoliranih torakalnih aortah, je prikazano v spodnji tabeli (tabela V).

Tabela V: Število buder, uporabljenih za poskuse na izoliranih žilnih obročkih.

VRSTA KRME	KLETKA ŠT.	SKUPNO ŠT. ŽIVALI	ŠTEVILO SAMIC	ŠTEVILO SAMCEV
Osnovna krma	1	6	3	3
Aterogena krma (AK)	2	5	2	3
AK + atorvastatin	3	5	1	4
AK + valsartan	4	6	4	2
AK + kombinacija	5	4	1	3

Žilne obročke torakalnih aort smo vpeli med sidro in kaveljček, potopili v K-H raztopino v kiveti ter odprli dotok kisika. Ko so bili žilni obročki nameščeni, smo jih najprej dvakrat sprali s K-H raztopino. Pred dodajanjem reagentov je bilo obročke potrebno stabilizirati. 60 minut smo jih uravnavali na mirovno napetost 20 mN, vmes pa na vsakih 15 minut menjavali K-H raztopino. Ko smo dosegli stabilno mirovno napetost žilnih obročkov pri 20 mN, smo preizkusili njihovo odzivnost z dodatkom 200 μ L matične raztopine KCl. Končna koncentracija KCl v kiveti je znašala 60 mmol/L. Po približno 30 minutah je skrčitev dosegla stabilni plato, žilne obročke smo izprali in postopek ponovili z enako koncentracijo KCl, da smo dosegli enakomernost odziva (slika 11).

Odzivnost žilnih obročkov smo preverili po enakem postopku pri vseh skupinah živali. Kontrolno vrednost so predstavljali poskusi odzivnosti endotelija pri živalih z osnovno prehrano, primerjane skupine pa tiste, ki so prejemale aterogeno dieto ali aterogeno dieto z učinkovino.

3.7.2.1 Meritve sposobnosti sprostitve žilnih obročkov z acetilholinom

Po izpiranju in stabilizaciji v raztopini K-H smo vsak žilni obroček skrčili s fenilefrinom, katerega koncentracija v kiveti je znašala 0,1 mmol/L. Po približno 5 minutah je skrčitev dosegla stabilni plato. Nato smo dodali acetilholin, s katerim smo izzvali sprostitve obročkov. Iz matične raztopine acetilholina s koncentracijo 10 mmol/L smo z redčenjem

pripravili raztopine različnih koncentracij, ki smo jih nato dodajali v kivete (tabela VI). S kumulativnim dodajanjem ustreznih volumnov teh raztopin smo v kiveti dosegli končne koncentracije acetilholina: 10^{-5} ; 10^{-4} ; 10^{-3} ; 10^{-2} ; 0,1 mmol/L. 1-2 minuti po vsakem dodatku raztopine je sprostitvev dosegla plato in takrat smo odčitali vrednost napetosti žilnega obročka ter dodali naslednjo koncentracijo acetilholina. Po zadnjem odzivu smo žilne obročke sprali z raztopino K-H in tako povzročili, da so se vrnil na mirovno napetost (slika 11).

Tabela VI: Protokol kumulativnega dodajanja acetilholina.

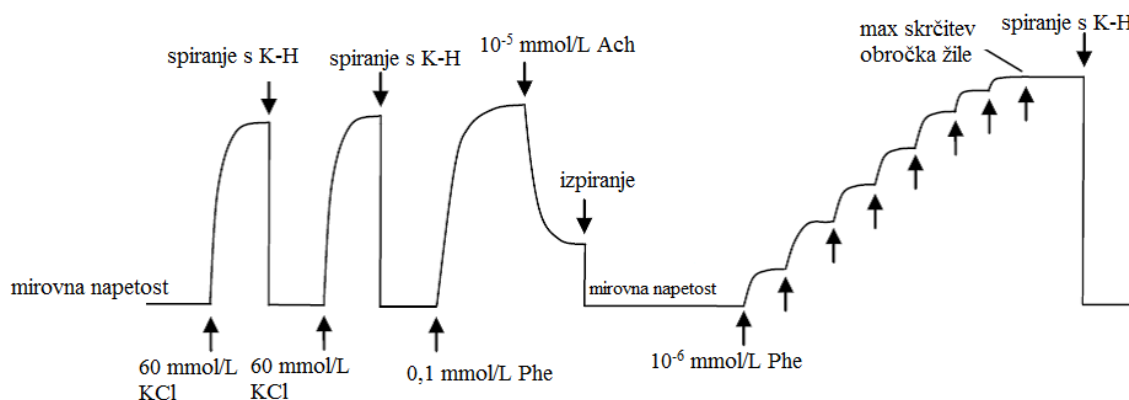
Koncentracija Ach v kiveti [mmol/L]	Odpipetiramo
10^{-5}	100 μ L 10^{-3} mmol/L
10^{-4}	90 μ L 10^{-2} mmol/L
10^{-3}	90 μ L 0,1 mmol/L
10^{-2}	90 μ L 1 mmol/L
0,1	90 μ L 10 mmol/L

3.7.2.2 Meritve sposobnosti skrčitve žilnih obročkov s fenilefrinom

Po doseženi mirovni napetosti smo v kivete z žilnimi obročki postopno dodajali raztopine fenilefrina različnih koncentracij: matično raztopino s koncentracijo 10 mmol/L in njene ustrezne redčitve (tabela VII). Začeli smo z dodatkom raztopine z najnižjo koncentracijo. S kumulativnim dodajanjem ustreznih volumnov smo dosegli končne koncentracije fenilefrina: 10^{-6} ; 10^{-5} ; 10^{-4} ; 10^{-3} ; 10^{-2} ; 0,1 mmol/L. Višjo koncentracijo smo dodali šele, ko je skrčenje doseglo stabilni plato. Tako smo zagotovili postopno skrčitev žilnega obročka in potencialno maksimalno skrčitev pri najvišji koncentraciji fenilefrina (slika 11).

Tabela VII: Protokol kumulativnega dodajanja fenilefrina.

Koncentracija Phe v kiveti [mmol/L]	Odpipetiramo
10^{-6}	100 μ L 10^{-4} mmol/L
10^{-5}	90 μ L 10^{-3} mmol/L
10^{-4}	90 μ L 10^{-2} mmol/L
10^{-3}	90 μ L 0,1 mmol/L
10^{-2}	90 μ L 1 mmol/L
0,1	90 μ L 10 mmol/L



Slika 11: Shematski prikaz poteka poskusa na izoliranih torakalnih aortah buder. Prvi dve krivulji prikazujeta uravnoteženje žilnih obročkov s KCl. Sledi prikaz odzivnosti žilnih obročkov po kumulativnem dodajanju acetilholina (Ach) po predhodni skrčitvi obročkov s fenilefrinom (Phe). Na koncu je prikazana skrčitvena krivulja po kumulativnem dodajanju različnih koncentracij fenilefrina (prikazano s puščicami).

3.7.3 Obdelava podatkov

S pomočjo računalniškega programa za zajem in obdelavo podatkov DeweSoft 6.1 (Dewetron, Trbovlje, Slovenija) smo določili silo izometrične kontrakcije (višino platojev) pri posameznih poskusih. Podatke smo nato statistično in grafično obdelali z računalniškim programom GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, ZDA). Izračunali smo povprečje rezultatov pri posameznih koncentracijah in jih izrazili kot aritmetične sredine s standardnimi napakami ocen aritmetičnih sredin (SEM).

Pri poskusih, kjer smo merili sprostitveni odziv, smo za vsako koncentracijo acetilholina v kiveti izračunali odstotek sprostitve. 100% referenčno vrednost je predstavljala razlika med višino platoja, ki ga je dosegel predhodno skrčen žilni obroček s fenilefrinom, in med mirovnim stanjem. Iz povprečja odzivov pri različnih koncentracijah acetilholina smo izdelali kumulativno koncentracijsko-sprostitveno krivuljo (odvisnost med koncentracijo acetilholina in relaksacijo žile). Za primerjavo rezultatov med skupinami smo uporabili dvofaktorsko analizo variance (two-way ANOVA) in Bonferronijev post hoc test. Pri primerjavi rezultatov je statistično pomembno razliko predstavljala vrednost $p < 0,05$. Izračunali smo tudi površine pod kumulativno koncentracijsko-sprostitveno krivuljo (AUC, area under the curve) ter skupine med seboj primerjali z uporabo enofaktorske

analize variance (one-way ANOVA) in Bonferronijevega post-hoc test. Statistično pomembno razliko je predstavljala vrednost $p < 0,05$.

Izmerjene vrednosti skrčitve pri poskusih s fenilefrinom smo izrazili kot odstotek med maksimalno skrčitvijo in mirovnim stanjem. Iz povprečja odzivov pri različnih koncentracijah fenilefrina smo izdelali kumulativno koncentracijsko-skrčitveno krivuljo (odvisnost med koncentracijo fenilefrina in kontrakcijo žile). Rezultate med skupinami smo primerjali z dvofaktorsko analizo in Bonferronijevim post-hoc testom. Vrednost $p < 0,05$ je predstavljala statistično pomembno razliko. Tudi v tem primeru smo izračunali površine pod kumulativno koncentracijsko-skrčitveno krivuljo (AUC) ter z uporabo enofaktorske analize variance in Bonferronijevega post-hoc testa primerjali skupine med seboj. Pri primerjavi rezultatov je statistično pomembno razliko predstavljala vrednost $p < 0,05$.

3.8 Morfometrija

Del naše raziskave je bilo tudi vrednotenje morfoloških sprememb žil. Uporabili smo izolirane abdominalne aorte vseh buder, ki so bile namenjene za poskus. V ta namen smo žile barvali z raztopino Oil red O, ki smo jo pripravili iz 6 delov raztopine Oil red O osnovne (»stock«) raztopine in 4 delov demineralizirane vode.

Število živali, ki smo jih žrtvovali za morfometrijo, je prikazano v spodnji tabeli (tabela VIII).

Tabela VIII: Število buder, uporabljenih za morfometrično analizo abdominalne aorte.

VRSTA KRME	KLETKA ŠT.	SKUPNO ŠT. ŽIVALI	ŠTEVILO SAMIC	ŠTEVILO SAMCEV
Osnovna krma	1	8	5	3
Aterogena krma (AK)	2	9	6	3
AK + atorvastatin	3	7	2	5
AK + valsartan	4	6	4	2
AK + kombinacija	5	4	1	3

Pred izvedbo morfometrije smo abdominalne aorte za 5-7 dni fiksirali v 10% formalinu. Tik pred pričetkom barvanja smo jih vzdolžno prerezali, 15 min barvali v Oil red O raztopini in zraven ves čas mešali. Pobarvane aorte smo spirali z demineralizirano vodo in vsako posebej fiksirali med dve majhni ploščici pleksi stekla. S pomočjo optičnega bralnika smo naredili digitalne slike pobarvanih aort in jih shranili na računalnik.

Dobljene slike smo nato z uporabo računalniškega programa Adobe Photoshop CS3 Extended povečali in opazovali prisotnost maščobnih leh v lumnu preparata, ki so se kazale kot rdeče pobarvana področja. Označili smo jih s črno obrobo, da so bile bolj prepoznavne. Pri tem smo morali biti pozorni predvsem na to, da nismo tkiva, ki je prosevalo skozi žilo, zamenjali za maščobne lehe. Nato smo s pomočjo programa Image J (Image Processing and Analysis in Java, National Institute of Health, ZDA) izračunali površino leh glede na površino lumna aorte. Da bi se izognili napaki pri umerjanju med posameznimi vzorci, smo med seboj primerjali % površin plakov glede na celoten lumen žile. Rezultate smo za vsako skupino povprečili ter z enofaktorsko analizo variance in Bonferronijevim post-hoc testom primerjali posamezne skupine med seboj. Statistično pomembno razliko je predstavljala vrednost $p < 0,05$.

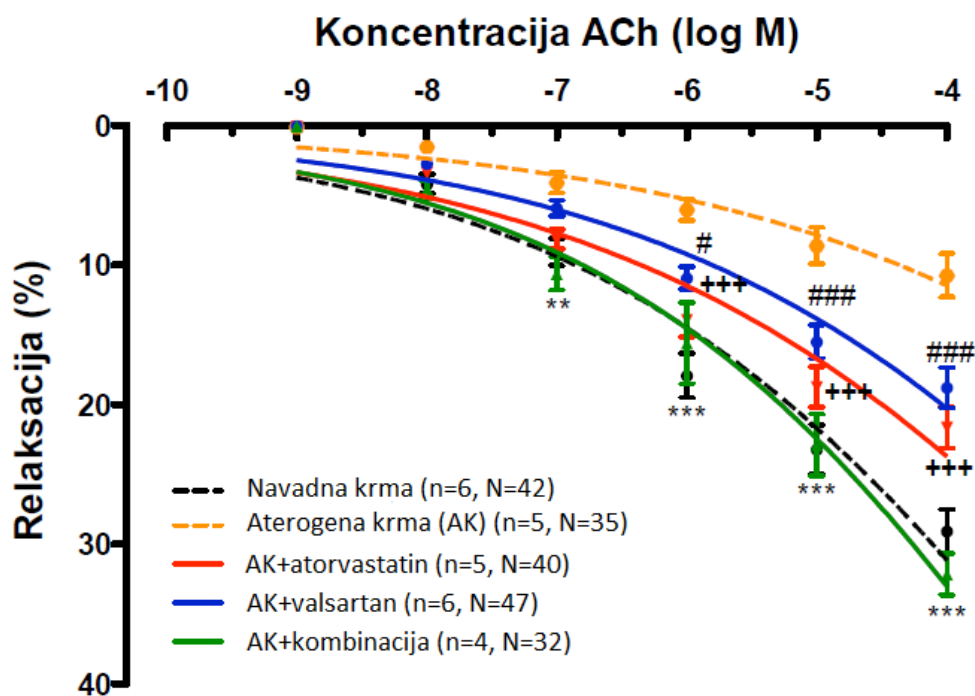
4 REZULTATI

4.1 Poskusi na izoliranih torakalnih aortah buder

4.1.1 Meritve sposobnosti sprostitve žilnih obročkov z acetilholinom

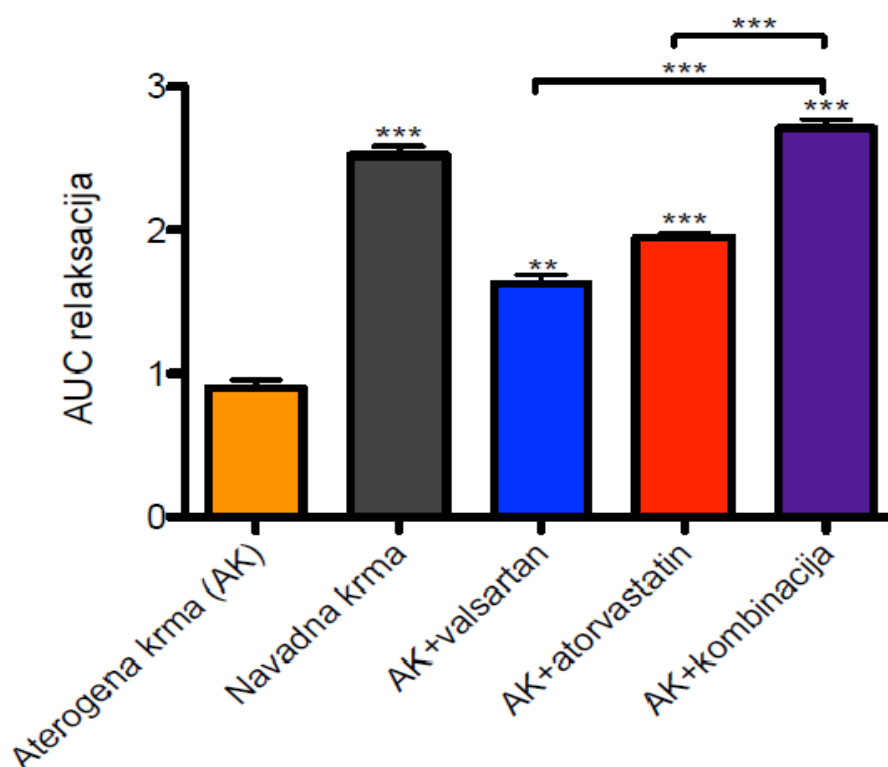
Ugotavljali smo sprostitve žilnih obročkov, predhodno skrčenih s fenilefrinom, pri različnih koncentracijah acetilholina. Rezultate smo prikazali s pomočjo koncentracijsko-relaksacijske krivulje (slika 12). Vključene so bile vse skupine buder (osnovna prehrana, aterogena dieta, aterogena dieta in atorvastatin, aterogena dieta in valsartan, aterogena dieta in kombinacija obeh učinkovin). Izračunali smo tudi površine pod kumulativno koncentracijsko-relaksacijsko krivuljo (AUC) (slika 13).

Primerjava aritmetičnih sredin odzivov pri različnih koncentracijah acetilholina z dvofaktorsko analizo variance (two way ANOVA) in Bonferronijevim post-hoc testom je pokazala, da se koncentracijsko-relaksacijske krivulje vseh petih preiskovanih skupin statistično značilno razlikujejo. Najmanjša sposobnost sprostitve žilnih obročkov je bila pri skupini buder, ki je prejela aterogeno krmo. Dodatek učinkovin k aterogeni krmi je statistično značilno izboljšal % relaksacije glede na aterogeno krmo. Največjo sposobnost sprostitve žilnih obročkov je imela skupina buder, ki je poleg aterogene krme prejela še kombinacijo atorvastatina in valsartana, sledila je skupina, ki je prejela aterogeno krmo z dodatkom atorvastatina. Pri skupini, ki je prejela aterogeno krmo z dodatkom valsartana, smo opazili nekoliko slabšo sposobnost sprostitve žilnih obročkov, a še vedno značilno boljšo v primerjavi z aterogeno krmo. Skupina, ki je prejela osnovno krmo, je imela podobno sposobnost relaksacije kot skupina, ki je prejela aterogeno krmo z dodatkom obeh učinkovin.



Slika 12: Koncentracijsko-relaksacijska krivulja. Prikazana je sprostitve žilnih obročkov (predhodno skrčenih s fenilefrinom) po kumulativnem dodajanju acetilholina. Rezultati so prikazani kot odstotek sprostitve v odvisnosti od logaritma koncentracije acetilholina. Točke na grafu predstavljajo povprečje rezultatov meritev pri posameznih koncentracijah, ki so izraženi kot aritmetične sredine s standardnimi napakami ocen aritmetičnih sredin. Dvofaktorska analiza variance in Bonferronijev post-hoc test: primerjava skupine, ki je prejela aterogeno krmo, s skupino, ki je prejela aterogeno krmo z dodatkom atorvastatina (+++ pomeni $p < 0,001$; ++ pomeni $p < 0,01$; + pomeni $p < 0,05$); primerjava skupine, ki je prejela aterogeno krmo, s skupino, ki je prejela aterogeno krmo z dodatkom valsartana (### pomeni $p < 0,001$; ## pomeni $p < 0,01$; # pomeni $p < 0,05$) in primerjava skupine, ki je prejela aterogeno krmo, s skupino, ki je prejela kombinacijo obeh učinkovin (***) pomeni $p < 0,001$; ** pomeni $p < 0,01$; * pomeni $p < 0,05$). Statistično pomembno razliko je predstavljala vrednost $p < 0,05$. Legenda: n-število živali, ki smo jih uporabili za poskuse na izoliranih torakalnih aortah, N-število uporabljenih žilnih obročkov, ki smo jih izolirali iz živali.

Podobne rezultate je dala tudi primerjava površin pod krivuljami z enofaktorsko analizo variance (one way ANOVA) in Bonferronijevim post-hoc testom. Opazili smo statistično značilno izboljšanje relaksacije pri dodatku učinkovin k aterogeni krmi v primerjavi s samo aterogeno krmo. Dodatek valsartana k aterogeni krmi je 1,8-krat izboljšal sprostitvev žil v primerjavi z aterogeno krmo, dodatek atorvastatina 2,2-krat in kombinacija obeh učinkovin 3-krat. Opazili pa smo tudi statistično značilne razlike med posameznimi učinkovinami. V skupini, ki je poleg aterogene krme prejela kombinacijo atorvastatina in valsartana, smo ugotovili 1,4-kratno izboljšanje relaksacije v primerjavi s skupino, ki je prejela aterogeno krmo z dodatkom atorvastatina, in 1,7-kratno izboljšanje v primerjavi s skupino, ki je prejela aterogeno krmo z dodatkom valsartana. Žile buder, ki so prejemale navadno krmo, se v primerjavi z žilami buder, ki so prejemale aterogeno krmo, 2,8-krat boljše sproščajo. Sprostitvev je bila v skupini, ki je prejela aterogeno krmo z dodatkom obeh učinkovin, boljše v primerjavi s skupino z osnovno krmo, vendar razlika ni bila statistično značilna.

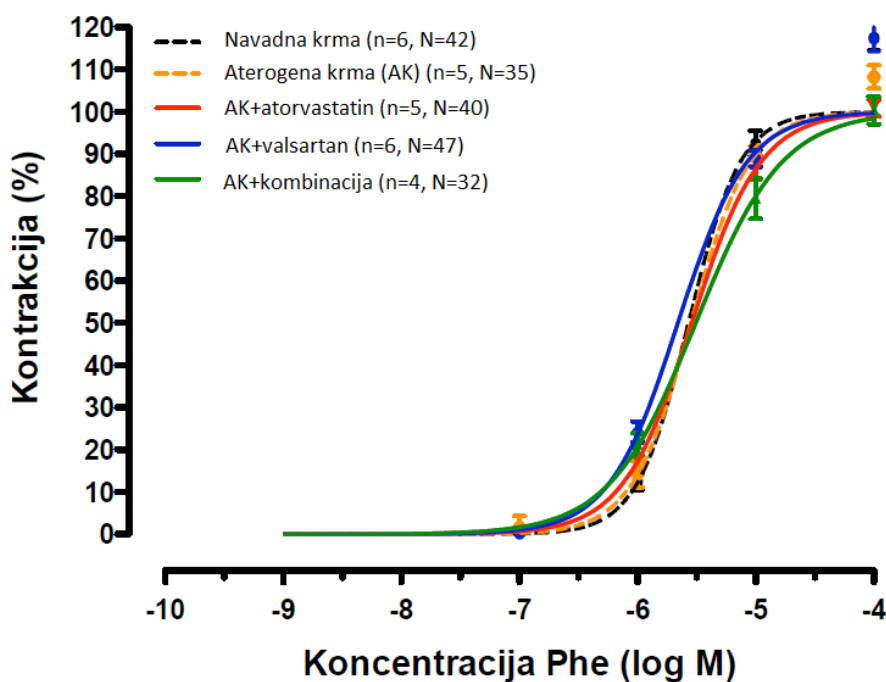


Slika 13: Prikaz površin pod koncentracijsko-relaksacijsko krivuljo, od koncentracije acetilholina 10^{-9} do 10^{-4} M. Statistično pomembno razliko je predstavljala vrednost $p < 0,05$ (*** pomeni $p < 0,001$; ** pomeni $p < 0,01$; * pomeni $p < 0,05$).

4.1.2 Meritve sposobnosti skrčitve žilnih obročkov s fenilefrinom

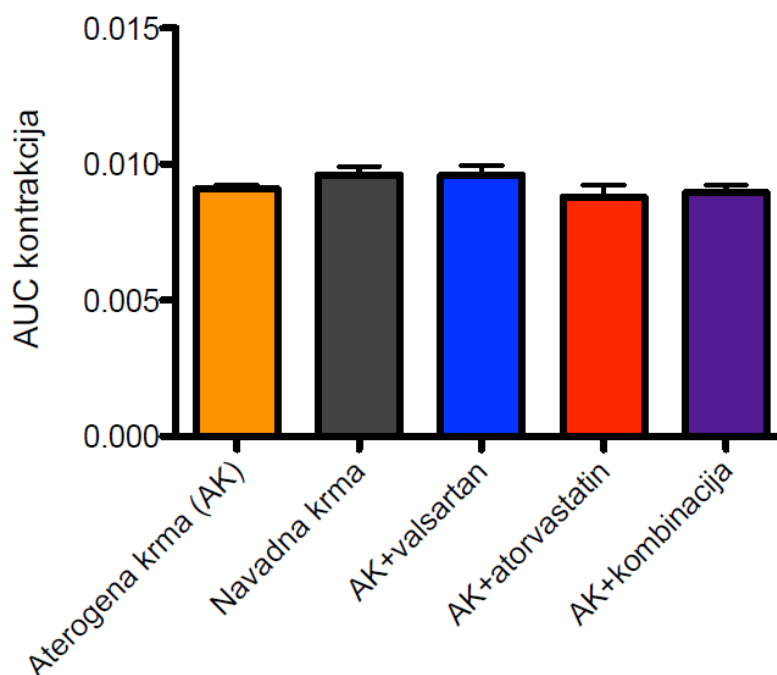
Ugotavljali smo krčenje žilnih obročkov v odvisnosti od koncentracije fenilefrina. Ugotovitve smo prikazali s pomočjo koncentracijsko-skrčitvene krivulje (Slika 14). Vključili smo vseh pet skupin buder (osnovna krma, aterogena dieta, aterogena dieta in atorvastatin, aterogena dieta in valsartan, aterogena dieta in kombinacija obeh učinkovin). Izračunali smo tudi površine pod kumulativno koncentracijsko-skrčitveno krivuljo (AUC) (slika 15).

Primerjava aritmetičnih sredin odzivov pri različnih koncentracijah fenilefrina z dvofaktorsko analizo variance (two way ANOVA) in Bonferronijevim post-hoc testom je pokazala, da se koncentracijsko-skrčitvene krivulje vseh petih preiskovanih skupin statistično značilno ne razlikujejo.



Slika 14: Koncentracijsko-skrčitvena krivulja. Prikazana je skrčitev žilnih obročkov po kumulativnem dodajanju fenilefrina. Rezultati so prikazani kot odstotek skrčitve v odvisnosti od logaritma koncentracije fenilefrina. Uporabljena statistična testa: dvofaktorska analiza variance in Bonferronijev post-hoc test. Legenda: n-število živali, ki smo jih uporabili za poskuse na izoliranih torakalnih aortah, N-število uporabljenih žilnih obročkov.

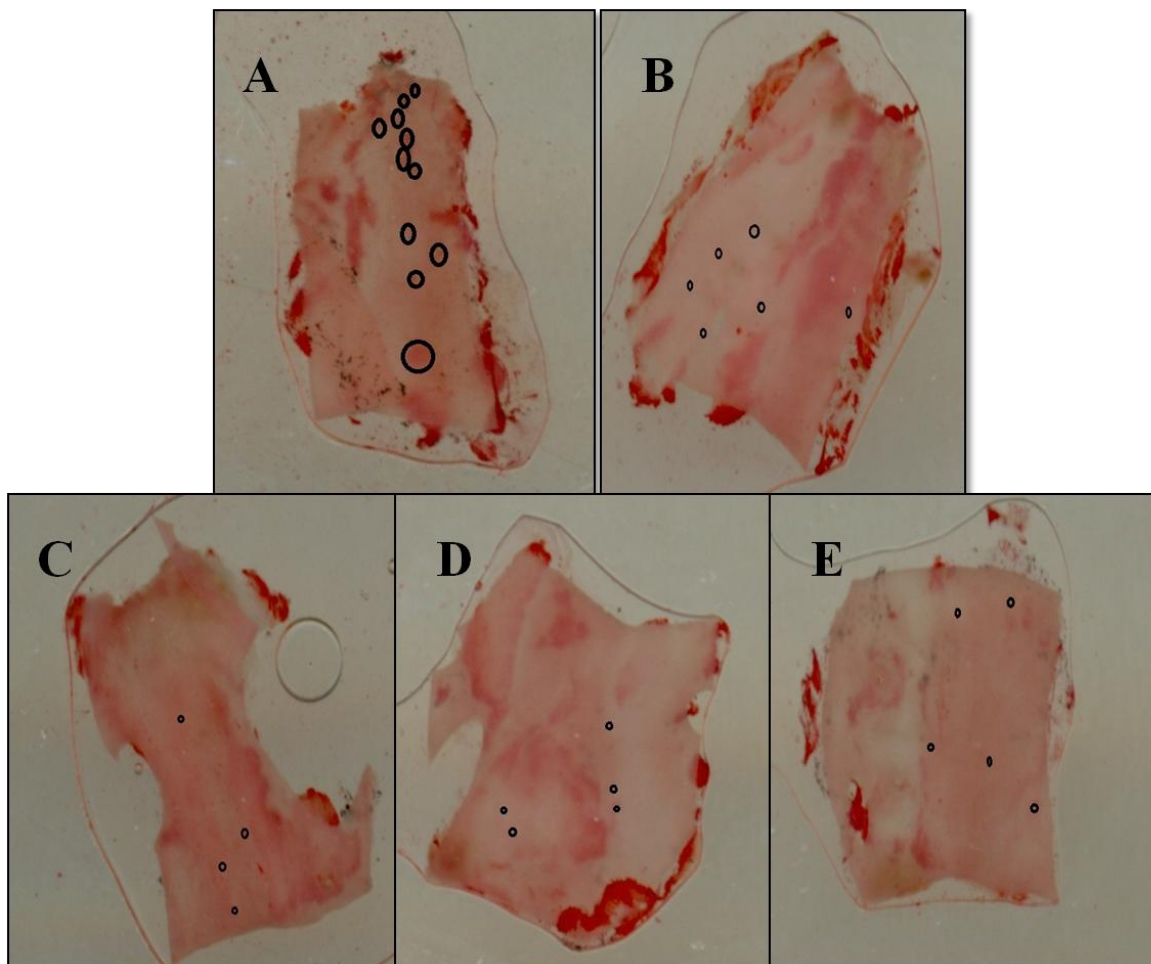
Podobne rezultate je dala tudi primerjava površin pod krivuljami z enofaktorsko analizo variance (one way ANOVA) in Bonferronijevim post-hoc testom. Med posameznimi skupinami ni opaziti statistično značilnih razlik v kontrakciji.



Slika 15: Prikaz površin pod koncentracijsko-skrčitveno krivuljo.

4.2 Morfometrija

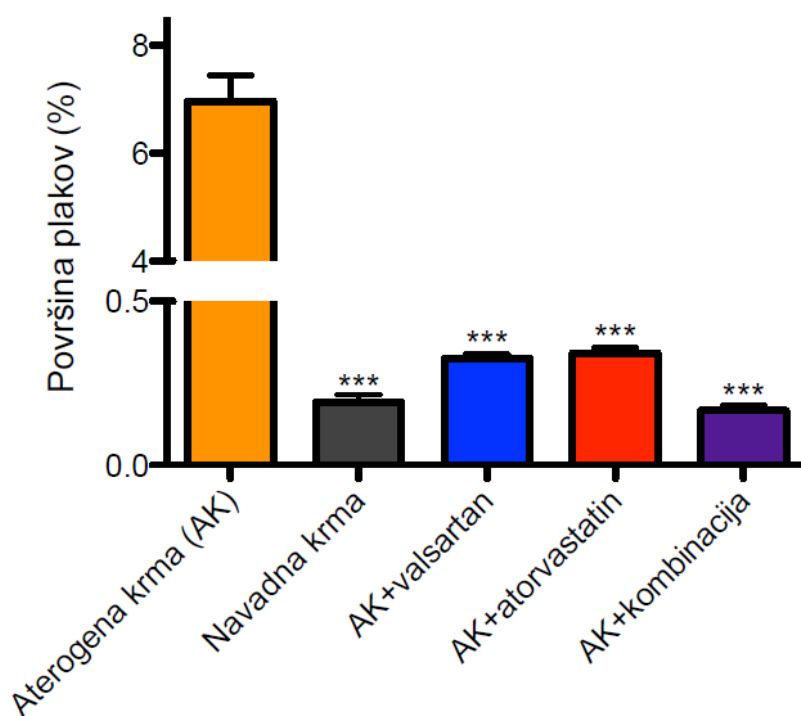
Z raztopino Oil Red O smo barvali lumen vzdolžno prerezanih abdominalnih aort pri vseh petih skupinah buder (osnovna prehrana, aterogena dieta, aterogena dieta in atorvastatin, aterogena dieta in valsartan, aterogena dieta in kombinacija obeh učinkovin). Opazovali smo prisotne maščobne lehe, ki so se obarvale rdeče (slika 16).



Slika 16: Z raztopino Oil Red O barvane vzdolžno prerezane abdominalne aorte buder.

A: slika abdominalne aorte budre, krmljene z aterogeno krmo. **B:** slika abdominalne aorte budre, krmljene z osnovno krmo. **C:** slika abdominalne aorte budre, krmljene z aterogeno krmo z dodatkom atorvastatina. **D:** slika abdominalne aorte budre, krmljene z aterogeno krmo z dodatkom valsartana. **E:** slika abdominalne aorte budre, krmljene z aterogeno krmo z dodatkom atorvastatina in valsartana. Prisotne maščobne lehe v lumnu aorte so obkrožene s črno barvo.

Primerjali smo povprečje deležev površin leh glede na celotno površino aorte med skupinami z enofaktorsko analizo variance in Bonferronijevim post-hoc testom ter ugotovili, da je prišlo med skupinami do statistično značilnih razlik (slika 17). Največjo površino so zavzele lehe pri skupini, krmljeni z aterogeno dieto, najmanjšo pa pri skupini, ki je prejela aterogeno krmo z dodatkom kombinacije atorvastatina in valsartana. Pri slednji smo opazili 42-krat manj leh v primerjavi s skupino, krmljeno z aterogeno dieto. Pri skupinah, krmljenih z aterogeno dieto z dodatkom ene izmed učinkovin (ali atorvastatina ali valsartana), smo opazili podoben delež površin leh glede na celotno površino aorte. Površina leh je bila približno 20-krat manjša v primerjavi z aterogeno krmo. Pri skupini, ki je prejela navadno krmo, je bila površina leh v povprečju malo večja kot pri skupini, krmljeni z aterogeno dieto z dodatkom kombinacije obeh učinkovin.



Slika 17: Statistična primerjava površin maščobnih leh med posameznimi skupinami buder. Uporabljeni statistični testi: enofaktorska analiza variance in Bonferronijev post-hoc test. Statistično značilno razliko predstavlja $p < 0,05$ (***) pomeni $p < 0,001$.

5 RAZPRAVA

V naši raziskavi smo preučevali, ali lahko z dodatkom atorvastatina in/ali valsartana k aterogeni dieti preprečimo oz. zmanjšamo funkcionalne in morfološke spremembe aorte buder, ki nastanejo kot posledica kroničnega krmljenja z aterogeno krmo.

5.1 Razprava o materialih in metodah

5.1.1 Sestavine, uporabljene za pripravo krme

5.1.1.1 Aterogena krma

Za induciranje funkcionalnih in morfoloških sprememb arterij smo uporabili enako sestavo aterogene krme, ki se je v prejšnjih poskusih izkazala za najbolj učinkovito (49). V omenjenih poskusih so s preizkušanjem pripravili obstojno proaterogeno krmo, ki je v kratkem času povzročila nastajanje maščobnih leh, kar so potrdili z morfometrično analizo in analizo histoloških preparatov žil. Primernost take krme nam je uspelo potrditi, saj smo spremembe na žilah inducirali že v osmih tednih.

Maščobe, holesterol in ogljikovi hidrati, ki smo jih vključili v aterogeno dieto, povzročajo zvišanje holesterola in trigliceridov v krvi. Holesterol in nasičene maščobe živalskega izvora predstavljajo glavni vzrok za dvig LDL, prekomerna kalorijska hrana in vnos ogljikovih hidratov pa povečajo sintezo VLDL. Hiperlipidemija in zlasti hiperholesterolemija sta ena glavnih dejavnikov tveganja za razvoj ateroskleroze. Hiperholesterolemija sodeluje pri okvari, zaradi katere žilna stena izgubi antiagregacijske lastnosti, postane bolj dovzetna za adhezijo trombocitov in preobčutljiva za vazokonstriksijske dražljaje, ne odziva pa se na vazodilatacijske dražljaje (11). Spremenjeno žilno občutljivost je mogoče zaznati še pred morfološkimi spremembami žilne stene. V obsežni, 10 let trajajoči klinični raziskavi MRFIT (Multiple risk factor intervention trial) so na velikem številu oseb ugotovili, da je povezanost ateroskleroze z vrednostjo holesterola v serumu zvezna. Čim višja je vrednost serumske vrednosti holesterola, tem večje je tveganje za razvoj ateroskleroze (51).

Kljub temu, da smo v času 8-tedenskega krmljenja z aterogeno dieto uspeli povzročiti zaznavne funkcionalne in morfološke spremembe na arterijah buder, bi bilo smiselno, da bi krmljenje trajalo dlje časa, saj bi najverjetneje nastale izrazitejše spremembe. Ker smo bili

časovno omejeni, smo se odločili za tak časovni razpon, ki je vseeno omogočil uspešno izvedbo poskusa.

Poleg prehransko induciranih sprememb obstajajo tudi druge metode za induciranje ateroskleroze: kemične (vnos kemičnih agensov, ki poškodujejo žilo), mehanske (vstavitve balonskega katetra v žilo ali obročka okrog žile) in laserske. Te metode so omejene le na poškodbo ene žile, prednost aterogene krme pred temi metodami pa je, da povzroči sistemske učinke in tako je več žil uporabnih za raziskavo. V raziskavah se najpogosteje uporablja induciranje z ustrezno prehrano, saj se tako najbolj približamo realnemu procesu ateroskleroze. Ostale metode se običajno uporabljajo kot dodatek k aterogeni dieti za induciranje bolj izrazitih sprememb. V naši raziskavi se za dodatno indukcijo nismo odločili.

5.1.1.2 Atorvastatin

Atorvastatin je učinkovina sinteznega izvora, ki se uporablja v obliki kalcijeve soli. Gre za lipofilni statin, ki v primerjavi s hidrofilnimi statini bolje prehaja endotelijske celice s pasivno difuzijo in je zato odgovoren tudi za ekstrahepatične učinke. Za našo raziskavo so pomembni predvsem pleiotropni učinki atorvastatina, za katere se je izkazalo, da se pojavijo zelo hitro po uvedbi terapije s statini, še pred njihovimi opaznimi učinki na znižanje serumskih vrednosti holesterola. Statini izboljšajo endotelijsko funkcijo z delovanjem na presnovo dušikovega oksida, povečajo stabilnost aterosklerotičnih plakov, zmanjšujejo oksidativni stres in vnetje ter zmanjšujejo agregacijo trombocitov, tudi v prisotnosti dejavnikov tveganja za nastanek ateroskleroze. Osredotočili smo se na ugodne učinke atorvastatina na delovanje endotelija, drugih učinkov pa neposredno nismo merili. Okrnjeno delovanje endotelija je namreč začetni stadij ateroskleroze, še preden se pojavijo ostali klinično zaznavni znaki bolezni. Hiperholesterolemija endotelijsko disfunkcijo še poslabša, saj se zmanjšata sinteza in aktivnost NO, ki ima ključno vlogo v sprostitvenem odzivu žil. Atorvastatin poveča sintezo NO preko aktivacije eNOS, hkrati pa zmanjša ekspresijo endotelina-1, ki ima vazokonstriktorno delovanje. Ugodni učinki na endotelijsko funkcijo se kažejo tudi zaradi njegovega antioksidantnega delovanja, zmanjšuje namreč nastajanje reaktivnih kisikovih vrst, ki so odgovorni za oksidacijo LDL delcev in tvorbo penastih celic. Sicer že samo znižanje LDL izboljša funkcijo endotelija, saj se v njem zmanjša stopnja vnetja in aktivacija levkocitov. Navedeni učinki se pojavijo že pri nizkih odmerkih učinkovine (52).

Delovanje atorvastatina na srčno-žilni sistem so preučevali v številnih raziskavah, vse od njegove sinteze leta 1985. Spojina se je izkazala za učinkovito tako pri živalih kot tudi pri ljudeh. V Krkini lastni raziskavi se je endotelijska funkcija pri bolnikih z ishemično boleznijo srca po 12 tednih zdravljenja z atorvastatinom v odmerkih 10-20 mg na dan izboljšala za 40-51%, prožnost žilne stene se je po 24 tednih povečala za 43-45%, njena togost pa se je zmanjšala za 23-26% (53). Naše ugotovitve so v skladu z rezultati teh raziskav.

5.1.1.3 Valsartan

Čeprav se valsartan primarno uporablja zaradi vpliva na krvni tlak, pa smo se v naši raziskavi osredotočili na njegove pleiotropne učinke, predvsem na delovanje endotelija. Z zaviranjem angiotenzinskih receptorjev tipa A₁ zmanjšuje škodljive učinke angiotenzina II na srčno-žilni sistem. Angiotenzin II je vpleten v vnetno dogajanje v žilni steni, oksidativni stres, spremembe endotelijske funkcije in celično proliferacijo, kar vpliva na tkivno preoblikovanje žilne stene. Izzove adhezijo monocitov in levkocitov na endotelijske celice, zaradi zvečane ekspresije gena za MCP-1 pa je pospešeno vstopanje monocitov v intimo žilne stene (54, 55).

Od leta 1997 do 2009 so preučevali vpliv valsartana v več kot 60 kliničnih študijah, v katere je bilo vključenih več kot 100.000 pacientov. Izsledki številnih raziskav kažejo, da zdravljenje z valsartanom značilno zmanjša obolevnost za srčno-žilnimi boleznimi in umrljivost zaradi srčnega popuščanja, zmanjšana pa je tudi incidenca možganske kapi (55). V študiji VALIANT so dokazali zmanjšanje pojavnosti srčno-žilnih dogodkov za 48 % po terapiji z valsartanom (56). Študije na hipertenzivnih podganah so pokazale, da nizki odmerki valsartana sicer nimajo vpliva na znižanje krvnega tlaka, izboljšajo pa srčno in žilno funkcijo (57).

Valsartan zmanjša serumske vrednosti CRP in oksidiranih LDL delcev, ki so povezani z od angiotenzina II odvisno endotelijsko disfunkcijo in predstavljajo pomemben dejavnik tveganja za razvoj srčno-žilnih bolezni. Ker je CRP direktni pokazatelj vnetnega procesa v organizmu, lahko sklepamo, da ima valsartan tudi protivnetno delovanje (55).

5.1.2 Poskusne živali

Za preučevanje ateroskleroze se uporabljajo številni živalski modeli. Čeprav s poskusi na živalih ni možno natančno oponašati poteka ateroskleroze pri ljudeh, je z njihovo pomočjo

naše razumevanje mehanizmov, ki so vpleteni v proces ateroskleroze, izrazito napredovalo, ponudile pa so se tudi nove možnosti terapijskega pristopa. Preučevanje vpliva novih učinkovin na ustreznem živalskem modelu (in vivo, in vitro, v različnih stopnjah napredovanja aterosklerotičnega procesa) je ključnega pomena. Idealen živalski model, ki bi popolnoma posnemal nastanek ateroskleroze pri človeku, ne obstaja, vsi modeli imajo tako prednosti kot pomanjkljivosti (40). Pomembno je predvsem to, da jim lahko s prehrano ali s katero drugo metodo induciramo zaznavne aterosklerotične spremembe in okrnjeno delovanje endotelija. V ta namen se najpogosteje uporabljajo glodavci (miši, predvsem gensko spremenjene, podgane, hrčki, budre) in zajci. Njihova prednost je predvsem, da ob ustrezni dieti v kratkem času razvijejo aterosklerotične spremembe, njihovo vzdrževanje in rokovanje z njimi pa je dokaj enostavno. Za preučevanje ateroskleroze se uporabljajo tudi ptiči, psi in celo nižji organizmi (črvi, muhe, ribe), vendar manj pogosto. Človeškemu organizmu najbolj podoben živalski model so prašiči in primati (42).

V naši raziskavi smo uporabili budre reje Dunkin Hartley (DHN) obeh spolov, saj so se v predhodnih poskusih izkazale kot dober model za preučevanje aterosklerotičnih procesov. V kratkem času jim je možno s prehrano inducirati aterosklerotične spremembe, poleg tega pa imajo tudi lipoproteinski profil precej podoben človeškemu. Njihova slabost v primerjavi z manjšimi živalskimi modeli je, da zaradi velikosti potrebujejo več prostora in hrane za vzrejo, zahtevnejše je tudi rokovanje z njimi. Nekoliko težja je tudi izolacija tkiv (npr. aorte v našem primeru). Iz literaturnih podatkov vemo, da vnos hrane, bogate s holesterolom, povzroči kopičenje holesterola v arterijah buder. Kljub povišanemu vnosu holesterola pa lahko z določeno vrsto hrane, predvsem z vlakninami, ali z učinkovinami zmanjšamo to kopičenje (41).

Živali smo razdelili v pet skupin obeh spolov. Prva skupina je prejela osnovno krmo, druga aterogeno krmo, tretja aterogeno krmo z dodatkom atorvastatina, četrta aterogeno krmo z dodatkom valsartana ter peta skupina aterogeno krmo z dodatkom kombinacije obeh učinkovin. Ker so vse skupine bivale v enakem okolju, s konstantno temperaturo, vlažnostjo in menjavo svetlobe, lahko izločimo vpliv okolja na razvoj bolezni. Vse živali so imele na razpolago neomejeno količino hrane. Slabost takega načina krmljenja je, da lahko nekatere živali zaužijejo več krme, v primeru dodane učinkovine tudi večje količine učinkovine, druge pa manj. Poskus bi bil bolj kontroliran, če bi vsaki budri posebej per os

aplicirali učinkovino. Tako bi zagotovili, da bi vsaka budra zaužila enako količino učinkovine. Primerna metoda za ponavljajoče kontrolirano dovajanje učinkovin bi bila tudi intragastrična aplikacija z uporabo osmozne črpalke. Vendar bi tak način krmljenja zahteval precej več našega časa in truda, budre pa bi s tem izpostavili dodatnemu stresu. Uporabili smo majhno količino učinkovin in možno je, da se le-ta ni enakomerno porazdelila med aterogeno krmo. To pomeni, da je količina zaužite učinkovine med budrami lahko variirala ne samo glede na količino zaužite krme, ampak tudi na vsebnost učinkovine v krmi. Poraba krme pri vseh živalih ni bila enaka. Ker so budre rastlinojede živali, je možno, da jim okus hrane ni ustrezal oz. da je nekaterim budram ustrezal bolj kot drugim. Poleg tega so učinkovine precej grenkega okusa, če niso vgrajene v farmacevtsko obliko. S tem lahko delno pojasnimo, zakaj je bila povprečna poraba krme najmanjša pri skupini, ki je prejela kombinacijo obeh učinkovin.

Za raziskave funkcionalnih in morfoloških sprememb smo uporabili izolirane organe budre, natančneje izolirani abdominalno in torakalno aorto. Proces ateroskleroze zgodaj prizadene aorto, zato je le-ta najpogosteje uporabljen model za preučevanje razvoja aterosklerotičnih sprememb. Iz torakalne aorte smo pripravili žilne obročke in opazovali njihovo odzivnost ob dodatku različnih koncentracij vazokonstriktorja in vazodilatatorja. V razmerah *in vitro* so prekinjene nevrološke povezave organov z osrednjim živčevjem, ni humoralne regulacije in delovanja povratnih zank med posameznimi organi in organskimi sistemi. Prednost takšnih poskusov je, da lahko nadziramo koncentracijo preučevane substance na mestu delovanja, t.j. ob receptorju, in tako najboljše prikažemo odnos med koncentracijo substance in učinkom (58). Z namenom vzdrževanja aktivnosti izoliranega organa smo žilne obročke med poskusom potopili v hranilno raztopino ustrezne sestave (ioni, hranivo), z ustreznim pH (7,4) in temperaturo ($37,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Hranilno raztopino smo vseskozi prepihovali s plinsko mešanico s 95% CO₂ in 5% O₂ ter s tem zagotavljali zadostno oksigenacijo izoliranih žil. O izrednem pomenu vzdrževanja pogojev za preživetje izoliranega tkiva smo se prepričali med samo izvedbo poskusa. Zgodilo se je, da smo pred namestitvijo žilnih obročkov v napravo za poskuse na izoliranih žilah pozabili vklopiti toplotno črpalko, ki vzdržuje konstantno temperaturo hranilne raztopine, naslednjič pa nam je med izvedbo poskusa zmanjkalo plinske mešanice za oksigenacijo tkiva. V obeh primerih smo dobili nepričakovane rezultate, ki so odstopali od sicer

dobljenih odzivov. Meritve smo obakrat izvedli ponovno, tokrat pri izpolnjenih pogojih, ter dobili odzive v skladu s pričakovanji.

Priprava živali in izolacija žil je bila vedno enaka, hitra in standardizirana. Za evtanazijo živali smo uporabili CO₂. Metoda je enostavna, hitra in neboleča. CO₂ nima vpliva na nadaljnje raziskave na žilah buder. Po evtanaziji smo budram intraperitonealno (v trebušno votlino) injicirali heparin, ki je preprečil strjevanje krvi. Kri nas pri izolaciji žil ni ovirala, saj smo žival takoj na začetku izolacije izkrvaveli. S tem smo se izognili tudi napakam pri določanju maščobnih plakov, saj bi jih odvečna kri lahko prekrila.

V podobnih raziskavah so budram pred začetkom poskusa opravili ultrazvok žil, s katerim so preverili stanje žil. Lahko bi opravili tudi nekatere laboratorijske preiskave, npr. odvzem krvi na začetku in na koncu hranjenja z aterogeno dieto ter določiti serumske vrednosti celokupnega holesterola, HDL, LDL in trigliceridov. Izsledki raziskav kažejo, da imajo budre ob uživanju večjih količin holesterola povišane serumske vrednosti trigliceridov, celokupnega holesterola in LDL holesterola ter povišano število majhnih LDL delcev, ki so bolj aterogeni. Vrednosti HDL, ki ga označujemo kot »dober« holesterol, saj na žilje deluje varovalno, pa so bile nižje v primerjavi s kontrolno skupino (44).

Budre so dober model za preučevanje vpliva spola in hormonov na lipoproteinski profil. Vpliv spola na nastanek sprememb na žilah buder nismo posebej preučevali. Število samcev in samic, uporabljenih v poskusu, ni bilo enako pri posameznih skupinah. Obstaja možnost, da so bili rezultati v skupinah, kjer je bilo več samic (t.j. pri skupini, ki je prejela aterogeno dieto z dodatkom valsartana), zato boljši, saj iz literaturnih podatkov vemo, da ima estrogen zaščitno delovanje na srčno-žilni sistem in zavira nastajanje aterosklerotičnih sprememb (46, 60). Sklepamo, da starost živali na rezultate ni vplivala, saj so bile budre ob vključitvi v poskus stare med 5 in 8 mesecev.

Genske ekspresije kljub odvzetim vzorcem nismo izvedli. Vzorce smo shranili za nadaljnjo obravnavo. Genska ekspresija bi nam dala podatke o genetski podvrženosti buder, ki predstavlja pomemben dejavnik tveganja za razvoj ateroskleroze. Lahko bi preučevali ekspresijo genov za specifične markerje za aterosklerozo (VCAM-1, MCP-1, MMP-9, PAI-1), npr. z uporabo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (RT-PCR, *ang. real-time Polymerase Chain Reaction*) (59).

5.2 Razprava o rezultatih

5.2.1 Poskusi na izoliranih torakalnih aortah buder

S poskusi na žilnih obročkih smo želeli preveriti prehransko inducirane funkcionalne spremembe arterij buder, in sicer odzivnost žil ob dodatku različnih koncentracij vazokonstriktorja in vazodilatatorja. S tem smo preverjali delovanje endotelija, saj obe omenjeni vazoaktivni snovi povzročata kontrakcijo oz. relaksacijo, ki je odvisna od endotelija. Ugotavljali smo, ali lahko z dodatkom atorvastatina, valsartana ali kombinacije obeh učinkovin, dodanih k aterogeni dieti, izboljšamo žilno funkcijo oz. zmanjšamo nastanek funkcionalnih sprememb arterij. Te spremembe lahko opazimo kot zmanjšan sprostitevni odziv žil na acetilholin. Odziv žilnih obročkov je odvisen od endotelija, gladkih mišičnih celic in premera žilnih obročkov. V primeru patoloških sprememb, ki prizadenejo sloj gladkih mišičnih celic ali endotelij, lahko pa spremenijo tudi premer žile, je odziv žil zmanjšan. Na odzivnost žil pa vpliva tudi koncentracija vazokonstriktorja oz. vazodilatatorja.

Žilne obročke torakalnih aort smo najprej skrčili s KCl. S tem smo preverili odzivnost uravnoteženih žilnih obročkov, saj je delovanje KCl neodvisno od endotelija in receptorjev. KCl povzroča depolarizacijo membrane gladkomišičnih celic žil, napetostno odvisni Ca^{2+} kanali na sarkolemi se odprejo, koncentracija Ca^{2+} v celici naraste in posledično se gladka mišica skrči (61).

5.2.1.1 Sposobnost sprostitve žilnih obročkov z acetilholinom

Preverjali smo sprostitevni odziv žilnih obročkov v odvisnosti od koncentracije acetilholina. Iz koncentracijsko-sprostitvene krivulje (slika 12) je razvidno, da so se žilni obročki, predhodno skrčeni s fenilefrinom, pri vseh petih skupinah sprostiti po kumulativnem dodajanju acetilholina. Odstotek relaksacije je bil odvisen od koncentracije acetilholina in od tega, katero skupino buder smo preučevali. Z uporabo dvofaktorske analize variance in Bonferronijevega post-hoc testa smo pokazali, da se skupine med seboj statistično značilno razlikujejo. Ugotovili smo, da dodatek učinkovin k aterogeni krmi izboljša žilno funkcijo arterij. Potrdili smo tudi, da ima kombinacija obeh učinkovin močnejši učinek na sprostitvev žilnih obročkov kot pa posamezni učinkovini. Najboljši sprostitevni odziv so imeli žilni obročki buder, ki so bile hranjene z navadno krmo in tiste, ki so poleg aterogene krme prejemale še kombinacijo atorvastatina in valsartana. Nekoliko

slabši odziv smo opazili pri skupini, ki je prejela aterogeno krmo z dodatkom atorvastatina, in pri skupini, ki je bila krmljena z aterogeno krmo in valsartanom. Najslabše so se relaksirali žilni obročki buder, ki so prejemale le aterogeno krmo. Statistično značilne razlike v sprostitvenem odzivu opazimo pri koncentracijah acetilholina 10^{-6} , 10^{-5} in 10^{-4} mol/L, med skupino, ki je prejela aterogeno krmo in skupino, ki je prejela aterogeno krmo z dodatkom obeh učinkovin, pa že pri koncentraciji acetilholina 10^{-7} mol/L.

Podobne rezultate je dala tudi primerjava površin pod krivuljo z enofaktorsko analizo variance in Bonferronijevim post-hoc testom (slika 13). Opazili smo, da se vse skupine statistično značilno razlikujejo glede na skupino, ki je prejela aterogeno krmo. Značilne razlike pa so tudi med posameznima učinkovinama in kombinacijo obeh učinkovin, slednja bolje relaksira žilne obročke kot vsaka učinkovina posebej. Atorvastatin v primerjavi z valsartanom izboljša odstotek relaksacije žilnih obročkov, vendar razlika ni statistično značilna.

Pričakovali smo, da bo imela skupina buder, kronično krmljena z aterogeno dieto, slabšo žilno odzivnost. Slabša odzivnost žil je posledica funkcionalnih sprememb žil, ki smo jih želeli dokazati. Med najzgodnejše funkcionalne spremembe arterij, ki predstavljajo predstopnjo procesa ateroskleroze in jih lahko izmerimo, spada okrnjeno delovanje endotelija, ki se med drugim kaže tudi v zmanjšani razpoložljivosti NO. Endotelijska disfunkcija predstavlja motnjo razširitvene sposobnosti arterij, okvaro antiagregacijskih lastnosti endotelija in večjo prepustnost za vnetne celice ter maščobe. Je tako posledica dejavnikov tveganja kot tudi samostojni dejavnik tveganja, ki pospešuje razvoj aterosklerotičnih sprememb in lahko druge dejavnike tudi poslabša.

Sprostitvene odzive žilnih obročkov aort različnih živalskih modelov po dodatku obravnavanih učinkovin so ugotavljali in dokazali v številnih raziskavah. Naše ugotovitve se ujemajo z rezultati teh raziskav. Te študije nam pomagajo razumeti mehanizme, zaradi katerih pride do različnih sprostitvenih odzivov. Vecchione in Brandes sta preučevala vpliv statinov na endotelijsko odvisno relaksacijo žil pri miših. Mišim so v podkožje 10 dni zaporedoma dajali injekcije cerivastatina (2mg/kg/dan), atorvastatina (1 mg/kg/dan in 10 mg/kg/dan) in placebo. Ugotovila sta, da se relaksacija žilnih obročkov takoj po terapiji s statini značilno izboljša v primerjavi s kontrolno skupino. Po odtegnitvi terapije s statini je bila zmanjšana razpoložljivost NO. Ugotovila sta še, da dodatek antioksidanta ohrani sprostitvev žilnih obročkov po odtegnitvi terapije s statini. Atorvastatin je povzročil boljšo

relaksacijo žil v primerjavi s cerivastatinom. Večji odstotek relaksacije je bil pri večjem odmerku atorvastatina, statistično značilne razlike pa so se pojavile že pri nižjem odmerku atorvastatina v primerjavi s kontrolno skupino (62). Bhola in sodelavci so raziskovali vpliv kantaridina (naravna substanca, ki jo izločajo nekatere vrste hroščev, med drugim španska muha) na sprostitveni odziv žilnih obročkov podganje aorte, v raziskavi pa so kot standardno učinkovino za izboljšanje žilne funkcije uporabili tudi atorvastatin. Podgane so bile 4 tedne krmljene s krmo, bogato s holesterolom, z namenom, da bi inducirali hiperholesterolemijo. Hiperholesterolemija je eden glavnih dejavnikov tveganja za okvaro delovanja endotelija. Endotelijska disfunkcija je posledica zmanjšane aktivacije endotelijske NOS in biološke razpoložljivosti NO ter povečane sinteze reaktivnih kisikovih zvrsti. Atorvastatin je izboljšal sprostitiv žilnih obročkov, dokazali pa so tudi značilno zmanjšanje vpliva krme z visoko vsebnostjo holesterola na lipidni profil po dodatku te učinkovine (63). Podobne izsledke o ugodnem delovanju atorvastatina na sprostitveni odziv žilnih obročkov dajejo tudi študije na dislipidemičnih zajcih. Posledica visokega vnosa holesterola je zmanjšana integriteta žilnega endotelija, ki pa jo atorvastatin ohrani (64). Novejše raziskave so pokazale, da atorvastatin ohrani relaksacijo žilnih obročkov torakalne aorte in pljučne arterije pri podganah, ki so jim inducirali sepsa. Sepsa namreč povzroča okvaro delovanja endotelija in posledično je zmanjšana relaksacija žil (65).

V literaturi lahko zasledimo mnogo podatkov o ugodnih učinkih valsartana. Sklepamo, da je delovanje te učinkovine na sprostitveni odziv žil od endotelija odvisno. Kot smo že omenili, ima estrogen zaščitno delovanje na srčno-žilni sistem. V raziskavi so podgane, ki so jim bili odstranjeni jajčniki, izkazovale okrnjeno delovanje endotelija. Zmanjšana je bila od endotelija odvisna vazorelaksacija (inducirana z acetilholinom), medtem ko ni bilo opaznih sprememb v od endotelija neodvisni vazorelaksaciji (inducirani z natrijevim nitroprusidom), kar kaže na ohranjeno odzivnost gladkih mišic na NO. Kronična terapija z valsartanom je izboljšala odzivnost žil preko povečane razpoložljivosti NO in zmanjšanja oksidativnega stresa (60). Do enakih ugotovitev so prišli v britanski klinični (randomizirani, dvojno slepi) študiji na 25 bolnikih s hipertenzijo, ki so prejeli valsartan. Z intraarterijsko infuzijo acetilholina so povzročili od endotelija odvisno sproščanje NO in opazovali vazodilatacijo, ki je odvisna od NO. Uporabili so tudi kombinacijo acetilholina in L-NMMA (L-N ω -monometil-L-arginin), ki je zaviralec NO sintaze in tako preprečuje sproščanje žil preko endotelijskih mehanizmov. To je služilo za

preučevanje vazodilatacije, ki je neodvisna od NO. Ugotovili so, da valsartan izboljša vazodilatacijo tako po poteh, ki so odvisne od NO, kot tudi po takih, ki so od NO neodvisne (66).

Imanishi s sodelavci je hiperlipidemičnim zajcem meril produkcijo NO, ki so jo inducirali z acetilholinom. Ob dodatku valsartana je bila razpoložljivost NO večja, posledično pa tudi sprostivni odziv žil (67). V istem laboratoriju in enakem živalskem modelu so preučevali tudi vpliv kombinacije pitavastatina in valsartana na produkcijo NO ter ugotovili, da je bila le-ta značilno bolj povišana pri kombinaciji učinkovin kot pri posameznih učinkovinah v primerjavi s kontrolno skupino. Kombinacija obeh učinkovin pa je pomembno znižala tudi koncentracijo peroksinitrita, ki ima pomembno vlogo pri oksidativnem stresu (68). Rezultati raziskav kažejo, da ima kombinacija učinkovin aditivne zaščitne učinke na endotelijsko funkcijo in aterosklerotične spremembe, kar smo potrdili tudi v naši raziskavi.

Slovenska ekipa raziskovalcev je preučevala pleiotropne učinke nizkih odmerkov atorvastatina, losartana in njune kombinacije na podganji aorti. Signifikantne razlike v sprostitvenem odzivu žil v primerjavi s kontrolno skupino so dokazali le pri skupini, ki je prejela kombinacijo obeh učinkovin. Povečanje od endotelija odvisne relaksacije pri posameznih učinkovinah je bilo opazno, vendar razlika ni bila značilna. Ni bilo opaznih sprememb v lipidnem profilu in krvnem tlaku (69). Podobne rezultate je dala študija na zdravih prostovoljcih z nizkim tveganjem za srčno-žilne bolezni, ki so prejeli kombinacijo fluvastatina in valsartana v nizkih terapevtskih odmerkih (70).

5.2.1.2 Sposobnost skrčitve žilnih obročkov s fenilefrinom

Preveriti smo želeli tudi skrčitveni odziv žilnih obročkov v odvisnosti od koncentracije fenilefrina. Iz koncentracijsko-skrčitvene krivulje (slika 14) in stolpčnega diagrama (slika 15), kjer so prikazane površine pod krivuljo, je razvidno, da so se žilni obročki torakalnih aort pri vseh skupinah po kumulativnem dodajanju fenilefrina skrčili. Opazimo, da so se vsi obročki začeli krčiti pri koncentraciji fenilefrina 10^{-7} mol/L, pri nižji koncentraciji pa fenilefrin ni povzročil skrčitve. Takšen odziv je verjetno posledica prenizke koncentracije fenilefrina in ne napačne izbire vazokonstriktorja.

Fenilefrin je selektivni agonist in povzroča vazokonstrikcijo preko adrenergičnih receptorjev α_1 na gladkih mišičnih celicah žil in endoteliju. Ti receptorji so sklopljeni z G-

proteinom, njihova aktivacija pa preko PLC sproži nastanek IP_3 in DAG. To vodi v odprtje Ca^{2+} kanalov, koncentracija Ca^{2+} v celici naraste in gladka mišična celica se skrči (7).

Statistična obdelava rezultatov je pokazala, da med skupinami ni značilnih razlik v skrčitvenem odzivu žilnih obročkov. Rezultati so v skladu s pričakovanji, saj je krčenje žil posledica delovanja predvsem gladkih mišic. Preučevani učinkovini atorvastatin in valsartan vplivata na funkcijo endotelija, na gladke mišice pa imata manjši vpliv. Sklepamo pa tudi, da v času 8-tedenskega krmljenja z aterogeno dieto nismo uspeli povzročiti napredovale ateroskleroze, ki bi imela vpliv tudi na krčenje žil.

5.2.2 Morfometrija

Večina dejavnikov tveganja, za katere je znano, da pospešujejo aterogenezo, najprej povzroči motnje v delovanju endotelijskih celic, z napredovanjem aterosklerotičnega procesa pa pride tudi do morfoloških sprememb. V raziskavi nam je z aterogeno dieto pri budrah uspelo inducirati zaznavne morfološke spremembe arterij. Prisotnost maščobnih leh v lumnu abdominalne aorte smo dokazali v vseh petih preiskovanih skupinah. Statistična primerjava rezultatov z uporabo enofaktorske analize variance in Bonferronijevega post hoc testa je pokazala, da med preiskovanimi skupinami obstajajo statistično značilne razlike (slika 17).

Postopek priprave žil za morfometrijo je zaradi majhnosti žil težaven. Okoliško maščevje in vezivo, ki ju nismo uspeli odstraniti, sta motila določanje maščobnih leh. Včasih smo težko razlikovali med maščobno leho, vezivom (proseva skozi žilo in lahko izgleda kot maščobna leha) ter maščobo, ki se nahaja izven lumna žile in se z raztopino Oil red O barva kot maščobna leha, razlika je le v intenzivnosti barvanja. Dodatna omejitev je bila ta, da smo iz vsake živali pridobili le en odsek aorte.

Potrdili smo, da so budre ustrezen živalski model za induciranje ateroskleroze. Zaznavne morfološke spremembe arterij, ki smo jih opazili kot maščobne lehe v lumnu abdominalne aorte, so se pojavile že po 8 tednih krmljenja z aterogeno dieto. Pri tej skupini je bilo po pričakovanjih opaziti največji delež površine maščobnih leh glede na celotno opazovano površino žile. Lehe so bile velike in razporejene po celotnem lumnu žile.

Uspeli smo potrditi, da ima dodatek učinkovin k aterogeni dieti ugoden vpliv na razvoj morfoloških sprememb arterij in da ima kombinacija obeh učinkovin močnejše delovanje

kot vsaka učinkovina posebej. Pri teh skupinah so se aterosklerotične lehe pojavljale v veliko manjšem obsegu glede na aterogeno dieto, zavzemale niso niti odstotka celotne (opazovane) površine žile. Skupina, ki je poleg aterogene krme prejela kombinacijo atorvastatina in valsartana, je imela 42-krat manj aterosklerotičnih leh v primerjavi s skupino, krmljeno le z aterogeno krmo. Pri skupinah, krmljenih z aterogeno dieto z dodatkom le ene izmed učinkovin (ali atorvastatina ali valsartana), pa smo opazili približno 20-krat manj leh v primerjavi z aterogeno dieto. Kombinacija obeh učinkovin je torej v primerjavi s posameznima učinkovinama zmanjšala prisotnost leh za 2-krat, vendar razlika ni bila statistično značilna. Glede na dobljene rezultate lahko rečemo, da je kombinacija učinkovin celo izboljšala stanje žil, saj je imela ta skupina buder manjši delež maščobnih leh kot skupina, ki je bila krmljena z osnovnimi briketi. Učinkovine so v nizkih terapevtskih odmerkih delovale zaščitno na žile.

V literaturi lahko zasledimo, da se aterosklerotične spremembe pri budrah ob njihovi vegetarijanski prehrani le redko oz. počasneje razvijejo. Zato jih je za induciranje zaznavnih sprememb na žilah potrebno krmiti z velikimi količinami holesterola in maščob (71). S tem lahko pojasnimo nizek delež površin plakov pri skupini, krmljeni le z osnovno prehrano. Pri interpretaciji rezultatov bi morali upoštevati tudi neenakomerno porazdelitev spola pri posameznih skupinah. Izsledki raziskav so pokazali, da samice zaradi zaščitnega učinka estrogena počasneje razvijajo maščobne lehe kot samci (46).

Poleg prisotnosti leh bi lahko določali tudi njihovo sestavo. Posamezne aterosklerotične lehe se razlikujejo glede obsega ter zastopanosti vnetnih in nevnetnih sprememb. Pri večini, zlasti pri napredovalih lehah, so navzoče tako degenerativne spremembe z nekrotičnim tkivom in vložki lipidov kot tudi vnetne spremembe (19). Ena izmed metod za določanje sestave plakov je imunološko barvanje s specifičnimi markerji (za makrofage, celice T, gladkomišične celice). V prej omenjenih raziskavah na hiperlipidemičnih zajcih so dokazali zmanjšano prisotnost plakov v lumnu aorte ob terapiji z valsartanom ter ob terapiji s kombinacijo valsartana in pitavastatina v primerjavi s kontrolno skupino. Imunološko barvanje z monoklonskimi protitelesi je pokazalo, da so plaki sestavljeni pretežno iz makrofagov (67, 68). V naši raziskavi sestave maščobnih leh nismo preučevali.

Ugodne učinke valsartana in atorvastatina so preučevali v dveh ločenih študijah na gensko spremenjenih miših, ki so nekaj tednov prejemale s holesterolom in maščobami bogato krmo, da so razvile aterosklerotične lehe. V prvi raziskavi so mišim intragastrično dovajali

angiotenzin II in valsartan. Po nekaj tednih so morfološko ovrednotili žile, ocenili so površino aterosklerotičnih leh in njihovo sestavo. V skupini živali, ki je prejela angiotenzin II, so bili plaki nestabilni s tankim fibroznim pokrovom, sestavljeni pretežno iz makrofagov in lipidov. Nasprotno pa so pri zaviralcu angiotenzinskih receptorjev valsartanu opazili manjši delež aterosklerotičnih plakov, bili pa so tudi manj ranljivi (72). V drugi raziskavi jih je zanimal vpliv nizkih količin atorvastatina na napredovanje rasti plakov v aortnem loku, kjer se bolezen še posebej rada razvije. Opazili so pomembno zmanjšanje napredovanja aterosklerotičnih sprememb (59). Rezultati epidemioloških študij kažejo, da se s kombinacijo diete in farmakoterapije lahko doseže celo nazadovanje ateroskleroze. V študiji, izvedeni na ljudeh, so s pomočjo slikanja z magnetno resonanco (MRI, *ang. magnetic resonance imaging*) pokazali, da 1- oz. 2-letna terapija z atorvastatinom povzroči regresijo aterosklerotičnih sprememb (73).

6 SKLEP

V raziskavi nam je z 8-tedenskim krmljenjem z aterogeno dieto uspelo inducirati zaznavne funkcionalne in morfološke spremembe na arterijah buder. Ugotovili smo, da hrana, ki vsebuje velike količine proaterogenih snovi, vpliva na endotelijsko funkcijo žil in nastajanje maščobnih leh. Pri budrah, krmljenih z aterogeno krmo, so se pojavile številne maščobne lehe po celotnem lumnu abdominalne aorte, medtem ko so imele budre, ki so jedle zdravo hrano (osnovne brikete), precej manjši delež maščobnih leh. Pri skupini živali, ki je prejemale aterogeno dieto, je bila slabša tudi žilna funkcija, saj smo pri teh budrah opazili najslabši sprostitevni odziv ob dodatku acetilholina. S tem smo potrdili, da so budre primeren model za induciranje in preučevanje ateroskleroze, kar so dokazali že drugi raziskovalci.

V raziskavi nas je zanimal predvsem vpliv atorvastatina in valsartana na omenjene spremembe žil. Dokazali smo, da dodatek posameznih učinkovin ter njune kombinacije k aterogeni dieti preprečuje oz. zmanjša nastanek funkcionalnih in morfoloških sprememb aorte. Učinkovine so v subterapevtskih odmerkih delovale antiaterogeno oz. zaščitno na žile, predvsem zaradi njihovih pleiotropnih učinkov, ki so neodvisni od osnovnega delovanja učinkovin. Žilna funkcija je bila ohranjena oz. se je v primeru skupine, ki je poleg aterogene diete prejemale še kombinacijo učinkovin, celo izboljšala, kar smo potrdili z odzivnostjo na acetilholin. Podobne rezultate je dala tudi morfološka analiza žil. Pri skupinah, ki so poleg aterogene krme prejemale še posamezni učinkovini ali njuno kombinacijo, je bil odstotek maščobnih leh glede na površino lumna aorte veliko manjši kot pri skupini, krmljeni z aterogeno dieto. V obeh nizih poskusov, tako pri meritvah odzivnosti žilnih obročkov kot tudi pri morfometriji, smo opazili boljše rezultate (t.j. večji sprostitevni odziv in manjši delež maščobnih leh) pri skupini, krmljeni z aterogeno dieto z dodatkom kombinacije učinkovin, kot pri tisti, ki je poleg aterogene diete prejemale le eno izmed učinkovin. Sklepamo torej, da ima kombinacija atorvastatina in valsartana močnejše delovanje kot posamezni učinkovini.

Z nadaljnjimi raziskavami bi bilo smiselno ovrednotiti odzivnost endotelija žil še z drugimi vazorelaksatorji (npr. bradikinin, snov P), ki delujejo le na endotelij, ne pa tudi na gladke mišične celice žil. Acetilholin deluje na endotelij žil, v manjši meri pa tudi na gladkomišične celice, ki se nanj nasprotno odzivajo.

7 LITERATURA

1. <http://www.jupsline.net/showdoc.php?novica=1336467463> (31.5.2012)
2. Zorc-Pleskovič R, Milutinović-Živin A, Petrovič D: Histologija, učbenik za študente farmacije, Inštitut za histologijo in embriologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Littera Picta, Ljubljana 2006: 49-53.
3. Štiblar Martinčič D: Histologija, univerzitetni učbenik, 1. izdaja, Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta, Littera Picta, Maribor, 2010: 44-50.
4. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W: Histology: A Text and Atlas, 4th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2003: 326-337.
5. Štiblar Martinčič D, Cör A, Cvetko E, Marš T, Legan M: Anatomija, histologija in fiziologija, 2. Izdaja, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2008: 95-112.
6. Libby P: Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420 (6917): 868-874.
7. Rang HP, Dale MM, Ritter JM: Rang and Dale's pharmacology, 6th Ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, 2007; 29, 144-188, 265-273, 298-320.
8. Koepfen BM, Stanton BA: Berne & Levy physiology, 6th Ed., Mosby Elsevier, Philadelphia, 2008: 218-225, 273-281.
9. Clinton Webb R: Smooth muscle contraction and relaxation. *Advan in Physiol Edu* 2003; 27: 201-206.
10. Hirano K, Hirano M, Kanaide H: Regulation of myosin phosphorylation and myofilament Ca^{2+} sensitivity in vascular smooth muscle. *J Smooth Muscle Res* 2004; 40 (6): 219-236.
11. Sitia S, Tomasoni L, Atzeni F, Ambrosio G, Cordiano C, Catapano A, Tramontana S, Perticone F, Naccarato P, Camici P, Picano E, Cortigiani L, Bevilacqua M, Milazzo L, Cusi D, Barlassina C, Sarzi-Puttini P, Turiel M: From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmun Rev* 2010; 9 (12): 830-834.
12. Kogoj P, Hawlina S, Bunc M: Od endotelija odvisno uravnavanje žilnega napona. *Med razgl* 2008; 47: 31-42.
13. Janić M, Lunder M, Šabovič M: Okrnjeno delovanje endotelija. *Med razgl* 2011; 50: 297-305.
14. Ozkor MA, Quyyumi AA: Endothelium-derived hyperpolarizing factor and vascular function. *Cardiol Res Pract* 2011; 2011: 156146.
15. Vanhoutte PM: Endothelial control of vasomotor function: from health to coronary disease. *Circ J* 2003; 67: 572-575.
16. Chiu JJ, Chien S: Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev* 2011; 91 (1): 327-387.
17. Lemke TL, Williams DA: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 7th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, USA, 2012; 263-281.
18. Brunton L, Chabner B, Knollmann B: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12th Ed., McGraw-Hill, New York, 2011: 171-238.
19. Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Koželj M, Černelč P: Interna medicina, 4. izdaja, Littera picta, Slovensko medicinsko društvo, Ljubljana, 2011: 241-246, 310-311.
20. Lunder M, Kuhar P, Drevenšek G: Ateroskleroza-dejavniki tveganja in zapleti. *Medicinski mesečnik* 2007; 3 (7/8): 235-240.
21. Fras Z: Ocenjevanje celotne srčno-žilne ogroženosti z aterosklerozo. *Medicinski razgledi* 2003; 42 (2): 11-22.

22. Packard RR, Libby P: Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem* 2008; 54 (1): 24-38.
23. Hansson GK: Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1685-1695.
24. Ganong WE: Cardiovascular disorders: Vascular disease. In McPhee SJ and Ganong WF (Eds). *Pathophysiology of disease. An introduction to clinical medicine*, 5th Ed., The McGraw-Hill Companies, 2006: 300-326.
25. Balanescu S, Calmac L, Constantinescu D, Marinescu M, Onut R, Dorobantu M: Systemic inflammation and early atheroma formation: are they related? *Maedica* 2010; 5 (4): 292-301.
26. Lunder M, Kuhar P, Drevenšek G: Preprečevanje in zdravljenje ateroskleroze. *Medicinski mesečnik* 2007; 3 (9): 293-299.
27. Centralna baza zdravil: <http://www.cbz.si/> (6.5.2012)
28. European Pharmacopoeia, 7th Ed., Supplement 7.1, Council of Europe, Strasbourg, 2010: 3380-3382.
29. Povzetek temeljnih značilnosti zdravila Atoris, www.zdravila.net; zadnja revizija 2011.
30. Brookes ZLS, McGown CC, Reilly CS: Statins for all: the new premed? *Br J Anaesth* 2009; 103: 99-107.
31. Lunder M, Žiberna L, Drevenšek G, Šabovič M: Zaščitni pleiotropni učinki statinov. *Zdrav Vestn* 2011; 80: 39-49.
32. Dilaveris P, Giannopoulos G, Riga M, Synetos A, Stefanadis C: Beneficial effects on endothelial dysfunction and vascular stiffness. *Curr Vasc Pharmacol* 2007; 5 (3): 227-237.
33. Zdravniško društvo Maribor, Združenje internistov SZD: 20. srečanje internistov in zdravnikov družinske medicine »Iz prakse za prakso« z mednarodno udeležbo, UKC Maribor, 2009: 21-28.
34. Povzetek temeljnih značilnosti zdravila Valsartan, www.zdravila.net; zadnja revizija 2010.
35. European Pharmacopoeia, 7th Ed., Volume 2, Council of Europe, Strasbourg, 2010: 3191-3192.
36. Ma TK, Kam KK, Yan BP, Lam YY: Renin-angiotensin-aldosterone system blockade for cardiovascular diseases: current status. *Br J Pharmacol* 2010; 160 (6): 1273-1792.
37. Chrysant SG, Chrysant GS: The pleiotropic effects of angiotensin receptor blockers. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2005; 8 (4): 261-268.
38. Toth PP: Pleiotropic effects of angiotensin receptor blockers: addressing comorbidities by optimizing hypertension therapy. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2010; 13 (1): 42-51.
39. Montecucco F, Pende A, Mach F: The renin-angiotensin system modulates inflammatory processes in atherosclerosis: evidence from basic research and clinical studies. *Mediators Inflamm* 2009; 2009: 752406.
40. Li X, Liu Y, Zhang H, Ren L, Li Q, Li N: Animal models for the atherosclerosis research: a review. *Protein Cell* 2011; 2 (3): 189-201.
41. Fernandez ML, Volek JS: Guinea pigs: A suitable animal model to study lipoprotein metabolism, atherosclerosis and inflammation. *Nutrition and Metabolism* 2006; 3:17.
42. Singh V, Tiwari RL, Dikshit M, Barthwal MK: Models to study atherosclerosis: a mechanistic insight. *Curr Vasc Pharmacol* 2009; 7 (1): 75-109.

43. Lin ECK, Fernandez ML, McNamara DJ: Dietary fat type and cholesterol quantity interact to affect cholesterol metabolism in guinea pigs. *The Journal of Nutrition* 1992; 122: 2019-2029.
44. Torres-Gonzalez M, Leite JO, Volek JS, Contois JH, Fernandez ML: Carbohydrate restriction and dietary cholesterol distinctly affect plasma lipids and lipoprotein subfractions in adult guinea pigs. *J Nutr Biochem* 2008; 19 (12): 856-863.
45. West KL, Fernandez ML: Guinea pigs as models to study the hypocholesterolemic effects of drugs. *Cardiovasc Drug Rev* 2004; 22 (1): 55-70.
46. Fernandez ML: Guinea pigs as models for cholesterol and lipoprotein metabolism. *J Nutr* 2001; 131: 10-20.
47. Zakon o zaščiti živali (ZZiv-UPB1). Uradni list RS 2004; 14 (20): 2182.
48. Pravilnik o strokovnih, kadrovskih in tehničnih pogojih za opravljanje poskusov na živalih. Uradni list RS 2004; 14 (36): 4330.
49. Štampar P: Primerjava učinkov aterogene diete na nastanek sprememb v srčno-žilnih tkivih budre pod vplivom delovanja atorvastatina in valsartana. *Diplomsko delo*, Ljubljana 2011.
50. http://my.clevelandclinic.org/heart/disorders/aorta_marfan/aortaillust.aspx (14.6.2012)
51. Stamler J, Neaton JD: The Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT) - importance then and now. *JAMA* 2008; 300 (11): 1343-1345.
52. Liao JK: Effects of statins on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition beyond low-density lipoprotein cholesterol. *Am J Cardiol* 2005; 96 (5A): 24F-33F.
53. Susekov AV, Rozhkova TA, Tripoten' MI, Pogorelova OA, Kulev BD, Balakhonova TV, Zubareva MIu, Masenko VP, Rogozova AN, Kukharchuk VV: [Randomized FARVATER study. Part 2. Effect of atorvastatin on endothelial function, distensibility and stiffness of vascular wall]. *Cardiovascular therapy and prevention* 2007; 6: 68-75.
54. Ikeda F, Azuma K, Ogihara T, Toyofuku Y, Otsuka A, Mita T, Hirose T, Tanaka Y, Kawamori R, Watada H: Angiotensin II type 1 receptor blocker reduces monocyte adhesion to endothelial cells in spontaneously hypertensive rats. *Endocr J* 2007; 54 (4): 605-612.
55. Black HR, Bailey J, Zappe D, Samuel R: Valsartan: more than a decade of experience. *Drugs* 2009; 69 (17): 2393-2414.
56. Pfeffer MA, McMurray JJ, Velazquez EJ, Rouleau JL, Køber L, Maggioni AP, Solomon SD, Swedberg K, Van de Werf F, White H, Leimberger JD, Henis M, Edwards S, Zelenkofske S, Sellers MA, Califf RM: Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both. *N Engl J Med* 2003; 349 (20): 1893-1906.
57. de Gasparo M, Hess P, Clozel M, Persohn E, Roman D, Germann PG, Clozel JP, Webb RL: Combination of low-dose valsartan and enalapril improves endothelial dysfunction and coronary reserve in N-omega-nitro-L-arginine methyl ester-treated spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; 40 (5): 789-800.
58. Budihna VM: Delo z izoliranimi organi, Farmakološke metode. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo.
<http://www.mf.uni-lj.si/dokumenti/1c5b38fd2c21a78e9dd227609452ddb6.pdf>. (10.4.2012)

59. Verschuren L, Kleemann R, Offerman EH, Szalai AJ, Emeis SJ, Princen HM, Kooistra T: Effect of low dose atorvastatin versus diet-induced cholesterol lowering on atherosclerotic lesion progression and inflammation in apolipoprotein E*3-Leiden transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25 (1), 161-167.
60. Yung LM, Wong WT, Tian XY, Leung FP, Yung LH, Chen ZY, Yao X, Lau CW, Huang Y: Inhibition of renin-angiotensin system reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in estrogen deficient rats. *PLoS One* 2011; 6 (3): e17437.
61. Ratz PH, Berg KM, Urban NH, Miner AS: Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288: 769-783.
62. Vecchione C, Brandes RP: Withdrawal of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors elicits oxidative stress and induces endothelial dysfunction in mice. *Circ Res* 2002; 91 (2): 173-179.
63. Bhola A, Budhiraja RD, Kumar A, Malik S, Kumar S: Inhibition of ceramide activated protein phosphatases improves vascular endothelial dysfunction. *JPR* 2010; 3(7): 1475-1479.
64. Aragoncillo P, Maeso R, Vázquez-Pérez S, Navarro-Cid J, Ruilope LM, Díaz C, Hernández G, Lahera V, Cachofeiro V: The protective role of atorvastatin on function, structure and ultrastructure in the aorta of dyslipidemic rabbits. *Virchows Arch* 2000; 437(5): 545-554.
65. Subramani J, Kathirvel K, Leo MD, Kuntamallappanavar G, Uttam Singh T, Mishra SK: Atorvastatin restores the impaired vascular endothelium-dependent relaxations mediated by nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factors but not hypotension in sepsis. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009; 54(6): 526-34.
66. Tzemos N, Lim PO, MacDonald TM: Valsartan improves endothelial dysfunction in hypertension: a randomized, double-blind study. *Cardiovasc Ther* 2009; 27 (3): 151-158.
67. Imanishi T, Tsujioka H, Ikejima H, Kuroi A, Takarada S, Kitabata H, Tanimoto T, Muragaki Y, Mochizuki S, Goto M, Yoshida K, Akasaka T: Renin inhibitor aliskiren improves impaired nitric oxide bioavailability and protects against atherosclerotic changes. *Hypertension* 2008; 52 (3): 563-572.
68. Imanishi T, Ikejima H, Tsujioka H, Kuroi A, Kobayashi K, Shiomi M, Muragaki Y, Mochizuki S, Goto M, Yoshida K, Akasaka T: Combined effects of an 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor and angiotensin II receptor antagonist on nitric oxide bioavailability and atherosclerotic change in myocardial infarction-prone Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Hypertens Res* 2008; 31 (6): 1199-1208.
69. Lunder M, Žiberna L, Janić M, Jerin A, Skitek M, Šabovič M, Drevenšek G: Low-dose atorvastatin, losartan, and particularly their combination, provide cardiovascular protection in isolated rat heart and aorta. *Heart Vessels* 2012; DOI: 10.1007/s00380-012-0259-0.
70. Lunder M, Janić M, Jug B, Sabovič M: The effects of low-dose fluvastatin and valsartan combination on arterial function: a randomized clinical trial. *Eur J Intern Med* 2012; 23(3): 261-266.
71. Kriegelstein J, Kewitz T, Kirchhefer U, Hofnagel O, Weissen-Plenz G, Reinbold M, Klumpp S: Damage of guinea pig heart and arteries by a trioleate-enriched diet and of cultured cardiomyocytes by oleic acid. *PLoS One* 2010; 5(3): e9561.
72. Yang LX, Yang ZH, Guo RW, Ye JS, Liu H: Angiotensin II induces extracellular matrix metalloproteinase inducer expression via an AT1R dependent pathway in

- aortic atherosclerotic plaque in apolipoprotein E knockout mice. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2012; 13(1): 67-75.
73. Yonemura A, Momiyama Y, Fayad ZA, Ayaori M, Ohmori R, Kihara T, Tanaka N, Nakaya K, Ogura M, Taniguchi H, Kusuhashi M, Nagata M, Nakamura H, Tamai S, Ohsuzu F: Effect of lipid-lowering therapy with atorvastatin on atherosclerotic aortic plaques: a 2-year follow-up by noninvasive MRI. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2009; 16(2): 222-228.