

Univerza v Ljubljani  
Fakulteta za farmacijo



TADEJA LEMUT

**PROUČEVANJE IZRAŽANJA *Edn1* IN *Ednra* V PODGANJIH  
AORTNIH OBROČKIH POD VPLIVOM SUBTHERAPEVTSKIH  
ODMERKOV ZDRAVIL ZA ZMANJŠANJE TVEGANJA ZA  
ATEROSKLEROZO**

**STUDY OF *Edn1* AND *Ednra* EXPRESSION IN RAT AORTIC  
RINGS AT SUBTHERAPEUTIC DOSES OF DRUGS REDUCING  
THE RISK OF ATHEROSCLEROSIS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2015

*Learning is a discovery that something is possible. (Fritz Perls)*

Učenje je odkrivanje, da je nekaj mogoče. (Fritz Perls)

Diplomsko naložbo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo (Katedra za klinično biokemijo) pod mentorstvom prof. dr. Darka Černeta, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom viš. zn. sod. dr. Gorazda Drevenška, univ. dipl. biol., vodje laboratorija za eksperimentalno srčno-žilno farmakologijo na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Merjenje maksimalne sposobnosti relaksacije in kontrakcije izoliranih podganjih torakalnih aort so opravili na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

### **Zahvala**

*Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Darku Černetu in somentorju viš. zn. sod. dr. Gorazdu Drevenšku za vso pomoč, strokovne nasvete in usmerjanje pri izdelavi diplomske naloge. Iskreno se zahvaljujem tudi gostujočima profesoricama iz Beograda doc. dr. Jeleni Kotur-Stevuljević in doc. dr. Nataši Bogavac-Stanojević, ki sta me prijazno sprejeli, vpeljali v eksperimentalni del naloge, mi pri tem pomagali ter me uspešno usmerjali pri statistični obdelavi podatkov.*

*Hvala tudi vsem zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo za pomoč in prijaznost pri delu v laboratoriju.*

*Nenazadnje bi se rada zahvalila tudi svojim staršem, fantu Žarku in prijateljici Sari, saj so mi tekom študija vedno stali ob strani, me podpirali, spodbujali in verjeli vame.*

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko naložbo izdelala samostojno pod vodstvom mentorja prof. dr. Darka Černeta, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorja viš. zn. sod. dr. Gorazda Drevenška, univ. dipl. biol..

Tadeja Lemut

Ljubljana, december 2015

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Albin Kristl, mag. farm.

Članica diplomske komisije: doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.

# KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE .....	I
KAZALO SLIK .....	III
KAZALO PREGLEDNIC .....	III
KAZALO GRAFOV .....	III
POVZETEK .....	IV
ABSTRACT .....	VI
SEZNAM OKRAJŠAV .....	VIII
1. UVOD .....	1
1.1. ENDOTELINSKI SISTEM .....	1
1.1.1. Sinteza in regulacija ET-1 .....	2
1.1.2. Vezava na receptorje in biološki odziv .....	3
1.1.3. Fiziološka in patofiziološka vloga ET-1 v srčno-žilnem sistemu .....	5
1.2. ATEROSKLOROZA .....	6
1.2.1. Vloga ET-1 v patogenezi ateroskleroze .....	7
1.3. GEN ZA ET-1 IN GEN ZA ENDOTELINSKI RECEPTOR TIPA A .....	9
1.3.1. <i>Edn1</i> .....	9
1.3.2. <i>Ednra</i> .....	11
1.4. SUBTERAPEVTSKI ODMERKI STATINOV, ANTAGONISTOV RECEPTORJA ZA ANGIOTENZIN II IN ACE INHIBITORJEV .....	12
1.4.1. Statini in njihovi pleiotropni učinki (atorvastatin) .....	12
1.4.2. Antagonisti receptorja za angiotenzin II (losartan) .....	14
1.4.3. Zaviralci angiotenzinske konvertaze (perindopril) .....	16
2. NAMEN IN DELOVNE HIPOTEZE .....	17
3. MATERIALI IN METODE .....	19
3.1. POSKUSNE ŽIVALI IN ODMERKI UČINKOVIN .....	19
3.1.1. Izolacija torakalne aorte .....	20
3.1.2. Merjenje odstotka maksimalne relaksacije in maksimalne kontrakcije izoliranih torakalnih aort podgan .....	20
3.2. VZORCI .....	21
3.2.1. Oznake vzorcev .....	21
3.2.2. Izolacija celokupne RNA .....	22
3.2.3. Reverzna transkripcija .....	22
3.3. MATERIALI IN APARATURE .....	23
3.3.1. Laboratorijski material .....	23
3.3.2. Uporabljene aparature .....	23
3.3.3. Uporabljeni reagenti .....	24
3.3.4. Pripravljene uporabljene raztopine .....	24
3.3.5. Uporabljena programska oprema .....	25
3.4. METODE .....	25
3.4.1. Merjenje izražanja <i>Edn1</i> , <i>Ednra</i> in <i>Hmbs</i> z metodo qPCR (kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času) .....	25
3.4.1.1. Princip qPCR .....	25
3.4.1.2. Princip detekcije produkta s hidrolizirajočimi TaqMan sondami .....	26
3.4.1.3. Opis postopka merjenja izražanja <i>Edn1</i> , <i>Ednra</i> in <i>Hmbs</i> .....	27
3.4.2. Standardizacija na hišni gen (normalizacija) .....	32
3.4.2.1. Opis postopka normalizacije .....	32
3.4.3. Statistične metode .....	33

3.4.3.1.	Enofaktorska ANOVA .....	34
3.4.3.2.	Dvofaktorska ANOVA.....	34
3.4.3.3.	Delo s percentili.....	35
3.4.3.4.	Korelacija neodvisna od terapije .....	35
3.4.3.5.	Korelacija po terapiji .....	36
<b>4.</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>37</b>
4.1.	REZULTATI MERJENJA IZRAŽANJA GENOV Z METODO qPCR .....	37
4.2.	OCENA VPLIVA TERAPIJE NA IZRAŽANJE <i>Edn1</i> IN <i>Ednra</i> .....	41
4.2.1.	<i>Ednra</i> .....	41
4.2.2.	<i>Edn1</i> .....	43
4.3.	KORELACIJA IZRAŽANJA GENOV S %MR IN %MK.....	44
5.	RAZPRAVA.....	45
6.	SKLEPI.....	51
7.	LITERATURA .....	54

## KAZALO SLIK

Slika 1: Aminokislinsko zaporedje pro endotelina-1 .....	1
Slika 2: Konstitutivna in regulirana pot izločanja ET-1 .....	2
Slika 3: Dejavniki, ki regulirajo sintezo ET-1 .....	3
Slika 4: Mehanizem konstrikcije GMC žil izzvane z endotelini preko receptorja ET <sub>A</sub> .....	4
Slika 5: Mehanizem relaksacije GMC žil izzvane z endotelini preko receptorja ET <sub>B1</sub> .....	5
Slika 6: Vpliv dejavnikov tveganja na zvišano izražanje endotelinskih receptorjev v GMC preko z MAPK uravnanih NF-κB signalnih poti.....	8
Slika 7: Dobro ohranjena nukleotidna zaporedja v proksimalnem delu promotorja med različnimi vrstami sesalcev.....	9
Slika 8: Regulacija izražanja <i>EDN1</i> .....	10
Slika 9: Biosinteza holesterola v jetrih in mesto delovanja statinov .....	12
Slika 10: Princip delovanja hidrolizirajočih TaqMan® sond .....	26

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Zaščitni pleiotropni učinki statinov (antiaterogeni) in njihov mehanizem delovanja.....	13
Preglednica II: Zaščitni pleiotropni učinki losartana na žilje in njihov mehanizem delovanja.....	15
Preglednica III: Zaščitni pleiotropni učinki perindoprila na žilje in njihov mehanizem delovanja.....	16
Preglednica IV: Oznake vzorcev po vrsti terapije, ki so jo prejemale podgane.....	21
Preglednica V: Količine za pripravo postopnih razredčitev standardov za posamezen gen za tri plošče.....	28
Preglednica VI: Sestava delovne reakcijske mešanice (MM) in njihovi volumni za posamezen gen.....	29
Preglednica VII: Sestava končne reakcijske zmesi za eno reakcijo qPCR.....	30
Preglednica VIII: Izračunane povprečne vrednosti koncentracije mRNA v vzorcih za <i>Edn1</i> , <i>Ednra</i> in za hišni gen <i>Hmbs</i> .....	37
Preglednica IX: Prikaz končnih rezultatov po normalizaciji na hišni gen <i>Hmbs</i> .....	38
Preglednica X: Končni rezultati statistične analize za <i>Edn1</i> in <i>Ednra</i> .....	41

## KAZALO GRAFOV

Graf 1: Krivulja pomnoževanja produkta PCR .....	27
Graf 2: Primer standardne krivulje za <i>Ednra</i> s programom ABI Prism® 7000 SDS .....	31
Graf 3: Prikaz povprečnih vrednosti izražanja <i>Ednra</i> in SD po časovnih obdobjih pri kombinirani terapiji z atorvastatinom in losartanom v subterapevtskih odmerkih .....	42
Graf 4: Prikaz povprečnih vrednosti izražanja <i>Ednra</i> in SD po časovnih obdobjih pri kombinirani terapiji z atorvastatinom in perindoprilom v subterapevtskih odmerkih .....	42
Graf 5: Prikaz povprečnih vrednosti izražanja <i>Edn1</i> in SD po časovnih obdobjih pri kombinirani terapiji z atorvastatinom in losartanom v subterapevtskih odmerkih .....	43

## POVZETEK

Endotelin-1 (ET-1) je ključni dejavnik v razvoju okvare endotelija žil pri različnih srčno-žilnih obolenjih, vključno z aterosklerozo. Deluje kot močan in dolgodelajoč vazokonstriktor, ima provnetne lastnosti, spodbuja trombozo, proliferacijo gladkih mišičnih celic žil in fibrozo ter na ta način prispeva k zamašitvi žil. Pri bolnikih z dejavniki tveganja za nastanek srčno-žilne bolezni, kot so hiperholisterolemija, hipertenzija in sladkorna bolezen, so izmerili zvišane plazemske ravni ET-1, povečanje izražanja endotelinskih receptorjev v žilni steni in zmanjšano razpoložljivost NO. Eksperimentalni rezultati na živalskih modelih hiperholisterolemije in ateroskleroze potrjujejo, da je v aterosklerotični žili zvišana raven izražanja gena za ET-1 in genov za endotelinske receptorje.

V okviru diplomske naloge smo preučevali izražanje gena za endotelin-1 (*Edn1*) in gena za endotelinski receptor tipa A (*Ednra*) v izoliranih obročkih torakalne aorte zdravih podgan, ki so bile tretirane peroralno z zdravili za zmanjšanje tveganja za aterosklerozo. Številne študije potrjujejo, da imajo statini, antagonisti receptorja za angiotenzin II in ACE inhibitorji pri terapevtskih odmerkih ugodne učinke na srčno-žilni sistem. V naši raziskavi nas je zanimalo, ali že subterapevtski odmerki atorvastatina, losartana, perindoprila oziroma kombinacija atorvastatina in enega od omenjenih antihipertenzivov omogočajo zaščitno delovanje na ožilje, kar bi lahko v prihodnje uporabili v klinični praksi kot nov preventivni pristop. Predvidevali smo, da subterapevtske koncentracije omenjenih zdravil znižajo izražanje *Edn1* oziroma *Ednra* v tkivu podganjih torakalnih aort. Želeli smo potrditi tudi hipotezo, da je izražanje *Edn1* oziroma *Ednra* povezano s funkcijskimi spremembami (s sposobnostjo maksimalne relaksacije oziroma kontrakcije) na izolirani podganji torakalni aorti.

Z uporabo kvantitativne metode verižne reakcije s polimerazo v realnem času (angl. qPCR) smo izmerili izražanje *Edn1* in *Ednra* v izoliranih obročkih torakalne aorte zdravih podgan ter jih primerjali s podatki o sposobnosti maksimalne relaksacije in kontrakcije istega aortnega obročka. Zaradi premajhnega števila vzorcev v posameznih terapevtskih skupinah smo se odločili, da vzorce razdelimo glede na čas trajanja terapije tako, da združimo 4. in 6. teden terapije (zgodnje terapevtsko obdobje) ter 8. in 10. teden terapije (pozno terapevtsko obdobje), da smo jih lahko statistično ovrednotili. Vse rezultate smo primerjali s kontrolno skupino – skupino, ki ni bila tretirana z nobeno od terapij.

Ugotovili smo, da kombinacija atorvastatina in losartana ter kombinacija atorvastatina in perindoprila v subterapevtskih odmerkih statistično značilno znižata izražanje *Ednra*. Pri *Edn1* smo dobili rezultate v nasprotju s pričakovanji, saj ob nobeni terapiji ni prišlo do statistično značilnega znižanja izražanja. Pokazali smo, da je izražanje *Ednra* povezano s povečano maksimalno sposobnostjo relaksacije pri kombinaciji atorvastatina in losartana ( $p = 0,003$ ). Ugotovili smo tudi, da izražanje *Edn1* in procent maksimalne kontrakcije negativno korelirata ( $p = 0,001$ ).

Z raziskavo smo potrdili, da predvsem kombinacija atorvastatina in losartana oziroma perindoprila že pri subterapevtskih odmerkih zniža izražanje *Ednra*. Vseeno na osnovi rezultatov te študije težko zanesljivo potrdimo omenjene učinke, saj bi bilo potrebno naše ugotovitve podpreti še z nadaljnji raziskavami na ravni proteinov, najprej na živalskem modelu in šele nato na človeku.

**Ključne besede:** izražanje genov, *Edn1*, *Ednra*, qPCR, ateroskleroza, subterapevtski odmerki atorvastatina, losartana in perindoprila

## ABSTRACT

Endothelin-1 (ET-1) is the key factor in process of vessel endothelial dysfunction in different cardiovascular diseases, including atherosclerosis. ET-1 is the most potent and longacting vasoconstrictor with proinflammatory properties, promoting trombosis, smooth muscle cell proliferation and fibrosis, which result in vascular occlusion. High plasma concentration of ET-1, upregulation of endothelin receptors in vascular walls and low availability of NO have been measured in patients with risk factors for cardiovascular diseases, such as hypercholesterolemia, hypertension and diabetes mellitus. Experimental results on animal model of hypercholesterolemia and atherosclerosis confirm upregulation of ET-1 gene and endothelin receptor genes expression.

In the present thesis we were studying endothelin-1 gene (*Edn1*) and endothelin receptor type A gene (*Ednra*) expression in thoracic aorta rings of healthy rats. Rats were treated orally with subtherapeutic doses of drugs reducing the risk of atherosclerosis. Statins, angiotensin II receptor antagonists and ACE inhibitors are well known for their beneficial effects on cardiovascular system at therapeutic doses. The aim of our study was to examine wheather subtherapeutic doses of atorvastatin, losartan, perindopril and their combination possess protective cardiovascular effects, which could be used as new preventive approach in future clinical practice. We predicted that subtherapeutic concentrations of aforementioned drugs downregulate *Edn1* or *Ednra* expression in thoracic aorta rings of rat. We also wanted to confirm our second hypothesis that *Edn1* or *Ednra* expression correlates with functional changes in thoracic aorta of rats (ability of maximal relaxation and constriction).

Using the quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qPCR) we measured *Edn1* and *Ednra* expression in thoracic aorta rings of healthy rats. Those results were compared with data of maximal relaxation and constriction of the same aortic ring. Because of small sample size in different therapeutic groups, we decided to divide samples according to duration of therapy. We combined 4<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> week of therapy into early therapeutic period and 8<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> week into late therapeutic period in order to perform statistical evaluation. All results were compared to control group – a group without receiving any therapy.

The results clearly show, that combination of atorvastatin and losartan or combination of atorvastatin and perindopril in subtherapeutic doses statistically significantly downregulate

*Ednra* expression. Contrary to our expectations, there was no statistically significant downregulation of *Edn1* expression after any of examined therapies. A statistically significant correlation was observed between *Ednra* expression and increased maximal relaxation of aortic rings, when combination of atorvastatin and losartan was used ( $p = 0,003$ ). A negative correlation between *Edn1* expression and maximal percent constriction was determined ( $p = 0,001$ ).

We summarize that particularly combination of atorvastatin with losartan or with perindopril already in subtherapeutic doses downregulate *Ednra* expression. Nevertheless, further studies are required to confirm these findings, primarily at the protein level in animal models and later in human.

**Keywords:** gene expression, *Edn1*, *Ednra*, qPCR, atherosclerosis, subtherapeutic doses of atorvastatin, losartan and perindopril

## SEZNAM OKRAJŠAV

<b>A</b>	atorvastatin
<b>A<sub>λ</sub></b>	absorbanca pri določeni valovni dolžini
<b>AC</b>	adenilat ciklaza
<b>ACE</b>	angiotenzinska konvertaza (angl. <u>angiotensin converting enzyme</u> )
<b>AL</b>	kombinacija atorvastatina in losartana
<b>Ang II</b>	angiotenzin II
<b>ANOVA</b>	metoda analize variance (angl. <u>analysis of variance</u> )
<b>ANP</b>	atrijski natriuretični peptid (angl. <u>atrial natriuretic peptide</u> )
<b>AP</b>	kombinacija atorvastatina in perindoprilra
<b>AP-1</b>	transkripcijski dejavnik proteinski aktivator-1
<b>CAD</b>	koronarna arterijska bolezen (angl. <u>coronary artery disease</u> )
<b>cDNA</b>	komplementarna DNA (angl. <u>complementary DNA</u> )
<b>CO</b>	ogljikov monoksid
<b>Ct</b>	število ciklov, pri katerem je presežen prag fluorescence – pražni cikel (angl. <u>cycle threshold</u> )
<b>DAG</b>	diacilglicerol
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	destilirana ultra čista voda
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kislina
<b>dNTP</b>	deoksinukleotid trifosfat
<b>E</b>	učinkovitost (angl. <u>efficiency</u> )
<b>EC</b>	endotelijska celica
<b>ECE</b>	endotelinska konvertaza (angl. <u>endothelin-converting enzyme</u> )
<b>EDHF</b>	iz endotelija sproščeni hiperpolarizirajoči dejavnik (angl. <u>endothelium derived hyperpolarizing factor</u> )
<b>EDN1</b>	gen, ki kodira endotelin-1 (človeški)
<b>Edn1</b>	gen, ki kodira endotelin-1 (podganji)
<b>EDNRA</b>	gen, ki kodira receptor za endotelin-1 tipa A (človeški)
<b>Ednra</b>	gen, ki kodira receptor za endotelin-1 tipa A (podganji)
<b>eNOS</b>	endotelijska NO-sintaza
<b>EPC</b>	endotelijske progenitorne celice

<b>ER</b>	endoplazemski retikulum
<b>ET, ET-1</b>	endotelini, endotelin-1
<b>ET<sub>A</sub></b>	endotelinski receptor tipa A
<b>ET<sub>B</sub></b>	endotelinski receptor tipa B
<b>FRET</b>	prenos energije z resonanco fluorescence (angl. <u>f</u> luorescence <u>r</u> esonance <u>e</u> nergy <u>t</u> ransfer)
<b>GC</b>	gvanilat ciklaza
<b>GMC</b>	gladkomišična celica
<b>GTP</b>	gvanozin-5'-trifosfat
<b>Hmbs</b>	gen, ki kodira encim hidroksimetilbilan sintazo (podganji)
<b>HDL</b>	lipoprotein visoke gostote (angl. <u>h</u> igh- <u>d</u> ensity <u>l</u> ipoprotein)
<b>HIF-1</b>	s hipoksijo inducirani faktor-1 (angl. <u>h</u> ypoxia- <u>i</u> nducible <u>f</u> actor-1)
<b>HMG-CoA</b>	3-hidroksi-3-metilglutaril-koencim A
<b>IP3</b>	inozitol trifosfat
<b>kb</b>	kilo baznih parov
<b>L</b>	losartan
<b>LAF</b>	laminarni pretok zraka (angl. <u>l</u> aminar <u>a</u> ir <u>f</u> low)
<b>LDL</b>	lipoprotein majhne gostote (angl. <u>l</u> ow- <u>d</u> ensity <u>l</u> ipoprotein)
<b>MAP</b>	z mitogenom aktivirani protein (angl. <u>m</u> itogen- <u>a</u> ctivated <u>p</u> rotein)
<b>MAPK</b>	z mitogenom aktivirana proteinska kinaza (angl. <u>m</u> itogen- <u>a</u> ctivated <u>p</u> rotein <u>k</u> inase)
<b>MK</b>	maksimalna kontrakcija
<b>MM</b>	delovna reakcijska mešanica (angl. <u>m</u> aster- <u>m</u> ix)
<b>MR</b>	maksimalna relaksacija
<b>mRNA</b>	informacijska RNA (angl. <u>m</u> essenger RNA)
<b>NADPH</b>	nikotinamidadenindinukleotidfosfat
<b>NF-κB</b>	jedrni dejavnik kapa B (angl. <u>n</u> uclear <u>f</u> actor <u>k</u> appa-light-chain-enhancer of activated <u>B</u> cells)
<b>NK</b>	negativna kontrola
<b>NO</b>	dušikov oksid
<b>NOS</b>	NO-sintaza (angl. <u>n</u> itric <u>o</u> xide <u>s</u> ynthase)
<b>oLDL</b>	oksidirani LDL

<b>P</b>	perindopril
<b>PAF</b>	trombocite aktivirajoč faktor (angl. <u>platelet-activating factor</u> )
<b>PCR</b>	verižna reakcija s polimerazo (angl. <u>polymerase chain reaction</u> )
<b>PIP2</b>	fosfatidilinozitol bifosfat
<b>PKC</b>	protein kinaza C
<b>PLA2</b>	fosfolipaza A2
<b>PLC</b>	fofolipaza C
<b>po</b>	peroralno
<b>PRE</b>	odzivni element za progesteron (angl. <u>progesterone response element</u> )
<b>qPCR</b>	kvantitativni PCR (angl. <u>quantitative real time polymerase chain reaction</u> )
<b>RNA</b>	ribonukleinska kislina
<b>ROS</b>	reaktivne kisikove spojine (angl. <u>reactive oxygen species</u> )
<b>RT-PCR</b>	verižna reakcija s polimerazo v realnem času (angl. <u>reverse transcription polymerase chain reaction</u> )
<b>SR</b>	sarkoplazemski retikulum
<b>Taq polimeraza</b>	termostabilna DNA polimeraza (angl. <i>Thermus aquaticus</i> DNA polymerase)
<b>TGF-β</b>	transformirajoči rastni dejavnik beta (angl. <u>transforming growth factor beta</u> )
<b>TNF-α</b>	dejavnik tumorske nekroze alfa (angl. <u>tumor necrosis factor alpha</u> )
<b>t-PA</b>	tkivni aktivator plazminogena (angl. <u>tissue plasminogen activator</u> )
<b>TT</b>	telesna teža
<b>UTR</b>	neprevedena regija mRNA (angl. <u>untranslated region</u> )
<b>Vezf1</b>	cinkov prst endotelija žil 1 (angl. <u>vascular endothelial zinc finger 1</u> )

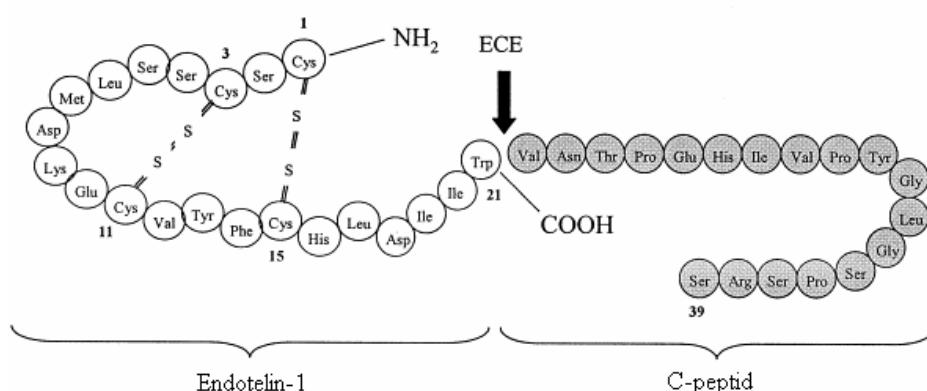
# 1. UVOD

## 1.1. ENDOTELINSKI SISTEM

Endotelini (ET) so skupina endogenih peptidov, ki imajo močan in dolgodeljujoč vazokonstriktivni učinek. Sintetizirajo in sproščajo jih endotelijalne celice (EC) žil. Prvič so bili opisani leta 1988 kot učinkoviti vazoaktivni peptidi, ki uravnava tonus žil, krvni tlak, proliferacijo celic in produkcijo hormonov (1-5).

Do danes so identificirali tri izooblike endotelinov (ET-1, ET-2, ET-3), ki se razlikujejo med seboj tako v strukturi kot tudi v farmakološki aktivnosti. ET-1, ET-2 in ET-3 kodirajo trije različni geni (6). Vsaka izooblika endotelinov se izraža v specifičnem tkivu. ET-1 se večinoma izraža v EC žil, gladkomiščnih celicah (GMC) žil, epitelijskih celicah dihalnih poti, makrofagih, fibroblastih, srčnih miocitih, možganskih nevronih in v reproduktivnih tkivih. Višje ravni ET-2 najdemo v epitelijskih celicah črevesja, ledvicah in v jajčnikih. ET-3 se večinoma izraža v EC, možganskih nevronih, epitelijskih celicah ledvičnih tubulov in črevesja ter uravnava sproščanje vazodilatatorjev, kot sta dušikov oksid (NO) in prostaciklin (PGI<sub>2</sub>) (3, 4).

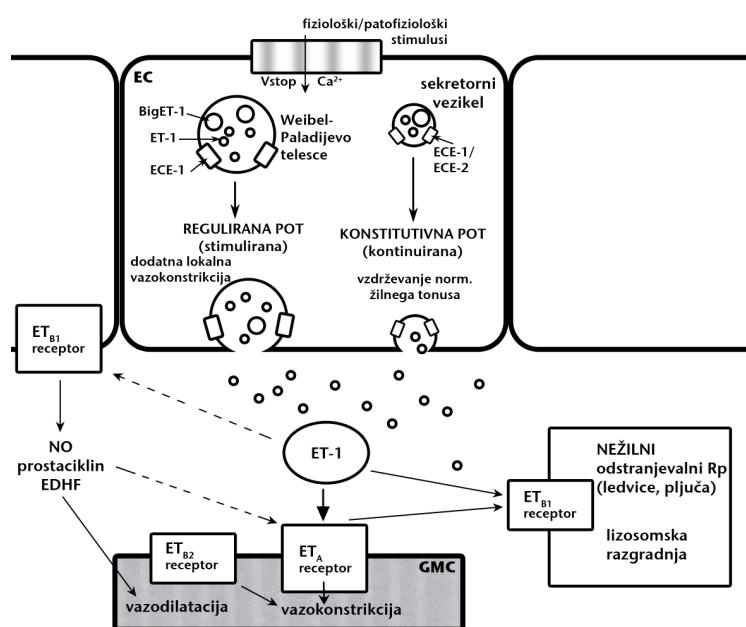
Endotelin-1 ima med vsemi ET najpomembnejšo vlogo v srčno-žilnem sistemu človeka, saj še vedno ostaja najmočnejši do sedaj odkriti endogeni vazokonstriktor. Strukturo ET-1 prikazuje Slika 1 (1). Janes in sodelavci so leta 1994 določili tudi kristalno strukturo in prepoznali ostanke na mestih 10, 17, 18 in 21 kot pomembne za vezavo na ET receptor (7).



Slika 1: Aminokislinsko zaporedje pro endotelina-1:

Endotelinska konvertaza (ECE) cepi 39-aminokislino dolgo pro endotelin-1 (pravični) na 21-aminokislino dolgo endotelin-1 (ET-1) in 18-aminokislino dolgo neaktivno C-peptid (8).

Posebnost ET-1 je njegovo izločanje po dveh sekretornih poteh, kar prikazuje Slika 2.



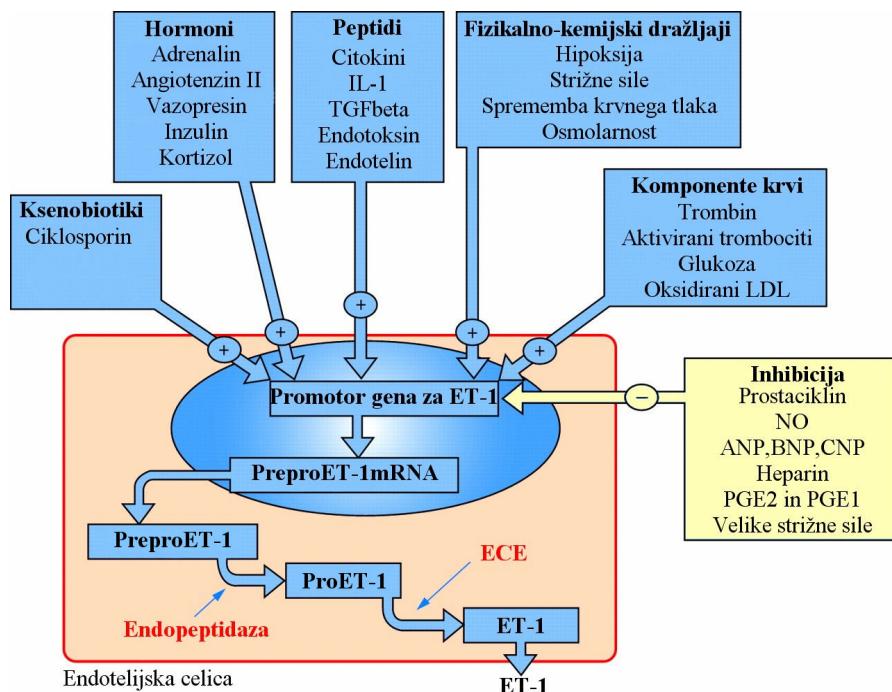
Slika 2: Konstitutivna in regulirana pot izločanja ET-1 (7)

EC žil nenehno izločajo ET-1 iz sekretornih veziklov po konstitutivni poti in na ta način vzdržujejo normalni žilni tonus. Pod vplivom določenih zunanjih fizioloških in patofizioloških dražljajev se ET-1 sprošča tudi iz Weibel-Paladijevih teles, ki so specifični shranjevalni veziki v EC (regulirana pot). Rezultat je dodatna močna vazokonstrikcija GMC (7). ET-1 sodeluje pri razvoju številnih bolezni, med drugim tudi pri aterosklerozi. Ima vlogo rastnega dejavnika, ki uravnava proliferacijo GMC in povzroča zlitje plasti neointime v poškodovanih žilah (9).

### 1.1.1. Sinteza in regulacija ET-1

Sinteza biološko aktivnega peptida ET-1 poteka v več stopnjah. S prepisovanjem humanega gena za ET-1 (*EDN1*) oziroma gena za preproET-1 nastane 2,8 kb dolga mRNA (1). Po prevajanju mRNA nastane izhodna molekula imenovana preproendotelin-1 (preproET-1), ki je pri človeku sestavljena iz 212 aminokislin. Vodilno zaporedje, sestavljeni iz 17-ih aminokislin, usmeri preproET-1 v endoplazemski retikulum (ER), kjer vstopi v sekrecijsko pot. Pred nastopom eksocitoze furinu podobne endopeptidaze cepijo preproET-1 do biološko neaktivnega intermediata proendotelina-1 (proET-1), imenovanega tudi veliki ET (angl. "big ET"), ki vsebuje 38 aminokislin. V zadnji stopnji endotelinske konvertaze (ECE) pretvorijo proET-1 v 21-aminokislin dolg biološko aktiven ET-1 (10) (Slika 3). ECE so na membrane vezane cinkove metaloproteaze, ki se nahajajo v

bližini celic, ki izražajo endoteline. Opisane so tri oblike ECE (ECE-1, ECE-2 in ECE-3), ki se razlikujejo po specifičnosti za izobliko proET (3). Po sintezi se ET-1 shrani v sekretorne vezikle EC, iz katerih se sprosti na abluminalno stran žil po delovanju drugih vazoaktivnih substanc oziroma mehanskih sprožilcev (9). Dejavnike, ki vplivajo na nastajanje in sproščanje ET-1 prikazuje Slika 3.



Slika 3: Dejavniki, ki regulirajo sintezo ET-1

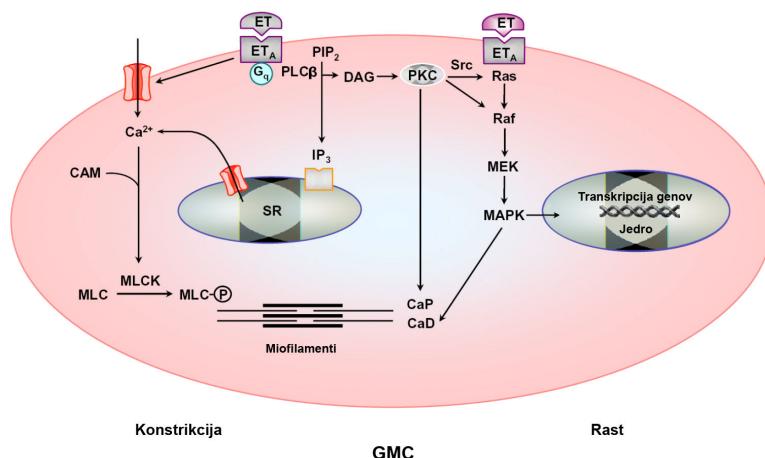
Slika prikazuje tako spodbjevalne (označeni modro) kot tudi zaviralne dejavnike (označeni rumeno), ki vplivajo na sintezo ET-1. ANP, atrijski natriuretični peptid; BNP, možganski natriuretični peptid; CNP,C tip natriuretični peptid; IL-1, inteleukin-1; LDL, nizkomolekularni lipoprotein; PGE, prostaglandin E (11).

Natančen mehanizem delovanja teh dejavnikov je kompleksen in zato še ni popolnoma pojasnjen. Več neodvisnih študij kaže na to, da le-ti vplivajo na hitrost prepisovanja *EDN1* in s tem uravnavajo razpoložljivost ET-1 (1, 10, 12). Le natančno uravnavanje izražanja *EDN1* lahko omogoča raznolike biološke učinke ET-1 v različnih organskih sistemih.

### 1.1.2. Vezava na receptorje in biološki odziv

Sproščeni ET se vežejo na endotelinske receptorje tipa A ( $ET_A$ ) in tipa B ( $ET_{B1}$  in  $ET_{B2}$ ), ki so sklopljeni z G-proteinom (2, 13). V fizioloških pogojih ima  $ET_A$  visoko afiniteto za vezavo ET-1 in ET-2 ter nizko afiniteto do ET-3,  $ET_B$  pa izkazuje enako afiniteto za vse tri ET (4). Receptor  $ET_A$  se večinoma izraža v GMC žil in srčnih miocitih. Vezava ET na  $ET_A$  sproži kaskadno reakcijo preko aktivacije fosfolipaze C beta (PLC $\beta$ ), ki katalizira reakcijo

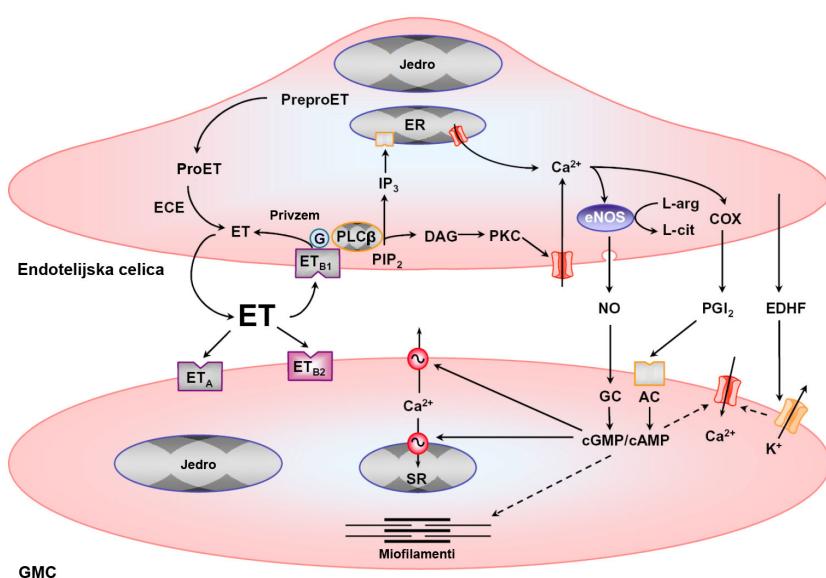
pretvorbe fosfatidilinozitol bifosfata (PIP<sub>2</sub>) v inozitoltrifosfat (IP<sub>3</sub>) in diacilglicerol (DAG), kar prikazuje Slika 4. Vsi prikazani mehanizmi povzročijo porast kalcija v GMC žil in s tem fosforilacijo luhkih verig miozina, kar vodi v dolgotrajno, od endotelija neodvisno vazokonstrikcijo (12, 14). Podaljšan vazokonstriktoren učinek je verjetno posledica same lokalizacije receptorjev v kaveolah (lipidne invaginacije plazemske membrane) in njihova nizka hitrost internalizacije (15). Aktivirani ET<sub>A</sub> poleg vazokonstrikcije sproži nastanek posrednikov, ki spodbudijo proliferacijo in diferenciacijo GMC (12, 14). Ključni regulator teh procesov je MAPK (angl. mitogen-activated protein kinase) (4). MAPK sproži fosforilacijo in aktivacijo transkripcijskih dejavnikov v citoplazmi in jedru in s tem vpliva na izražanje tarčnih genov (16). Poleg receptorjev ET<sub>A</sub>, so na GMC žil v manjši meri prisotni tudi receptorji ET<sub>B2</sub>, ki sprožijo vazokonstrikcijo in proliferacijo po istem mehanizmu kot ET<sub>A</sub> (2, 14).



Slika 4: Mehanizem konstrikcije GMC žil izzvane z endotelini preko receptorja ET<sub>A</sub>

Vezava ET na receptor ET<sub>A</sub> ozziroma ET<sub>B2</sub> vodi v vazokonstrikcijo, proliferacijo in diferenciacijo GMC. CaD, kaldezmon; CAM, kalmodulin; CaP, kalponin; MAPK, MAP kinaza; MLC, luhke verige miozina; MLCK, MLC kinaza (14).

Za razliko od ET<sub>A</sub> in ET<sub>B2</sub>, se receptorji ET<sub>B1</sub> večinoma nahajajo na EC žil in so sodeleženi pri sproščanju vazodilatatorjev, kot so NO, PGI<sub>2</sub> in iz endotelija sproščeni hiperpolarizirajoči dejavnik (EDHF). Z vezavo ET na ET<sub>B1</sub> se aktivira PLC $\beta$ , ki sproži hidrolizo PIP<sub>2</sub> ter sproščanje IP<sub>3</sub> in DAG (Slika 5). Porast koncentracije kalcija v EC aktivira endoteljsko NO-sintazo (eNOS), ki pretvarja L-arginin v L-citrulin in pri tem nastaja NO. Sproščen NO difundira v GMC žil, kjer aktivira gvanilat ciklazo (GC). Prikazani mehanizmi privedejo do znižanja znotrajcelične koncentracije kalcija in končno do vazodilatacije, ki je od endotelija odvisna (2, 12, 14).



**Slika 5:** Mehanizem relaksacije GMC žil izvane z endotelini preko receptorja ET<sub>B1</sub>

Z vezavo ET na receptor ET<sub>B1</sub> pride do relaksacije GMC preko sproščanja NO, PGI<sub>2</sub> ter EDHF. AC, adenilat ciklaza; COX, cikloksigenaza; EDHF, iz endotelija sproščeni hiperpolarizirajoči dejavnik; eNOS, endotelijalska NO-sintaza; GC, gvanilat ciklaza; NO, dušikov monoksid; PGI<sub>2</sub>, prostaciklin. Prekinjene puščice pomenijo inhibicijo. (14)

Na ta način kompenzira učinke, izvane preko ET<sub>A</sub>. Receptor ET<sub>B1</sub> sodeluje tudi pri ponovnem privzemu in očistku ET iz krvnega obtoka (3, 11, 14). Z antagonistom ET receptorja povzročimo blokado ET<sub>B1</sub> in s tem porast imunoreaktivnega ET v krvnem obtoku (7).

Endotelini lahko sproščajo ali krčijo GMC žil, njihov končni učinek pa je odvisen od receptorja, na katerega se vežejo. Normalne plazemske koncentracije ET-1 so nizke (0,4-8,1 pg/mL), kar ne zadošča za aktivacijo ET receptorjev. Raziskovalci predvidevajo, da so ravnvi ET-1 višje v zunajceličnem prostoru med EC in GMC žil (4).

### 1.1.3. Fiziološka in patofiziološka vloga ET-1 v srčno-žilnem sistemu

V zadnjih 25-ih letih so raziskave pokazale, da ima ET-1 zelo raznolike in kompleksne fiziološke funkcije. Vezava ET-1 na receptor ET<sub>A</sub> uravnava naslednje aktivnosti: vazokonstrikcijo, bronhokonstrikcijo, izločanje aldosterona, celično proliferacijo in apoptozo, razvoj zarodka, ledvično funkcijo, nevrofiziološko funkcijo (npr. signaliziranje bolečine), srčno-žilno homeostazo (tonus žil, krvni tlak, prepustnost žil), rast rakavih celic, endokrino funkcijo, vnetje, reproduktivno funkcijo (3). Biološke učinke ET-1 prikazuje

Priloga 1. Najpomembnejša za človeka je njegova vloga v srčno-žilnem sistemu. Študije z uporabo antagonistov ET receptorjev dokazujojo, da ima ET-1 pomembno vlogo pri vzdrževanju bazalnega tonusa žil, krvnega tlaka in krvnega pretoka pri zdravih ljudeh preko aktivacije receptorjev ET<sub>A</sub> v GMC velikih žil (2, 11). Za njegovo delovanje zadostujejo že majhne količine, saj ima močan in dolgodelujoč vazokonstriktorni učinek. Povzroča skrčenje arterij in ven, kar vodi v povečanje skupnega perifernega upora in zvišanje srednjega arterijskega tlaka. NO in PGI<sub>2</sub> zavirata z ET-1 povzročene kontrakcije. NO ima tudi številne zaščitne učinke na žilno steno: deluje protivnetno, zmanjšuje oksidativni stres in preprečuje proliferacijo GMC (17). Neravnotežje v sproščanju ET-1 in NO vodi v spremenjen tonus žil in s tem v razvoj različnih patofizioloških stanj (9).

Vse od odkritja ET do danes je postalo jasno, da ET-1 ni samo močan in dolgodelujoč vazokonstriktor, temveč je multifunkcionalen peptid, ki ima citokinom podobne aktivnosti, ki vplivajo na mnoge celične funkcije (3). ET-1 uravnava procese rasti, sodeluje pri trombogenezi, adheziji nevtrofilcev in ima pomembno avtokrino-parakrino vlogo v endoteliskem vazoaktivnem sistemu. Na srce deluje pozitivno inotropno, kronotropno, vpliva tudi na prepustnost žil (2).

Dejstvo je, da izmerjene povišane vrednosti ET-1 v plazmi pomenijo kritični indikator za številne bolezni in zato niso zaželene. Zvišane ravni ET-1 v plazmi in v tkivih izmerimo pri bolnikih s hiperholisterolemijo, z aterosklerozo, s srčnim popuščanjem in po miokardnem infarktu (9). Zanesljive študije potrjujejo vlogo ET-1 v patofiziologiji določenih bolezni, kot so miokardni infarkti, koronarni vazospazem, akutna ledvična odpoved, Raynaud-jeva bolezen, primarna pljučna hipertenzija in fibroza pri bolezni ledvic (4). ET-1 potencira učinke drugih vazokonstriktorjev in zaradi svojih provnetnih in rast spodbujajočih lastnosti prispeva k nastanku kroničnih vnetnih bolezni, kot so ateroskleroz, poškodba organov zaradi hipertenzije, ledvična in srčna odpoved (3).

## 1.2. ATEROSKLOROZA

Aterosklerozu predstavlja vodilni vzrok obolenosti in je posredni vzrok za skoraj polovico smrti v razvitem svetu, tudi v Sloveniji. Aterosklerozu opredelimo kot kronično napredajočo vnetno bolezen velikih in srednje velikih arterij, za katero je značilno progresivno kopičenje lipidov, veziva, netopnih kalcijevih soli ter spremljajoče vnetje, ki

zajame poleg intime tudi medijo in adventicijo arterijske stene (18). Aterosklerotični proces se začne že v otroštvu in s starostjo počasi napreduje ter povzroči postopno zoženje svetline arterije. Med dejavnike tveganja za aterosklerozo prištevamo dislipidemijo, arterijsko hipertenzijo, sladkorno bolezen, življenjski slog (premalo gibanja, stres, kajenje) in motnje koagulacije oziroma fibrinolize (18, 19). Večina od njih najprej povzroči motnje v delovanju EC.

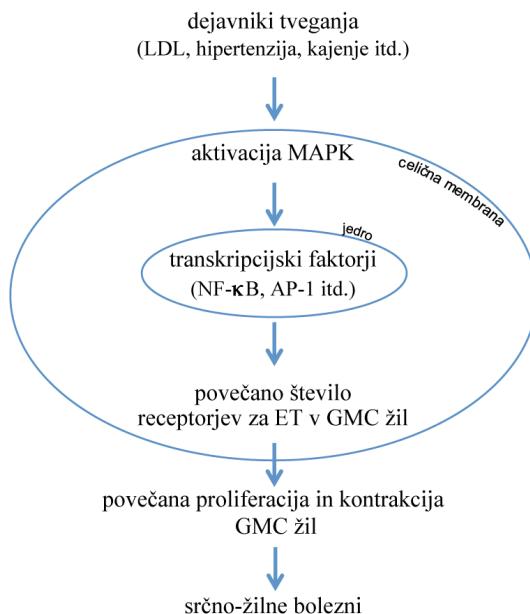
V najnovejših raziskavah med pomembne dejavnike tveganja za aterosklerozo prištevajo tudi staranje in z njim povzročene funkcionalne in strukturne spremembe arterij (17, 20). Staranje povzroča okrnjeno delovanje endotelija, ki je predvsem posledica zmanjšanega nastajanja, sproščanja in razpoložljivosti NO (zaradi znižanja izražanja eNOS in povečanega nastanka reaktivnih kisikovih spojin - ROS) (21). Poleg okrnjene sposobnosti razširitve arterij se s staranjem povečuje tudi togost arterij, zoža se svetlina žil in zadebelita se intima in medija (20). Omenjene spremembe vodijo v nastanek ateroskleroze in zato predstavljajo pomemben napovedni znak za srčno-žilne dogodke. Številni dokazi potrjujejo, da lahko z zdravili, ki preprečujejo razvoj ateroskleroze (statini, ACE inhibitorji in sartani) zmanjšamo ali v celoti odpravimo motnje v delovanju endotelija (21).

### **1.2.1. Vloga ET-1 v patogenezi ateroskleroze**

Raziskave kažejo, da ET-1 sodeluje v zgodnji stopnji razvoja ateroskleroze (22). Pri bolnikih z dejavniki tveganja za srčno-žilna obolenja, kot so hiperholisterolemija, hipertenzija in sladkorna bolezen, so izmerili zvišane plazemske koncentracije ET-1, povečanje izražanja ET receptorjev v žilni steni in zmanjšano razpoložljivost NO (4, 11). Na različnih stopnjah razvoja aterosklerotičnega plaka so izmerili povečano aktivnost ECE in posledično tudi zvečano sproščanje ET-1 v EC, GMC žil in makrofagih.

Glavna tarča ET-1 je žilna stena. Poleg že opisanega učinkovitega vazokonstriktivnega delovanja, ET-1 spodbuja adhezijo monocitov, invazijo makrofagov, proliferacijo GMC žil, poveča mikrovaskularno prepustnost endotelija (zlasti za lipide) in izstop albumina iz žile (23). Omenjena stanja vodijo k zgodnji okvari endotelija, za katero je značilno neravnovesje med vazokonstriktijskim (provnetni dejavniki) in vazodilatacijskim delovanjem, predvsem na račun zmanjšane sinteze, sproščanja in razpoložljivosti NO (20, 21). To spodbudi celično rast, vnetje, trombozo in nazadnje preoblikovanje žilja, kar so

značilnosti zgodnje stopnje v razvoju ateroskleroze (18-22). Nastanek aterosklerotične lehe nazorno prikazuje Priloga 2. Pri bolnikih z aterosklero佐 obstaja statistično značilna pozitivna povezava med plazemskimi koncentracijami ET-1 in številom aterosklerotičnih lezij. Zvišana koncentracija ET-1 inducira izražanje genov vpletenih v nastanek produktov metabolizma lipidov, kar vodi v razvoj ateroskleroze (4). V GMC in penastih celicah aterosklerotičnih plakov je močno povečana tudi gostota receptorjev  $ET_A$  in  $ET_B$ . Več študij potrjuje, da je povečanje števila ET receptorjev tesno povezano z razvojem srčno-žilnih obolenj. Kljub velikim prizadevanjem raziskovalcem do danes še ni uspelo razložiti molekularnih mehanizmov, ki vodijo v povečanje števila ET receptorjev. Zadnje študije predvidevajo, da dejavniki tveganja za srčno-žilne bolezni spodbujajo izražanje ET receptorjev v GMC preko aktivacije signalnih poti z MAPK in transkripcijskega dejavnika NF-κB, kar prikazuje Slika 6 (24).



**Slika 6:** Vpliv dejavnikov tveganja na zvišano izražanje endotelinskih receptorjev v GMC preko z MAPK uravnanih NF-κB signalnih poti (24).

Teoretično bi lahko v prihodnosti z zaviranjem od MAPK odvisnih signalnih mehanizmov pridobili nov terapevtski pristop, ki bi za razliko od antagonistov ET receptorjev preprečil kopiranje ET-1 v krvnem obtoku in zaviral proliferacijo GMC.

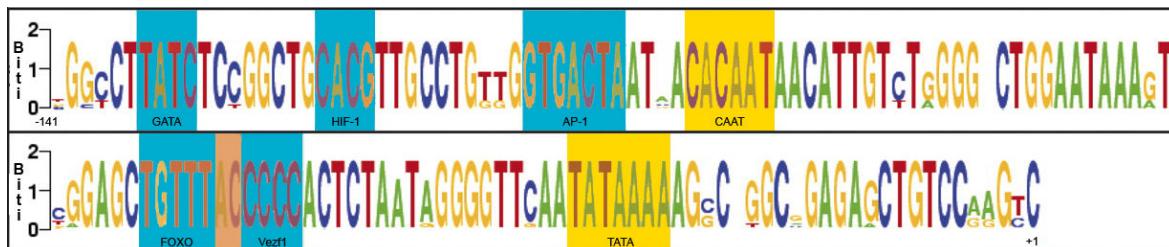
Študije na živalskih modelih s hiperhololesterolemijo in aterosklero佐 dokazujojo, da antagonisti ET receptorjev zvišajo aktivnost NOS, izboljšajo z NO uravnavano vazodilatacijo ter zmanjšajo nastanek aterosklerotičnih lezij. Antagonisti namreč zavrejo

proliferacijo GMC žil in vnetje ter izboljšajo delovanje poškodovanega endotelija. Vsi ti podatki potrjujejo pomembno vlogo endotelinskega sistema v razvoju okvare endotelija in napredovanju ateroskleroze. Antagonisti ET receptorjev in inhibitorji ECE zaradi svoje verjetne vloge v preprečevanju ateroskleroze ostajajo potencialno zanimiva zdravila za zdravljenje srčno-žilnih obolenj (11). Trenutno se antagonisti ET receptorjev klinično uporabljajo le za zdravljenje bolnikov s pljučno arterijsko hipertenzijo, saj imajo hude stranske učinke, kot je zadrževanje tekočine v telesu (4, 24).

### 1.3. GEN ZA ET-1 IN GEN ZA ENDOTELINSKI RECEPTOR TIPA A

#### 1.3.1. *Edn1*

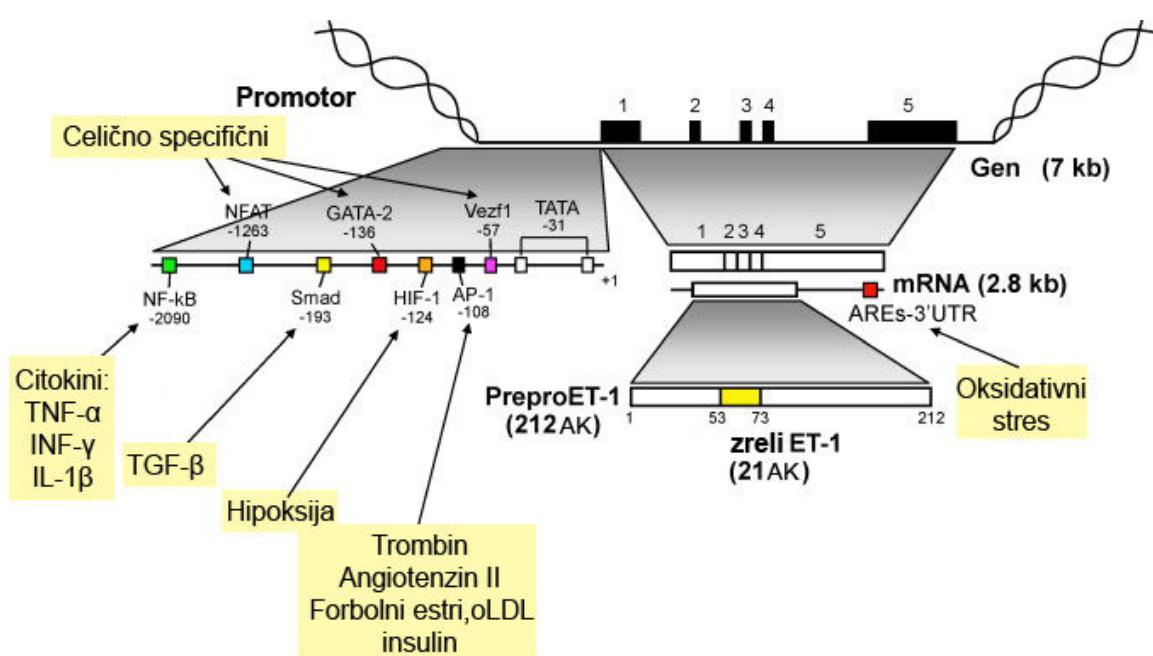
Gen za ET-1 se pri človeku (*EDN1*) nahaja na 6. kromosому, na položaju 6p24.1, pri podgani (*Edn1*) pa na 17. kromosому, na položaju 17p12. Pri sesalcih meri v dolžino približno 6,9 kb in vsebuje 5 eksonov, ki nosijo zapis za 2,8 kb dolgo mRNA. Poleg primarnega mesta iniciacije prepisovanja so odkrili tudi alternativno mesto, ki se nahaja 65 bp pred primarnim mestom. Le-to naj bi bilo pomembno pri izražanju *EDN1* v srcu in možganih. Med različnimi vrstami sesalcev so v proksimalnem delu promotorja ugotovili številna ohranjena nukleotidna zaporedja, kar prikazuje Slika 7.



Slika 7: Dobro ohranjena nukleotidna zaporedja v proksimalnem delu promotorja med različnimi vrstami sesalcev

Višina vsakega nukleotida, izražena v bitih, ponazarja relativno ohranitev zaporedja na določenem odseku. Meritev 2.0 bita pomeni 100% ohranitev zaporedja pri vseh analiziranih vrstah sesalcev (10).

Promotor gena *EDN1* vsebuje pogoste cis-delujoče elemente in pomembne celično specifične inducibilne elemente. Večina le-teh se nahaja znotraj 150 bp levo od mesta iniciacije prepisa (Slika 8). V bližini zaporedij TATA in CAAT se nahaja vezavno mesto za transkripcijski dejavnik cinkov prst endotelija žil 1 (Vezf1), ki je specifičen za EC. Aitsebaomo in ostali so dokazali, da se Vezf1 specifično veže na promotor gena *EDN1* in da je vezavno mesto za Vezf1 odgovorno za bazalno in z inzulinom spodbujeno izražanje *EDN1* v EC (25).



Slika 8: Regulacija izražanja *EDN1*

Prikazani so ključni cis-delujoči elementi v promotorju *EDN1* in 3' neprevedeni regiji mRNA (UTR) skupaj z dejavniki, ki spodbujajo izražanje *EDN1*. AP-1, proteinski aktivator-1; AREs, z adeninom in uridinom bogate regije; HIF-1, s hipoksijo inducirani dejavnik-1; NFAT, jedrni dejavnik aktiviranih limfocitov T; NF-κB, jedrni dejavnik kapa B; Vezf-1; cinkov prst endotelija žil-1(26).

Med ključne elemente promotorja gena *EDN1* spada tudi vezavno mesto za proteinski aktivator-1 (AP-1). AP-1 je transkripcijski dejavnik, ki uravnava izražanje gena kot odziv na citokine, rastne faktorje in druge provnetne in proliferativne signale. Analiza mutacij vezavnega mesta za AP-1 je pokazala, da je AP-1 nujno potreben tudi pri bazalni transkripciji *EDN1* v kulturi EC. Homocistein, polifenol resveratrol iz rdečega vina in zdravila za diabetike iz skupine agonistov peroksisom proliferator aktiviranega receptorja gama (PPAR $\gamma$ ), preprečujejo vezavo AP-1 na promotor *EDN1* in s tem zavirajo izražanje *EDN1*. Navedeni primeri še dodatno potrjujejo, kako pomembna je vloga AP-1 pri uravnavanju izražanja *EDN1* tako na bazalni ravni, kot tudi v primeru stimulacije (10, 27).

Jedrni dejavnik kapa B (NF-κB) je transkripcijski proteinski kompleks, ki aktivira izražanje *EDN1* v različnih tipih celic. Samo heterodimeri NF-κB (p65/p50) naj bi zvišali izražanje *EDN1*, medtem ko prisotnost same podenote p50 vodi v znižanje transkripcije *EDN1* (10). Stimulacija z TNF- $\alpha$ , z interferonom gama (INF- $\gamma$ ), z interlevkinom-1 $\beta$  in drugimi citokini aktivira signalno pot preko fosfoinozitid 3-kinaze (PI3K). Oleinska kislina

pa preko aktivacije od kalcija odvisne PKC prav tako privede do vezave NF- $\kappa$ B in s tem do zvišanja ravni izražanja *EDN1*. Izražanje *EDN1* pod vplivom citokinov je vpleteno v različne vnetne procese, kamor spada tudi aterosklerozu.

Dosedanje študije potrjujejo, da so spremembe v izražanju *EDN1* povezane s patogenezo in napredovanjem številnih bolezni ljudi, vključno s srčno-žilnimi boleznimi. Genski polimorfizem v promotorski regiji *EDN1* naj bi bil povezan z večjo pojavnostjo hipertrofije levega prekata. Vključitev adenina v 5' neprevedeno regijo (UTR) *EDN1* povzroči zvišane ravni mRNA in je povezana z esencialno hipertenzijo in ortostatsko intoleranco. Tudi nekatera zdravila lahko motijo izražanje *EDN1*, npr. prej omenjeni agonisti PPAR $\gamma$ . To so zdravila za diabetike, ki zavirajo vezavo ključnega transkripcjskega dejavnika AP-1 na promotor *EDN1*. Posledično znižanje izražanja *EDN1* naj bi bilo povezano z nastankom edema, kar je tudi stranski učinek omenjenih zdravil (10). Vedno bolj postaja jasno, kako pomembna je kontrola izražanja *EDN1* na področjih fiziologije, patofiziologije in farmakologije.

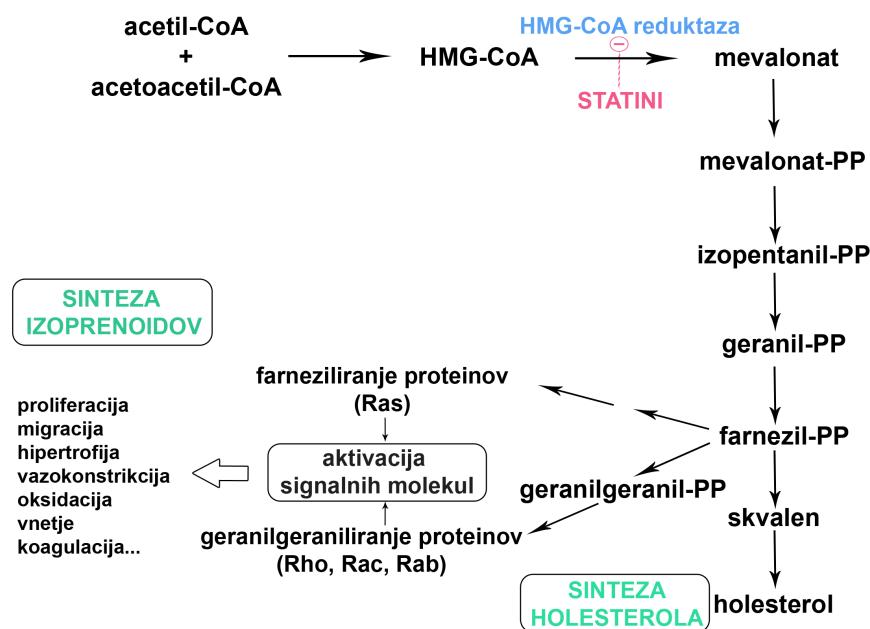
### 1.3.2. *Ednra*

Gen, ki kodira endotelinski receptor tipa A se pri človeku (*EDNRA*) nahaja na 4. kromosому, na položaju 4q31.22 (28), pri podgani (*Ednra*) pa na 19. kromosому, na položaju 19q11. V dolžino meri približno 40 kb in vsebuje 8 eksonov ter 7 intronov. Hosoda in sodelavci so prvi izolirali in okarakterizirali *EDNRA* in ugotovili, da je 4,3 kb dolga mRNA prisotna v različnih tkivih, a v aorti v najvišji koncentraciji. Določili so tudi začetno mesto transkripcije, ki se nahaja 502 bp od začetnega kodona ATG (28). Yamashita in sodelavci so identificirali cis-delujuče elemente in jedrne dejavnike, ki uravnavajo izražanje *EDNRA* (29, 30). Določili so sekvenco pozitivnega regulatornega elementa CCCCCACCTT in potrdili njegovo pomembno vlogo pri izražanju *Ednra* (30, 31). Dimondo in sodelavci so primerjali zaporedja nukleotidov pri podgani in človeku in ugotovili 57% podobnost v 5'-koncu in 63% podobnost v 5'-neprevedeni regiji (31). Čeprav je *EDNRA* vpletен v pomembne fiziološke, patofiziološke in razvojne procese, do danes še niso odkrili molekularnih mehanizmov, ki uravnavajo njegovo izražanje. Več študij navaja vpletenost PKC in MAPK poti v uravnavanje izražanja *EDNRA* (16, 24, 32). Z zaviranjem teh znotrajceličnih signalnih poti bi lahko znižali raven izražanja *EDNRA* in s tem zavirali oziroma preprečevali razvoj srčno-žilnih bolezni.

## 1.4. SUBTERAPEVTSKI ODMERKI STATINOV, ANTAGONISTOV RECEPTORJA ZA ANGIOTENZIN II IN ACE INHIBITORJEV

### 1.4.1. Statini in njihovi pleiotropni učinki (atorvastatin)

Statini so najučinkovitejša zdravila za zniževanje serumskih vrednosti holesterola. Njihov osnovni mehanizem delovanja je kompetitivno zaviranje encima 3-hidroksi-3-metilglutaril-koencimA (HMG-CoA) reduktaze, ki ima ključno vlogo pri biosintezi holesterola v jetrih (Slika 9) (33).



Slika 9: Biosinteza holesterola v jetrih in mesto delovanja statinov (33)

Statini z blokado encima HMG-CoA reduktaze ne zavirajo le sinteze holesterola, temveč tudi nastanek izoprenoidov, kar je najverjetnejši mehanizem pleiotropnega delovanja statinov. PP; pirofosfat (33, 34)

Poleg zniževanja serumskega holesterola imajo statini tudi dodatne, zaščitne pleiotropne učinke (od holesterola neodvisne), kar prikazuje Preglednica I (33-35). Pleiotropni učinki statinov so predvsem posledica zaviranja nastanka nesteroidnih izoprenoidnih intermediatov (npr. farnezilpirofosfat, geranylgeranylpirofosfat), ki nastajajo pri biosintezi holesterola in so vključeni v aktivacijo znotrajceličnih signalnih molekul (Slika 9) (33). Gre za zaviranje majhnih GTP-vezavnih proteinov, kot so Rho, Ras, Rac, Rab in Ral, katerih delovanje in lokalizacija na membrani sta odvisna od izoprenilacije (34). Prenilirani proteini imajo pomembno vlogo pri sestavi prenašalnih molekul RNA, sintezi glikoproteinov, pri delovanju celične membrane, pri celičnem signalizirjanju, proliferaciji in diferenciaciji. Statini preprečijo nastanek kovalentne vezi med cisteinskimi ostanki

proteinov in farnezilom oziroma geranilgeranilom (t.j. preniliranje) omenjenih regulatornih proteinov. (33, 35).

**Preglednica I:** Zaščitni pleiotropni učinki statinov (antiaterogeni) in njihov mehanizem delovanja (33-35)

ZAŠČITNI PLEIOTROPNI UČINKI	MEHANIZEM DELOVANJA
<b>Izboljšanje delovanja endotelija</b> → izboljšan vazodilatatorni odziv	Spodbujanje izražanja in aktivnosti eNOS Zaviranje izražanja in sinteze ET-1 Zmanjšan nastanek prostih radikalov Zmanjšana oksidacija LDL holesterola Podaljševanje življenjske dobe EC
<b>Zmanjšanje vnetnega odziva</b>	Zmanjšano število in zmanjšana aktivnost vnetnih celic (zaviranje adhezijskih molekul, npr. ICAM1) Zmanjšan nivo C-reaktivnega proteina (CRP)
<b>Zmanjšanje oksidativnega stresa</b> → zmanjšanje nastajanja superoksidnega aniona ( $O_2^-$ ), endogenih peroksidov, peroksinitrilnih radikalov	Povečano izražanje hem oksigenaze-1 → povečano nastajanje CO in bilirubina (antioksidanta) Zmanjšano izražanje in zaviranje delovanja NADPH-oksidaze (pomemben pri nastanku ROS) Povečanje encimske aktivnosti paraoksonaze-1 (preprečuje nastanek oLDL)
<b>Imunomodulatorno delovanje</b> → vpliv na diferenciacijo, proliferacijo in sekretorno dejavnost monocitov, makrofagov in limfocitov T	Zaviranje z interferoni posredovanega izražanja molekul glavnega histokompatibilnega kompleksa-II na makrofagih, EC, GMC Pospešena pretvorba celic pomagalk Th <sub>1</sub> v Th <sub>2</sub>
<b>Stabilizacija aterosklerotičnih plakov</b>	Povečana vsebnost kolagena v plaku Zaviranje vnetnih procesov Zmanjšano nastajanje in zmanjšana aktivnost metaloproteinaz (razgrajujoče fibrozni pokrov plaka) Zmanjšano kopičenje holesterola v makrofagih Omejitve proliferacije in migracije GMC
<b>Zaviranje trombogenega odziva</b>	Zaviranje adhezije, agregacije in aktivacije trombocitov Povečano izražanje t-PA (fibrinoliza) Zmanjšana viskoznost krvi

Najnovejše raziskave kažejo, da bi statini lahko izkazovali zaščitne pleiotropne učinke že pri subterapevtskih odmerkih. To so nizki odmerki statinov, ki so nižji od tistih, ki pomembno znižajo raven holesterola v serumu. Na kliničnem oddelku za žilne bolezni v UKC Ljubljana so opravili randomizirano, dvojno slepo, s placebom kontrolirano pilotno

študijo navidezno zdravih moških srednjih let, ki so 30 dni prejemali nizke odmerke fluvastatina (10 mg dnevno). Ugotovili so, da subterapevtski odmerki fluvastatina bistveno izboljšajo in zmanjšajo zgodnje funkcionalne (okrnjeno delovanje endotelija) in strukturne (togost žil) spremembe arterijske stene, ki so posledica staranja. S študijo so potrdili zaščitne pleiotropne učinke nizkih odmerkov fluvastatina, ki so bili neodvisni od znižanja holesterola (36). Karter in sodelavci so primerjali učinke atorvastatina v višjih koncentracijah (80 mg) z učinki atorvastatina v nizkih koncentracijah (20 mg) pri bolnikih, ki so imeli hiperholesterolemijo kot edini dejavnik tveganja za aterosklerozo. Prišli so do zaključka, da visoke koncentracije atorvastatina bolj učinkovito znižajo raven lipidov v serumu, vendar že nizke koncentracije zadoščajo za izboljšanje delovanja endotelija (boljša razpoložljivost NO) (37). Učinkovitost statinov je torej odvisna od njihove koncentracije. Z uporabo nižjih koncentracij zdravil se pomembno zmanjša tudi pojavnost neželenih stranskih učinkov (manjša hepatotoksičnost v primeru atorvastatina). Ugotovili so, da je za izkazovanje pleiotropnih učinkov pomembna lipofilnost statinov (34, 35). Bolj lipofilni statini (npr. simvastatin, atorvastatin) namreč lažje prehajajo celično membrano kot hidrofilni (npr. pravastatin, rosuvastatin), ki za to potrebujejo posebne transporterje v jetrih. V klinični študiji na bolnikih s hiperlipidemijo je lipofilni atorvastatin po 12-ih tednih zmanjšal oksidativni stres in izboljšal od endotelija odvisno vazodilatacijo, medtem ko hidrofilen pravastatin ne (38). Predhodno omenjene študije nakazujejo, da bi lahko v prihodnje subterapevtske odmerke statinov uporabljali kot preventivni ukrep pri preprečevanju napredovanja začetnih aterosklerotičnih sprememb, ki so posledica staranja.

#### **1.4.2. Antagonisti receptorja za angiotenzin II (losartan)**

Antagonisti receptorja za angiotenzin II (sartani) so skupina zdravil za zdravljenje arterijske hipertenzije, ki predstavlja pomemben dejavnik tveganja za srčno-žilne bolezni. To so nepeptidne zdravilne učinkovine, ki visoko specifično in selektivno blokirajo receptor za angiotenzin II podtipa 1 (AT1), ki se nahaja predvsem v žilah. Vežejo se na področje, kamor se veže fiziološki mediator oktapeptid angiotenzin II (Ang II), kar povzroči konformacijsko spremembo receptorja. Na ta način je preprečena vezava in delovanje agonista Ang II (kompetitivna inhibicija). Rezultat delovanja sartanov je zavrt učinek z Ang II povzročene vazokonstrikcije, aktivacije simpatika, zadrževanje natrija in vode, sproščanje aldosterona ter srčne in žilne hipertrofije ter posledično znižanje krvnega tlaka (39). Poleg že omenjenih učinkov Ang II spodbuja migracijo in proliferacijo GMC v

arterijski steni, pospeši odlaganje kolagena, vpliva na sestavo zunajceličnega matriksa, spremeni strukturo in debelino arterijske stene, spodbuja sproščanje ET iz endotelija žil, zmanjša razpoložljivost NO, sproži disfunkcijo endotelija ter na ta način pomembno prispeva k preoblikovanju žilja (40, 41). Sartani posledično poleg znižanja krvnega tlaka izkazujejo tudi zaščitne pleiotropne učinke na žilje, kar potrjujejo mnoge klinične študije (41, 42). Čeprav imajo sartani med seboj primerljiv učinek pri zniževanju krvnega tlaka, pa se njihovi zaščitni pleiotropni učinki na žilje močno razlikujejo (41). Takai in sodelavci so ugotovili, da imajo sartani z večjo lipofilnostjo (telmisartan) bolj izražene zaščitne učinke na žilje kot sartani z nizko lipofilnostjo (losartan) (43). Kljub temu losartan izkazuje določene edinstvene lastnosti, ki pomembno prispevajo k zaščiti srčno-žilnega sistema in jih ostali sartani nimajo (Preglednica II) (42, 44-46).

**Preglednica II:** Zaščitni pleiotropni učinki losartana na žilje in njihov mehanizem delovanja

PLEIOTROPNI UČINKI LOSARTANA	MEHANIZEM DELOVANJA
<u>Izboljšanje delovanja endotelija</u>	Spodbujanje nastanka in funkcije endotelijskih progenitornih celic (EPC) pri hipertenziji (47)
<u>Zmanjšanje vnetnega odziva</u>	Zmanjšana število in aktivnost vnetnih celic
<u>Zmanjšanje oksidativnega stresa</u>	Spodbujanje izražanja eNOS (43) Zmanjšano izražanje podenote NADPH-oksidaze (pomemben pri nastanku ROS) (43)
<u>Stabilizacija aterosklerotičnih plakov</u>	Zmanjšana vsebnost kolagena in elastina Zmanjšano nastajanje metaloproteinaz (48)
<u>Zaviranje trombogenega odziva</u>	Zaviranje adhezije, s tromboksanom A2 povzročene aktivacije in agregacije trombocitov (44, 49, 50)

Do danes je bilo izvedenih mnogo kliničnih študij, ki potrjujejo ugodne pleiotropne učinke sartanov na žilje in srce, vendar večinoma v terapevtskih koncentracijah in pri pacientih z že določenim tveganjem za srčno-žilna obolenja (41, 42). Študija Porteria in sodelavcev pri spontano hipertenzivnih podghanah potrjuje zmanjšano vsebnost kolagena v aorti pri večtedenski uporabi nizkih odmerkov olmesartana (51). V zadnjem času se pojavlja vprašanje o možnosti uporabe nizkih odmerkov sartanov, ki bi teoretično lahko izboljšali delovanje endotelija neodvisno od znižanja krvnega tlaka že pri zgodnjih spremembah ateroskleroze.

#### 1.4.3. Zaviralci angiotenzinske konvertaze (perindopril)

Ang II ima ključno vlogo pri napredovanju ateroskleroze po mehanizmih, že opisanih v besedilu. Njegove učinke lahko preprečimo tudi z zaviranjem encima angiotenzinske konvertaze (ACE), ki katalizira pretvorbo dekapeptida Ang I v aktiven oktapeptid Ang II. Zdravila, ki kompetitivno zavirajo delovanje ACE, se imenujejo zaviralci ACE (ACE-inhibitorji), ki poleg zmanjšane proizvodnje Ang II zavrejo tudi razgradnjo bradikinina, ki je močan vazodilatator z antioksidativnim in antiapoptotičnim učinkom. To še dodatno prispeva k razširitvi žil in s tem k znižanju krvnega tlaka (39, 52). Številne študije potrjujejo klinično učinkovitost ACE-inhibitorjev pri primarnem in sekundarnem preprečevanju srčno-žilnih dogodkov (52-55). Zadnji klinični in eksperimentalni podatki o ACE-inhibitorjih kažejo, da z delovanjem na endotelij žil pomembno zmanjšajo napredovanje ateroskleroze (52, 56). Klinična učinkovitost ACE-inhibitorjev je močno odvisna od njihovih pleiotropnih učinkov (neodvisnih od znižanja krvnega tlaka) (57). Med vsemi ACE-inhibitorji po svojih lastnostih izstopa perindopril (lipofilnost, boljša penetracija v tkivo, visoka afiniteta za tkivno ACE, dolgo delovanje, selektivnost za vezavno mesto za bradikinin), ki izkazuje edinstvene zaščitne pleiotropne učinke (Preglednica III) (57-59).

**Preglednica III:** Zaščitni pleiotropni učinki perindoprla na žilje in njihov mehanizem delovanja

PLEIOTROPNI UČINKI PERINDOPRILA	MEHANIZEM DELOVANJA
<u>Izboljšanje delovanja endotelija</u> → zaščita endotelija	Poveča izražanje in aktivnost eNOS (59) Zaviranje apoptoze EC (52) Spodbuja nastanek EPC iz kostnega mozga (52)
<u>Zmanjšanje vnetnega odziva</u>	Zmanjšanje ravni CRP in ostalih označevalcev sistemskega vnetja v plazmi (TNF- $\alpha$ ) (52, 57) Zaviranje sproščanja citokinov iz monocitov in limfocitov (60)
<u>Zmanjšanje oksidativnega stresa</u>	Znižuje raven oLDL (57) Znižuje povišano raven Ang II in TNF- $\alpha$ (52)
<u>Stabilizacija aterosklerotičnih plakov</u>	Znižanje Ang II zmanjša proliferacijo GMC žil ( $\downarrow$ nagnjenost za razpok plaka) (61)
<u>Zaviranje trombogenega odziva</u>	Zaviranje aktivacije trombocitov Znižuje ravni PAI-1 in zvišuje ravni t-PA ( $\uparrow$ fibrinoliza) (61)

## 2. NAMEN IN DELOVNE HIPOTEZE

Namen diplomske naloge bo izmeriti in statistično analizirati izražanje gena za endotelin-1 (*Edn1*) in gena za receptor za endotelin tipa A (*Ednra*) v tkivu podganjih torakalnih aort in ugotoviti vpliv terapije na njuno izražanje ter povezanost izražanja obeh genov s funkcijskimi spremembami na podganji torakalni aorti pri subterapevtskih odmerkih izbranih zdravil za zmanjšanje tveganja za aterosklerozo. Zanima nas, ali že subterapevtski odmerki atorvastatina, losartana, perindoprila in kombinacije atorvastatina in losartana ter atorvastatina in perindoprila vplivajo na izražanje preučevanih genov.

Preverili bomo sledeče delovne hipoteze:

- 1) Subterapevtske koncentracije atorvastatina, losartana, perindoprila oziroma kombinacija atorvastatina in enega od omenjenih antihipertenzivov znižajo izražanje *Edn1* v tkivu podganje torakalne aorte.
- 2) Subterapevtske koncentracije atorvastatina, losartana, perindoprila oziroma kombinacija atorvastatina in enega od omenjenih antihipertenzivov znižajo *Ednra* v tkivu podganje torakalne aorte.
- 3) Izražanje *Edn1* je povezano s funkcijskimi spremembami na podganji torakalni aorti (s sposobnostjo maksimalne relaksacije oziroma maksimalne kontrakcije podganje torakalne aorte) pri subterapevtskih odmerkih atorvastatina, losartana, perindoprila oziroma pri kombinaciji atorvastatina in enega od omenjenih antihipertenzivov.
- 4) Izražanje *Ednra* je povezano s funkcijskimi spremembami na podganji torakalni aorti (s sposobnostjo maksimalne relaksacije oziroma maksimalne kontrakcije podganje torakalne aorte) pri subterapevtskih odmerkih atorvastatina, losartana, perindoprila oziroma pri kombinaciji atorvastatina in enega od omenjenih antihipertenzivov.

Z namenom, da bi lahko potrdili ali ovrgli zgornje hipoteze, bomo v vzorcih komplementarne DNA (cDNA), prepisane iz RNA izoliranih podganjih torakalnih aort izmerili izražanje *Edn1* oziroma *Ednra* s pomočjo metode kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR). Dobljene normalizirane vrednosti izražanja genov bomo primerjali s podatki o sposobnosti maksimalne relaksacije in maksimalne kontrakcije

istih aortnih obročkov, ki smo jih pridobili na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Potrjene hipoteze bi pomenile, da lahko že subterapevtski odmerki atorvastatina, losartana, perindoprila oziroma njihove kombinacije preko izražanja preučevanih vazoaktivnih genov zaščitno vplivajo na srčno-žilni sistem podgan. To bi bil prvi korak k odkrivanju možnosti, da bi se v prihodnosti lahko preučevane zdravilne učinkovine uporabljale že v subterapevtskih odmerkih kot preventiva srčno-žilnih obolenj pri ljudeh, pri katerih zaznamo napredajoče znake srčno-žilne bolezni. Vsekakor bi potrjene hipoteze odprle nove možnosti za preučevanje znotrajceličnih molekularnih mehanizmov zaščitnega delovanja subterapevtskih odmerkov preučevanih zdravil in na ta način prispevale k boljšemu razumevanju le-teh.

### 3. MATERIALI IN METODE

V okviru diplomske naloge smo v vzorcih komplementarne DNA (cDNA), obratno prepisanih iz izoliranih RNA, iz tkiva podganjih torakalnih aort izmerili izražanje *Edn1* in *Ednra* s pomočjo kvantitativne metode verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR, angl. quantitative reverse transcription polymerase chain reaction). Izmerili smo tudi izražanje hišnega gena *Hmbs*, ki smo ga potrebovali za standardizacijo izražanja. Standardizirane rezultate smo na koncu statistično analizirali.

Študija je potekala v sodelovanju z raziskovalno skupino na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, pod vodstvom višjega znanst. sod. dr. Gorazda Drevenška, univ. dipl. biol., vodje laboratorija za srčno-žilno farmakologijo. Omenjena raziskovalna skupina je izvedla poskuse na živalih, razdelitev v skupine, njihovo obravnavo, vzrejo, tretiranje z zdravili v določenih časovnih intervalih, žrtvovanje, izolacijo podganjih torakalnih aort ter merjenje odstotka maksimalne relaksacije (MR) in maksimalne kontrakcije (MK) aortnih obročkov.

Izolacijo celokupne RNA iz vzorcev obročkov torakalne aorte podgan, preverjanje kvalitete izolirane RNA in obratno prepisovanje v cDNA je izvedla druga raziskovalna skupina na Katedri za klinično biokemijo, na Fakulteti za farmacijo.

#### 3.1. POSKUSNE ŽIVALI IN ODMERKI UČINKOVIN

V študijo je bilo vključenih 60 načeloma zdravih odraslih Wistar podgan obeh spolov (niso imele hipertenzije), ki so tehtale med 230 in 280g. Vzgojili so jih v konstantnih klimatskih pogojih (temperatura okolja: 24+/- °C). Krmili so jih s standardno prehrano za podgane v obliki briketov (Altromin št. 1320, Lage, Nemčija). Dnevno-nočna osvetlitev se je menjala na 12 ur. Živali so imele ves čas na razpolago poljubno količino vode. Tekom poskusa so jih redno tehtali in jim merili krvni tlak. Podgane so naključno razdelili v naslednje preiskovane skupine:

- 1) Skupina podgan, ki je prejemala vodo iz pipe (kontrolna skupina)
- 2) Skupina podgan, ki je prejemala atorvastatin (2 mg/kg/dan) peroralno (p.o.)
- 3) Skupina podgan, ki je prejemala losartan (5 mg/kg/dan) p.o.

- 4) Skupina podgan, ki je prejemala perindopril (0,6 mg/kg/dan) p.o.
- 5) Skupina podgan, ki je prejemala kombinacijo atorvastatina in losartana (2 mg/kg/dan in 5mg/kg/dan) p.o.
- 6) Skupina podgan, ki je prejemala kombinacijo atorvastatina in perindoprila (2 mg/kg/dan in 0,6 mg/kg/dan) p.o.

Uporabljeni so bili nizki odmerki zdravilnih učinkovin, ki predstavljajo 20% spodnje terapevtske koncentracije. Podgane so bile obravnavane različno dolgo, in sicer 4, 6, 8 ali 10 tednov. Po tem času so bile pod anestezijo žrtvovane, odvzeli so jim vzorce krvi in izolirali torakalne aorte. Pripravljenim obročkom torakalne aorte podgan so izmerili od endotelija odvisen odstotek maksimalne relaksacije in odstotek maksimalne kontrakcije. Zdravila atorvastatin (v obliki kalcijevega atorvastatinata), losartan (v obliki kalijevega losartanata) in perindopril (v obliki terc-butil aminijevega perindoprilata) je priskrbela Krka, tovarna zdravil, d.d., Novo mesto, Slovenija. Vse učinkovine so razredčili z destilirano vodo in s tako pripravljenimi raztopinami po peroralni poti hranili podgane od 4 do 10 tednov. Vzorce izoliranih podganjih torakalnih aort so po izolaciji hitro zamrznili v tekočem dušiku (pri temperaturi -196 °C) in jih hranili v zamrzovalniku, pri temperaturi -80 °C do izolacije RNA. Vsi poskusi na podghanah so bili izvedeni v skladu s smernicami Veterinarske uprave Republike Slovenije (z dovoljenjem št. 34401-23/2009/3).

### **3.1.1. Izolacija torakalne aorte**

Torakalno aorto posamezne podgane so izolirali, sprali, secirali, ji odstranili maščobno in vezivno tkivo ter jo previdno prečno narezali na 4-6 valjastih obročkov dolžine 3-4 mm in pri tem pazili, da niso poškodovali endotelija. Pripravljene aortne obročke so namestili v kivete naprave za poskuse na izoliranih žilah, ki so bile napolnjene s Krebs-Henseleitovo raztopino naslednje sestave (v mM): NaCl 118, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 2.5, NaHCO<sub>3</sub> 25, MgSO<sub>4</sub> 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 in glukoza 11 (vse Merck, Darmstadt, Nemčija).

### **3.1.2. Merjenje odstotka maksimalne relaksacije in maksimalne kontrakcije izoliranih torakalnih aort podgan**

Pred poskusom so aortne obročke za 60 minut uravnotežili na mirovni napetosti 20 mN. Medtem so K-H raztopino menjavali vsakih 10 minut. Ko so bile napetosti aortnih obročkov pri 20 mN stabilne, so posamezne obročke trikrat skrčili z dodatkom 60 mmol/L KCl dokler niso dosegli stabilnih kontrakcij (enakomernost odziva). Po izpiranju so

preučevali relaksacijo aortnih obročkov, predhodno skrčenih s fenilefrinom ( $\alpha_1$  adrenergični agonist) koncentracije 1  $\mu\text{mol/L}$ , tako da so dodajali kumulativne koncentracije acetilholina (od endotelija odvisen vazodilatator) (0,1 nmol/L – 0,1 mmol/L). Maksimalno kontrakcijo so določili s podobnim postopkom, tako da so po doseženi mirovni napetosti v kivete z obročki postopno dodajali ustrezne kumulativne koncentracije vazokonstriktorja fenilefrina. Spremembe električne napetosti so po analogno-digitalni pretvorbi (NI PCI-6013; National Instruments, Austin, TX, USA) zapisovali na trdi disk osebnega računalnika in jih obdelali s programsko opremo Dewesoft 6.0 (Dewetron, Trbovlje, Slovenija). Rezultate so podali kot % MR in % MK.

Omenjene rezultate smo prejeli od raziskovalne skupine z Inštituta za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, ki smo jih uporabili za statistično analizo korelacije med izražanjem genov *Edn1* in *Ednra* in sposobnostjo maksimalne relaksacije oziroma kontrakcije podganje torakalne aorte.

## 3.2. VZORCI

### 3.2.1. Oznake vzorcev

Vzorci izoliranih podganjih torakalnih aort, ki smo jih pridobili na Katedro za klinično biokemijo, na Fakulteti za farmacijo od raziskovalne skupine z Inštituta za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete v Ljubljani so bili razvrščeni v skupine glede na vrsto in čas trajanja terapije in so bili ustrezeno označeni s črkami in številkami (npr. 4A10, 6A5, 8AP2, 10AL3, K1). Podgane so v posameznih skupinah 4, 6, 8 ali 10 tednov prejemale različno vrsto terapije, zato prva številka predstavlja čas trajanja terapije v tednih. S črkami pa je označena vrsta terapije, kar prikazuje Preglednica IV.

**Preglednica IV:** Oznake vzorcev po vrsti terapije, ki so jo prejemale podgane

VRSTA TERAPIJE	OZNAKA SKUPINE
tekoča voda (kontrola)	K
atorvastatin	A
losartan	L
perindopril	P
Atorvastatin in losartan	AL
atorvastatin in perindopril	AP

Od vseh preiskovanih vzorcev ( $n = 60$ ) torakalnih aort podgan jih 12 predstavlja kontrolno skupino (imajo oznako K). To so vzorci podgan, ki so namesto zdravil prejemale le tekočo vodo. Preostalih 48 vzorcev je bilo dobljenih od podgan, ki so bile tretirane peroralno z raztopinami subterapevtskih odmerkov A, L, P in s kombinacijami AL ter AP kot je navedeno pri obravnavi poskusnih živali. Omenjenih oznak vse do zaključka laboratorijskega dela nismo poznali, saj je predhodna raziskovalna skupina vzorce oštevilčila z oznakami VZ1-VZ60. Posledično nismo vedeli, kateri vzorci so bili tretirani in kateri ne (slepa študija).

### **3.2.2. Izolacija celokupne RNA**

Postopek izolacije celokupne RNA, preverjanje kvalitete izolirane RNA in obratno prepisovanje v cDNA so izvedli na Katedri za klinično biokemijo, na Fakulteti za farmacijo.

Za izolacijo celokupne RNA so potrebovali približno 200 mg v tekočem dušiku uprašenega tkiva treh podganjih torakalnih aortnih obročkov ene živali in komercialni reagenčni komplet za izolacijo RNA s kolono, Pure Link<sup>TM</sup> RNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA). Celoten postopek so izvedli v skladu z navodili proizvajalca (62). Z namenom optimalne lize tkiva so dodali reagent TRIzol<sup>®</sup> (vsebuje fenol in gvanidin-izotiocianat), ki zavira RNaze ter obori in denaturira proteine. Po inkubaciji so z dodatkom kloroform in centrifugiranjem ločili posamezne plasti ter zgornjo vodno plast, ki vsebuje RNA prenesli v novo epruveto in ji dodali enako količino 70% etanola. Nastalo raztopino so prenesli v kolono, ki veže RNA in le-to eluirali s sterilno destilirano vodo brez RNaz. Za merjenje koncentracije in določanje čistosti celokupne RNA so uporabili spektrofotometer NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 (Thermo Scientific) in izmerili  $A_{260}$  in  $A_{280}$ . Izvedli so tudi analizo integritete (ocena razgrajenosti) izolirane celokupne RNA s pomočjo analizatorja Agilent 2100 Bioanalayser (Agilent Technologies, Palo Alto, Kalifornija), kakor navaja proizvajalec (63).

### **3.2.3. Reverzna transkripcija**

Zaradi izjemne neobstojnosti iz tkiva izoliranih celokupnih RNA, ker so le-te občutljive na RNaze in se hitro razgradijo, jih moramo za lažje rokovanje prevesti v stabilnejšo cDNA. Reverzna transkripcija oziroma obratno prepisovanje je postopek, pri katerem z encimom reverzno transkriptazo, enoveržino RNA prevedemo v enoveržno cDNA (64). Nastalo

stabilnejšo molekulo cDNA običajno uporabimo kot matrico za eksponentno pomnoževanje z uporabo metod PCR.

Postopek sinteze enoverižne cDNA so izvedli iz 10 mg celokupne RNA z uporabo komercialnega reagenčnega kompleta High-Capacity cDNA Archivekit (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija) in cikličnega termostata po navodilu proizvajalca (65). Omenjeni komplet vsebuje poleg encima reverzne transkriptaze še naključne začetne oligonukleotide, deoksinukleotide (dNTP) in ustrezni pufer. Tako pripravljene vzorce cDNA so shranili v zamrzovalniku pri temperaturi -80°C.

### **3.3. MATERIALI IN APARATURE**

#### **3.3.1. Laboratorijski material:**

- polavtomatske nastavljive pipete: 0,1-2,5 µL, 2-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- avtoklavirani nastavki za pipete: do 10 µL, do 200 µL, do 1000 µL (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- avtoklavirane mikrocentrifugirke: 0,5 mL, 1,5 mL (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- stojalo za mikrocentrifugirke
- mikrotitrskra ploščica MicroAmp® Optical 96-Well reaction Plate with Barcode (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, ZDA)
- prozorna samolepilna folija MicroAmp® Optical Adhesive Film (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, ZDA)
- lepilni trak z indikatorjem
- pinceta
- rokavice za enkratno uporabo

#### **3.3.2. Uporabljene aparature:**

- avtoklav Kambič A-21 (Kambič Laboratorijska oprema d.o.o, Semič, Slovenija) z območjem sterilizacije od 101°C - 135 °C
- delovna komora z laminarnim pretokom zraka: DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M-AR (BioSan, Riga, Latvija)
- centrifuga CENTRIC 322A (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

- vibracijski mešalnik FVL-2400N, CombiSpin (BioSan, Riga, Latvija)
- vibracijski mešanik Vortex-Genie® 2 (Scientific Industries, Orlando, Florida, ZDA)
- hladilniki (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- zamrzovalnik pri temperaturi -80°C in zamrzovalnik pri temperaturi -20°C
- aparatura za PCR v realnem času: ciklični termostat ABI Prism® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, ZDA)

### **3.3.3. Uporabljeni reagenti:**

- komercialni reagenčni komplet za izvedbo qPCR: FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche Diagnostics Corporation, Roche Applied Science, Indianapolis, ZDA). To je dvakrat koncentrirana reakcijska mešanica, ki vsebuje encim termostabilno Taq DNA-polimerazo, reakcijski pufer, Mg<sup>2+</sup>, deoksinukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dUTP) in referenčno barvilo. Ker je občutljiv, ga tekom dela hranim na ledu v črni posodi in pokritega s folijo (občutljiv je na svetlobo).
- komercialni reagenčni komplet 20-krat koncentriranih oligonukleotidnih začetnikov in hidrolizirajočih sond TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster city, Kalifornija, ZDA) za merjenje izražanja preučevanih genov podgan:
  - za tarčni gen *Edn1* (oznaka: Rn00561129\_m1)
  - za tarčni gen *Ednra* (oznaka: Rn00561137\_m1)
  - za hišni gen *Hmbs* (oznaka: Rn00565886\_m1)
- destilirana ultra čista voda (dH<sub>2</sub>O)
- 3% hipoklorit za čiščenje delovne površine
- 10% etanol za čiščenje delovne površine in vse opreme v komori

### **3.3.4. Pripravljene uporabljene raztopine:**

- pripravljene razredčitve standardov t. i. "pool cDNA" za pripravo standardnih umeritvenih krivulj za določanje izražanja *Edn1*, *Ednra* in *Hmbs* (opisano kasneje pri postopku qPCR)
- delovna reakcijska mešanica MasterMix za vsak gen posebej (opisano kasneje pri postopku qPCR)

### **3.3.5. Uporabljena programska oprema:**

- programska oprema za ciklični termostat ABI Prism® 7000 SDS: SDS v1.2x System Software
- statistični program SPSS (IBM SPSS statistics 19, version 19.0.0)

## **3.4. METODE**

### **3.4.1. Merjenje izražanja *Edn1*, *Ednra* in *Hmbs* z metodo qPCR (kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času)**

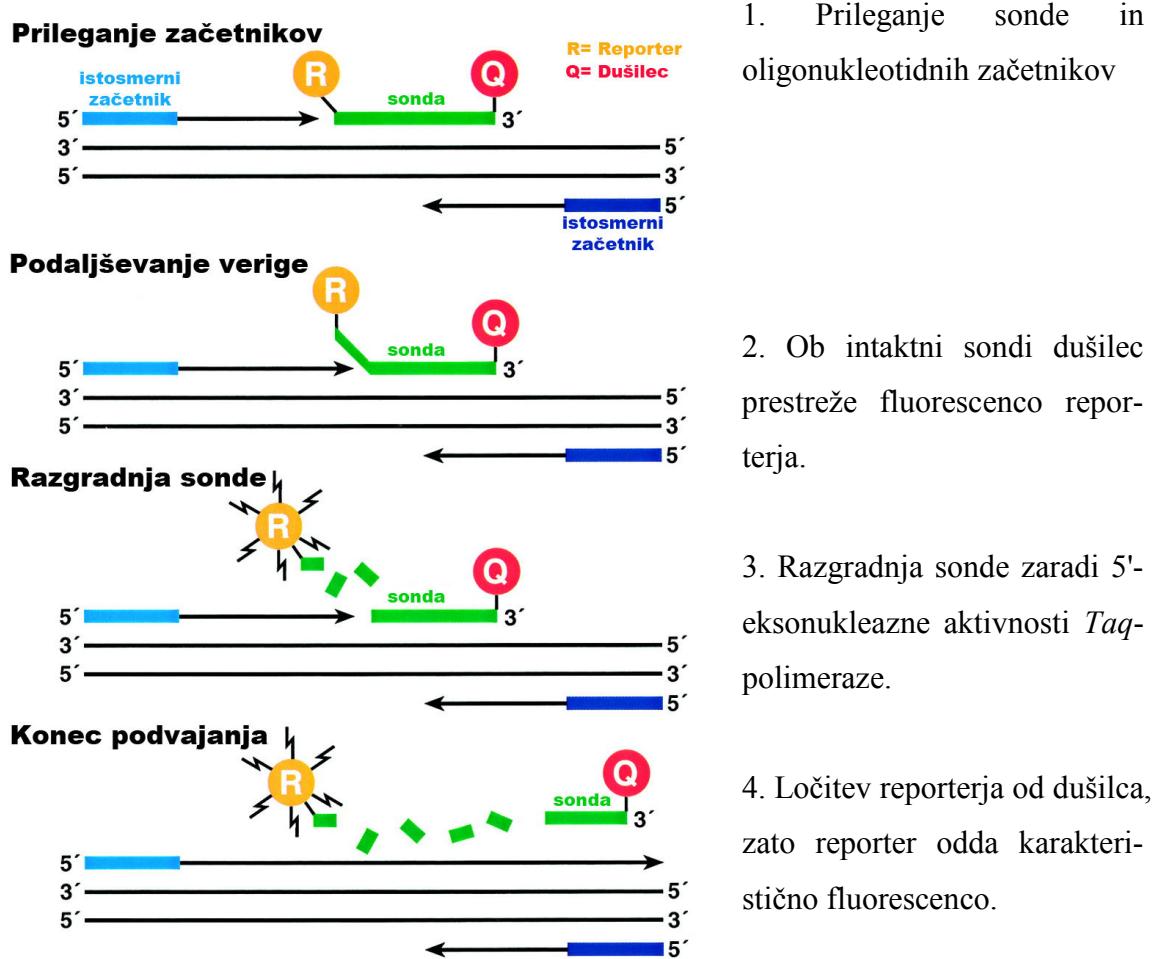
V našem eksperimentalnem delu za diplomsko nalogu smo v vzorcih cDNA podganjih torakalnih aort izmerili izražanje preučevanih genov *Edn1* in *Ednra* ter hišnega gena *Hmbs* s pomočjo metode kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR). Pri tem smo uporabili metodo relativne kvantifikacije z uporabo ustreznih standardnih krivulj. Izmerjene vrednosti smo standardizirali z izbranim hišnim genom *Hmbs* in jih statistično ovrednotili.

#### **3.4.1.1. Princip qPCR**

Metoda qPCR je ena izmed najpomembnejših in največkrat uporabljenih metod za preučevanje izražanja genov na področju molekularne biologije. Predstavlja in vitro metodo za hitro pomnoževanje določenega zaporedja DNA s termostabilno polimerazo. Iz matrične DNA dobimo več tisoč njenih kopij. Pomeni nadgradnjo konvencionalne PCR metode, saj omogoča kontinuirano detekcijo in kvantifikacijo pomnoženega specifičnega zaporedja DNA v vsakem ciklu med reakcijo ne le po končanem pomnoževanju (66). Na ta način lahko spremljamo reakcijo v fazi, ko količina produkta narašča eksponentno, kar nam omogoča natančnejše ugotavljanje začetnega števila kopij matrične DNA v preiskovanem vzorcu. Teoretično se število kopij DNA v vsakem ciklu podvoji, vendar to velja le v eksponentni fazi, zato je le ta primerna za merjenje količine nastalega produkta. V kasnejših ciklih se reakcija upočasni (faza platoja) zaradi kopičenja nastalih produktov, ki reakcijo zavirajo (64). Metoda qPCR temelji na merjenju fluorescence s pomočjo aparature cikličnega termostata. Ločimo nespecifični način detekcije nastalega produkta (detekcija s fluorescentnimi barvili, npr. SYBR Green®) in specifični način detekcije (detekcija s specifičnimi sondami, npr. TaqMan®). Metodo qPCR lahko uporabimo za absolutno ali relativno kvantifikacijo nukleinskih kislin.

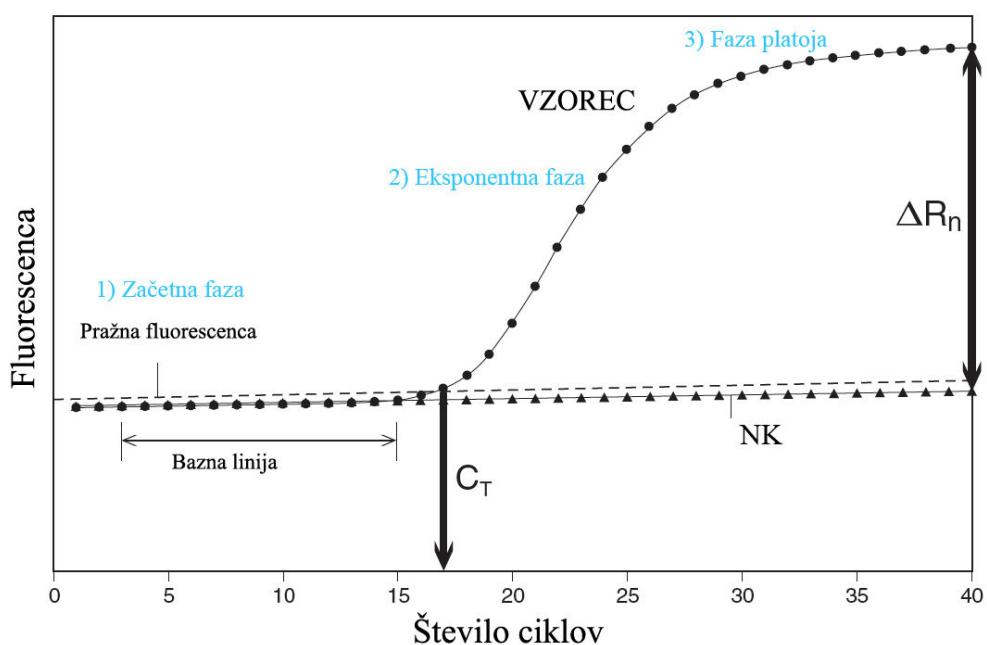
### 3.4.1.2. Princip detekcije produkta s hidrolizirajočimi TaqMan sondami

Za detekcijo količine produktov PCR reakcije smo v našem eksperimentu uporabili specifične hidrolizirajoče sonde TaqMan® Gene Expression Assays za posamezne preučevane gene, ki prepoznajo določeno nukleotidno zaporedje in se nanj vežejo. Uporabljeni sondi TaqMan® so označene z dvema flurescentnima barviloma, in sicer na 5' – koncu imajo vezano donorsko barvilo (reporter) FAM (6-karboksi fluorescin) ter na 3' – koncu akceptorsko barvilo (dušilec) MGB (angl. Minor groove binder). Reporter pri intaktni sondi fluorescenco oddaja, bližnji dušilec pa to fluorescenco prestreže. Pri tem pride do prenosa energije z enega na drugega in ne pride do emisije fotona. Metoda temelji na tehnologiji prenosa energije z resonanco fluorescence (angl. fluorescence resonance energy transfer - FRET), ki predstavlja od razdalje odvisno interakcijo med barviloma. Med podvajanjem tarčnega odseka *Taq*-polimeraza zaradi svoje 5' - eksonukleazne aktivnosti sondi razgradi in posledično se barvili oddaljita kot prikazuje Slika 10 .



Slika 10: Principe delovanja hidrolizirajočih TaqMan® sond (67)

Zaradi povečane razdalje med njima dušilec ne more več prestreči fluorescence reporterja, zato pri ekscitaciji reporter zasveti, kar na grafu detektiramo kot porast fluorescence. Porast fluorescenčnega signala je direktno sorazmeren številu molekul PCR produkta v eksponentni fazi reakcije. Po končanem pomnoževanju nam računalnik izriše krivuljo pomnoževanja, ki prikazuje odvisnost fluorescence od števila cikla reakcije (Graf 1). V eksponentni fazi določimo pražno fluorescenco, ki predstavlja signal, kjer je intenziteta odziva značilno višja od ozadja. Pražni cikel (angl. threshold cycle,  $C_t$ ) je torej cikel, pri katerem fluorescence preseže nastavljeni prag. Vrednosti  $C_t$  so obratno sorazmerne z začetnim številom kopij DNA (64).



**Graf 1:** Krivulja pomnoževanja produkta PCR (68)

Graf prikazuje jakost fluorescence v odvisnosti od števila ciklov pomnoževanja pri qPCR. Detekcija je možna v eksponentni fazi pomnoževanja.  $C_t$ , pražni cikel; NK, negativna kontrola;  $\Delta R_n$ (jakost fluorescence)=  $R_n -$  bazna linija

### 3.4.1.3. Opis postopka merjenja izražanja *Edn1*, *Ednra* in *Hmbs*

V vsakem od vzorcev cDNA smo izmerili izražanje preučevanih genov *Edn1*, *Ednra* in izbranega hišnega gena *Hmbs*. Za posamezen gen smo sočasno merili njegovo izražanje v pripravljenih vzorcih, negativnih kontrolah (NK), kot tudi v postopnih razredčitvah standardov iz predhodno pripravljene zaloge vzorcev cDNA (angl. pool ali stock). Negativne kontrole so nam služile za ugotavljanje morebitnih nečistot, saj so namesto vzorčne cDNA vsebovale destilirano ultra čisto vodo ( $dH_2O$ ). Negativna kontrola je morala

dati negativen rezultat, kar je pomenilo da ni prišlo do pomnoževanja cDNA (angl. undetected). S tem smo potrdili zanesljivost dobljenih rezultatov in ustreznost njihove interpretacije.

Postopek:

**1) Izračun potrebnih količin za pripravo "pool-a", standardov, delovne reakcijske mešanice, vzorcev in priprava delovne sheme**

Pred pričetkom dela v delovni komori smo si morali preračunati količino posameznih sestavin z upoštevanjem prebitka (zaradi izgub pri pipetiranju), ki smo jih potrebovali za pripravo "pool-a" cDNA, za pripravo postopnih razredčitev standardov, za pripravo delovnih reakcijskih mešanic t. i. master mix (MM) za posamezen gen in za pripravo vzorcev. Začetna koncentracija prepisanih vzorcev cDNA je bila 56 ng/µL. Za lažje delo smo si prehodno pripravili tudi shematsko tabelo označeno s predvidenim položajem pipetiranih mešanic na mikrotitrski plošči.

**2) Priprava reakcijske mešanice za qPCR v delovni komori**

Iz sedmih naključnih vzorcev cDNA s koncentracijo 56 ng/µL smo si najprej pripravili "pool" cDNA, s pomočjo katerega smo najprej pripravili osnovni standard (St.1) in iz njega postopne razredčitve standardov v koncentracijah, kot jih prikazuje spodnja Preglednica V. Standard 2 smo tako pripravili iz polovične količine St.1 in ga razredčili z enako količino dH<sub>2</sub>O. Na ta način smo pripravili tudi ostale razredčitve standardov. Uporabili smo jih za pripravo standardnih krivulj. Po vsaki pripravi posameznega standarda smo vsakega posebej dobro premešali na vibracijskem mešalu.

**Preglednica V:** Količine za pripravo postopnih razredčitev standardov za posamezen gen za tri plošče

Standard	Koncentracije standardov (ng/µL)	Volumen c DNA (µL)	Volumen dH <sub>2</sub> O (µL)	Končni volumen (µL)	Prenos v naslednje redčenje
St.1	14	30	90	120	60
St.2	7	60	60	120	60
St.3	3,5	60	60	120	60
St.4	1,75	60	60	120	60
St.5	0,88	60	60	120	

V nadaljevanju smo pripravili vse preiskovane vzorce. Vse vzorce smo redčili tako, da je bila njihova koncentracija enaka koncentraciji drugega standarda, torej  $c=7$  ng/ $\mu$ L. Pripravljene vzorce in standarde smo hranili v hladilniku, a ne več kot en teden, saj bi lahko prišlo do razpada in ne bi bili več primerni za analizo. Pripravili smo tudi delovno reakcijsko mešanico (angl. Master Mix - MM) za vsak posamezen gen. Njene komponente in njihove volumne, ki smo jih napipetirali v mikrocentrifugirko prikazuje Preglednica VI.

**Preglednica VI:** Sestava delovne reakcijske mešanice (MM) in njihovi volumni za posamezen gen

Komponente reakcijske mešanice MM za posamezen gen	Uporabljen volumen za posamezno reakcijo ( $\mu$ L)
20x Taqman® Gene Expression Assay (Applied Biosystems) (specifične sonde za posamezne gene <i>Edn1</i> , <i>Ednra</i> in <i>Hmbs</i> )	0,6
2x FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche Diagnostics Corporation)	7,5
dH <sub>2</sub> O	1,9

Vse uporabljene standarde, NK, vzorce smo pred uporabo dobro premešali na vibracijskem mešalu. Tudi pripravljeno reakcijsko mešanico MM smo večkrat premešali pred in med uporabo.

### 3) Priprava mikrotitrskih plošč

Na mikrotitrskie plošče s 96-im luknjicami MicroAmp® Optical 96-Well reaction Plate with Barcode (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, ZDA) smo vse vzorce nanašali v trojnikih, standarde v štirikratnikih, NK v dvojniku po pripravljeni delovni shemi (Priloga 3). Najprej smo v vse luknjice napipetirali 10  $\mu$ L pripravljene reakcijske mešanice MM za preučevan gen. Potem smo glede na delovno shemo odpipetirali po 5  $\mu$ L standardov oziroma 5  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O pri negativnih kontrolah (NK) oziroma po 5  $\mu$ L vzorca. Končni volumen reakcijske raztopine v posamezni luknjici je tako znašal 15  $\mu$ L. Sestavo končne reakcijske zmesi pripravljene za eno reakcijo qPCR prikazuje Preglednica VII.

**Preglednica VII:** Sestava končne reakcijske zmesi za eno reakcijo qPCR

Sestavine končne reakcijske zmesi za qPCR	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
20x Taqman® Gene Expression Assay (sonda za posamezen gen)	0,6
Reagenčni komplet 2x FastStart Universal Probe Master (Rox)	7,5
dH <sub>2</sub> O	1,9
Vzorec cDNA (c = 7 ng/ $\mu\text{L}$ ) ali razredčitev standarda ali NK	5
Končni volumen reakcije	15

Pri delu smo vse reagente hranili na ledu in jih pokrili s folijo ter jih takoj po uporabi zamrznili. Pri analizi izražanja posameznega gena smo uporabili 3 mikrotitrskie plošče.

**4) Pomnoževanje s cikličnim termostatom**

Po končanem nanosu smo mikrotitrskie plošče prelepili s samolepilno folijo, vse skupaj dobro premešali na vibracijskem mešalu in ploščo postavili v centrifugirko za 2 minuti na 1900 obratov, da smo odstranili prisotne zračne mehurčke. Ploščo smo nato vložili v ciklični termostat ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, ZDA) in pričeli z delom po navodilih proizvajalca (68). V programu SDS v1.2x System Software računalnika, ki je povezan s cikličnim termostatom, smo definirali položaje vzorcev, standardov in kontrol, definirali uporabljeni fluorescentna barvila in končni volumen reakcije 15  $\mu\text{L}$  ter pričeli z analizo. Reakcija pomnoževanja je potekala v treh stopnjah pod navedenimi pogoji:

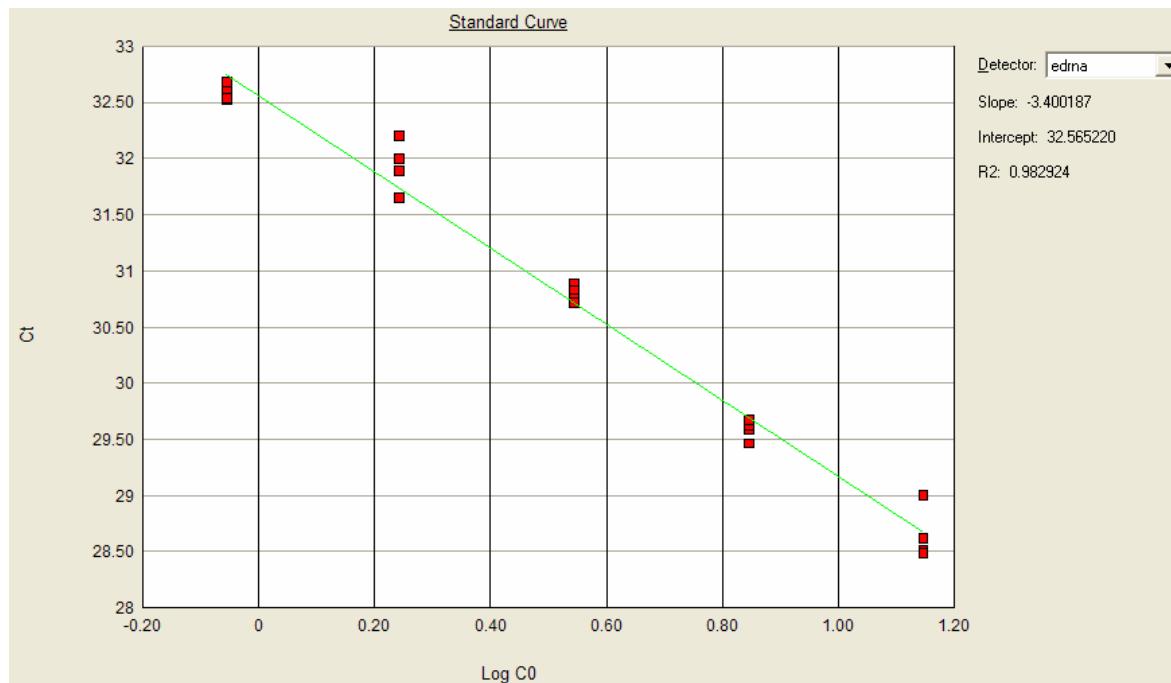
- 1) preinkubacija (2 min pri T = 50°C)
- 2) denaturacija (10 min pri T = 95°C)
- 3) 40 ciklov: denaturacija DNA (15 s pri T = 95°C) ter  
prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje verige  
(1min pri T=60°C)

Med reakcijo smo lahko opazovali potek in uspešnost pomnoževanja z opazovanjem naraščanja intenzitete fluorescence.

**5) Analiza rezultatov**

Po zaključenem pomnoževanju nam je računalniški program ABI Prism® 7000 SDS: SDS v1.2x System Software izrisal amplifikacijske krivulje (angl. amplification plot), ki prikazujejo kinetiko pomnoževanja tarčnega zaporedja ter prikazal rezultate analize v obliki tabele. Za vsako meritev je določil prazni cikel (C<sub>t</sub>), pri katerem je fluorescenčni

signal presegel vrednost praga. Izrisal nam je tudi standardno krivuljo (angl. standard curve), ki predstavlja odvisnost  $C_t$  vrednosti od logaritma začetne koncentracije vzorca (Graf 2). Standardno krivuljo smo oblikovali iz predhodno pripravljenih postopnih razredčitev standardov znanih koncentracij cDNA. Na osnovi izmerjene vrednosti  $C_t$  vzorca lahko s pomočjo standardne krivulje določimo logaritem njegove začetne koncentracije.



**Graf 2:** Primer standardne krivulje za Ednra s programom ABI Prism® 7000 SDS

Iz naklona standardne krivulje lahko določimo učinkovitost pomnoževanja (angl. efficiency - E) po naslednji enačbi:

$$E = (10^{(-1/\text{naklon})} - 1) \times 100$$

Standardna krivulja je ustrezna, če znaša E med 90-110%, kar ustreza naklonu med -3,1 in -3,6. Idealna učinkovitost je 100%, kar pomeni, da bi se količina cDNA v vsakem ciklu podvojila med eksponentno fazo pomnoževanja. Iz standardne krivulje določimo tudi determinacijski koeficient ( $R^2$ ), ki pove kako dobro se meritve prilegajo standardni krivulji (merilo linearnosti). Njegova vrednost mora biti čim bližje vrednosti 1 (meritve ležijo na premici). Pri analizi smo morali izpolniti pogoj  $R^2 \geq 0,99$ , kar odraža zanesljivost analize. V primeru, da so posamezne meritve bistveno odstopale, smo le-te izločili, da smo dosegli najboljši možen naklon in  $R^2$ . Preverili smo variabilnost med meritvami  $C_t$  v replikatih s

pomočjo standardne deviacije (SD). Standardna deviacija je morala ustrezati pogoju  $SD \leq 0,2$ . V primeru večjega odstopanja SD med replikati, smo morali meritve ponoviti, saj je to pomenilo nepravilnost pipetiranja. S pomočjo NK smo preverili, ali je med laboratorijskim delom prišlo do morebitne kontaminacije. Pri NK nismo zabeležili nobenega izražanja genov, saj naj bi vsebovale le dH<sub>2</sub>O.

**OPOMBA:** Pri nekaterih vzorcih nismo zaznali fluorescence pri celotnem trojniku, zato jih nismo mogli kvantificirati. Razlog je verjetno slabši prepis iz RNA v cDNA, premajhna količina cDNA ali slabše izražanje gena v vzorcu.

### **3.4.2. Standardizacija na hišni gen (normalizacija)**

Rezultate analize smo kvantificirali z normalizacijo izražanja tarčnega gena na izražanje hišnega gena. Ker je qPCR zelo občutljiva metoda, je izbor ustreznega stabilnega hišnega gena zelo pomemben, saj le-ta zelo vpliva na samo interpretacijo izmerjenih rezultatov (66). Na podlagi statističnega algoritma geNorm® in literature so med devetimi kandidatnimi geni, kot najprimernejši hišni gen (angl. housekeeping gene) izbrali gen *Hmbs* – gen kodira encim hidroksimetilbilan sintazo. Izbrali so ga na podlagi najmanjšega geometričnega povprečja Ct med vsemi vzorci, na katerih so merili izražanje posameznih kandidatnih genov (69). Gen *Hmbs* se je med vsemi kandidati najbolj stabilno izražal v podganjih torakalnih aortah v vseh stopnjah procesa. Hišni gen predstavlja gen, ki se konstantno izraža v določenem tkivu in katerega izražanje v konkretni raziskavi ni odvisno od nobenih dejavnikov, ki jih preučujemo, npr. ne glede na to, ali je podgana zdravljena s statini ali ne, se bo ta gen konstantno izražal. Služi kot interna kontrola za normalizacijo izražanja genov med posameznimi poskusi (64). Z normalizacijo smo hoteli izničiti dejavnike, ki so potencialno vplivali na izražanje gena (zmanjšati želimo variabilnost med vzorci). S tem dosežemo bolj točno in ponovljivo izražanje izbranih genov (66). Med te dejavnike spadajo: narava in količina tkiva, uspešnost izolacije celokupne RNA, reverzna transkripcija, pomnoževanje s qPCR, natančnost pipetiranja in podobno.

#### **3.4.2.1. Opis postopka normalizacije**

Iz meritev fluorescence standardov smo določili standardne krivulje (angl. standard curve) za posamezen gen, s pomočjo katerih smo ugotavljali količino izraženega preučevanega gena v vzorcih (princip relativne kvantifikacije izražanja genov). Vse rezultate analize izražanja vseh preučevanih genov smo izvozili iz računalniškega programa ABI Prism®

7000 SDS: SDS v1.2x System Software v Excel, za lažjo kasnejšo obdelavo podatkov. Vzorce, ki so bili najprej označeni s številkami od 1-60 smo zamenjali z dejanskimi oznakami, kot je navedeno v podpoglavlju Oznaka vzorcev. Potrebno je bilo združiti rezultate, saj smo za vsak gen postavljeni po 3 plošče. Meritvam v replikatih smo izračunali povprečne vrednosti koncentracije cDNA v vzorcih za tarčna gena *Edn1*, *Ednra* in za hišni gen *Hmbs*. Nato smo izvedli normalizacijo preučevanih genov na hišni gen *Hmbs*. To pomeni, da smo povprečne koncentracije posameznega tarčnega gena delili s povprečno koncentracijo hišnega gena v istem vzorcu. Pred statistično obdelavo rezultatov s programom SPSS smo pripravili okviren načrt za analizo ter izvedli grupiranje rezultatov v skupine po različnih kriterijih.

### 3.4.3. Statistične metode

Statistično analizo dobljenih rezultatov smo izvedli s pomočjo računalniškega programa SPSS (IBM SPSS statistics 19, version 19.0.0). Za ugotavljanje normalnosti porazdelitve spremenljivk smo uporabili Kolmogorov-Smirnov test. Homogenost variance smo preizkusili z Levene-ovim testom. Z omenjenim testom smo želeli potrditi ničelno hipotezo o enakosti varianc ( $p > 0,05$ ), kar je predpogoj za izvedbo metode analize varianc (ANOVA). V primeru, da predpostavka o homogenosti varianc ni bila izpolnjena, smo uporabili neparametrični Kruskal – Wallisov test. V primeru statistične značilnosti ( $p < 0,05$ ) v prvem primeru smo izvedli še Tukeyev Post Hoc test oziroma neparametrični Mann – Whitneyev U-test v drugem primeru. Na ta način smo izvedeli med katerimi skupinami prihaja do razlik. Poleg enofaktorske ANOVA-e smo izvedli tudi dvofaktorsko ANOVA-o, s katero smo želeli preučiti vpliv dveh neodvisnih spremenljivk oziroma dejavnikov (čas trajanja terapije in vrsta terapije) na eno odvisno spremenljivko (izražanje genov oziroma odstotek maksimalne relaksacije in maksimalne kontrakcije) ter njihovo interakcijo. Izračunali smo tudi percentile %MR in %MK ter ponovili vse že zgoraj omenjene teste. Zanimalo nas je, kako se izražanje preučevanih genov spreminja po percentilih % MR oziroma MK po posameznih terapijah. Odnose med spremenljivkami smo določili s Spearmanovim korelacijskim koeficientom. Pri vseh opravljenih analizah smo kot statistično značilno opredelili vrednost  $p < 0,05$  (5% tveganje).

Zaradi premajhnega števila vzorcev v posameznih terapevtskih skupinah (ponekod smo imeli samo enega ali dva vzorca) smo se odločili, da vzorce razvrstimo v skupine po

različnih kriterijih, kot je navedeno v nadaljevanju pri vsaki izmed uporabljenih statističnih metod.

### 3.4.3.1. Enofaktorska ANOVA

Pri analizi variance enega faktorja (angl. ONE-WAY ANOVA) opazujemo vpliv enega dejavnika oziroma neodvisne spremenljivke na eno odvisno spremenljivko. Vzorce smo pred izvedbo enofaktorske ANOVA-e najprej razdelili na skupine po terapijah oziroma kombinacijah terapij. Nato smo znotraj posameznih skupin vzorce razdelili glede na čas trajanja terapije tako, da smo združili 4. in 6. teden terapije (zgodnje terapevtsko obdobje) ter 8. in 10. teden terapije (pozno terapevtsko obdobje). Za združevanje smo se odločili zaradi premajhnega števila vzorcev v podskupinah, kar bi onemogočilo izvedbo nekaterih statističnih analiz.

#### Pomen kratic:

##### atoravr - terapija ATORVASTATIN

- 0 – kontrolna skupina (brez terapije)
- 1 – zgodnje terapevtsko obdobje (4+6 tednov)
- 2 – pozno terapevtsko obdobje (8+10 tednov)

##### losartvr - terapija LOSARTAN

- 0 – kontrolna skupina (brez terapije)
- 1 – zgodnje terapevtsko obdobje (4+6 tednov)
- 2 – pozno terapevtsko obdobje (8+10 tednov)

##### perindrvr - terapija PERINDOPRIL

- 0 – kontrolna skupina (brez terapije)
- 1 – zgodnje terapevtsko obdobje (4+6 tednov)
- 2 – pozno terapevtsko obdobje (8+10 tednov)

##### ALvr - kombinacija terapij ATORVASTATIN + LOSARTAN

- 0 – kontrolna skupina (brez terapije)
- 1 – zgodnje terapevtsko obdobje (4+6 tednov)
- 2 – pozno terapevtsko obdobje (8+10 tednov)

##### APvr - kombinacija terapij ATORVASTATIN + PERINDOPRIL

- 0 – kontrolna skupina (brez terapije)
- 1 – zgodnje terapevtsko obdobje (4+6 tednov)
- 2 – pozno terapevtsko obdobje (8+10 tednov)

V skupinah glede na terapijo smo opazovali vpliv časa trajanja terapije na izražanje genov *Edn1* in *Ednra* ter na spremjanje % MR in % MK.

### 3.4.3.2. Dvofaktorska ANOVA

Pri dvofaktorski ANOVA-i preučujemo vpliv dveh neodvisnih spremenljivk oziroma dejavnikov na eno odvisno spremenljivko. V našem primeru smo si izbrali čas trajanja terapije in vrsto terapije (skupini sta označeni kot timeskrac in th), saj nas zanima vpliv posamezne terapije na izražanje *Edn1* in *Ednra*, na % MR in % MK v odvisnosti od časa trajanja terapije. Zanimala nas je tudi interakcija med obema dejavnikoma - časom in terapijo.

### **Pomen kratic:**

Faktor timeskrac: 1- zgodnje terapevtsko obdobje (4+6 tednov)

2- pozno terapevtsko obdobje (8+10 tednov)

Faktor th: 0 - brez terapije (kontrolna skupina)

1 - terapija z atorvastatinom

2 - terapija z losartanom

3 - terapija s perindoprilom

4 - kombinirana terapija atorvastatin in losartan

5 - kombinirana terapija atorvastatin in perindopril

#### **3.4.3.3. Delo s percentili**

V okviru diplomske naloge smo ugotavljali, ali je izražanje *Edn1* in *Ednra* povezano s funkcijskimi sposobnostmi podganjih torakalnih aort. V ta namen smo vrednosti %MR in %MK pri posamezni vrsti terapije razporedili po velikosti (od najmanjše do največje vrednosti) ter izračunali vrednosti tercilov. Mejne vrednosti sta predstavljala 33. in 67. percentil vseh vrednosti. Na ta način smo lahko vrednosti relaksacije in kontrakcije razdelili v 3 skupine:

- 1. skupina: skupina z najmanjo vrednostjo % MR/MK
- 2. skupina: skupina s srednjo vrednostjo % MR/MK
- 3. skupina: skupina z največjo vrednostjo % MR/MK

Z omenjenimi skupinami smo izvedli ANOVA-o ter v primeru statistične značilnosti ( $p < 0,05$ ) tudi Tukeyev Post Hoc test. V primeru nehomogenosti varianc smo uporabili neparametrični Kruskal – Wallisov test ter neparametrični Mann – Whitneyev U-test v primeru statistične značilnosti. Zanimalo nas je, kako se izražanje genov *Edn1* in *Ednra* spreminja po tercilih % MR (relaxterc) oziroma % MK (konstrterc) po posameznih terapijah in kombinacijah terapij.

#### **3.4.3.4. Korelacija neodvisna od terapije**

V nadaljevanju smo izražanje *Edn1* in *Ednra* korelirali s % MR oziroma % MK ne glede na terapijo. Ugotavljali smo odnos med dvema spremenljivkama, kar ocenujemo s Pearsonovim ( $\rho$ ) (v primeru normalne porazdelitve) oziroma Spearmanovim korelacijskim koeficientom ( $r_s$ ) (v primeru nenormalne porazdelitve). Vrednosti teh koeficientov znašajo med -1 in +1. Vrednost  $r_s = 0$  pomeni, da ni korelacije med preučevanima variablama,  $r_s =$

+1 pomeni, da obstaja totalna pozitivna korelacija in  $r_s = -1$  pomeni, da obstaja totalna negativna korelacija med preučevanima variablama.

### 3.4.3.5. Korelacija po terapiji

Nazadnje smo ugotavljali povezanost izražanja *Edn1* in *Ednra* s funkcijskimi sposobnostmi podganjih torakalnih aort glede na posamezno vrsto terapije oz kombinacij terapij. Primerjali smo izražanje preučevanih genov s %MR oziroma %MK. Prav tako smo ugotavljali, ali izražanje preučevanih genov pri posamezni terapiji korelira med seboj. Odnos med dvema spremenljivkama smo ocenili s Pearsonovim (v primeru normalne porazdelitve) oziroma Spearmanovim korelacijskim koeficientom (v primeru nenormalne porazdelitve). Vrednosti teh koeficientov znašajo med -1 in +1.

## 4. REZULTATI

### 4.1. REZULTATI MERJENJA IZRAŽANJA GENOV Z METODO qPCR

Preglednica VIII prikazuje izračunane povprečne vrednosti koncentracije mRNA v vzorcih izoliranih podganjih torakalnih aort za tarčna gena *Edn1*, *Ednra* in za hišni gen *Hmbs*, ki smo jih izmerili s pomočjo metode qPCR. Vsak vzorec je ustreznno označen s črkami in številkami (npr. 4A10, 6A5, 8AP2, 10AL3, K1). Prva številka predstavlja čas trajanja terapije v tednih (4, 6, 8, 10 tednov), s črkami pa je označena vrsta terapije (A-atorvastatin, L-losartan, P-perindopril, AL-atorvastatin in losartan ter AP-atorvastatin in perindopril). V spodnjem delu preglednice so prikazane povprečne koncentracije mRNA vzorcev podgan, ki so namesto zdravil prejemale le tekočo vodo (kontrolna skupina-K).

**Preglednica VIII:** Izračunane povprečne vrednosti koncentracije mRNA v vzorcih za *Edn1*, *Ednra* in za hišni gen *Hmbs*

vzorci	številka	Gen	povprečje	gen	povprečje	gen	povprečje
4A10	1	<i>Ednra</i>	6,66	<i>Hmbs1</i>	5,71	<i>Edn1</i>	4,78
4A11	2	<i>Ednra</i>	9,77	<i>Hmbs1</i>	4,99	<i>Edn1</i>	7,17
4AL11	3	<i>Ednra</i>	8,15	<i>Hmbs1</i>	8,83	<i>Edn1</i>	5,92
4AP10	4	<i>Ednra</i>	8,3	<i>Hmbs1</i>	7,05	<i>Edn1</i>	5,23
4AP11	5	<i>Ednra</i>	13,41	<i>Hmbs1</i>	8,25	<i>Edn1</i>	9,62
4L10	6	<i>Ednra</i>	10,89	<i>Hmbs1</i>	5,84	<i>Edn1</i>	8,15
4L11	7	<i>Ednra</i>	7,79	<i>Hmbs1</i>	6,08	<i>Edn1</i>	5,86
4P10	8	<i>Ednra</i>	10,73	<i>Hmbs1</i>	9,12	<i>Edn1</i>	4,77
4P11	9	<i>Ednra</i>	6,48	<i>Hmbs1</i>	5,82	<i>Edn1</i>	6,18
6A5	10	<i>Ednra</i>	9,06	<i>Hmbs1</i>	5,66	<i>Edn1</i>	5,87
6A7	11	<i>Ednra</i>	9,88	<i>Hmbs1</i>	6,17	<i>Edn1</i>	5,49
6A8	12	<i>Ednra</i>	9	<i>Hmbs1</i>	8,23	<i>Edn1</i>	5,45
6AL1	13	<i>Ednra</i>	6,95	<i>Hmbs1</i>	5,98	<i>Edn1</i>	7,29
6AL8	14	<i>Ednra</i>	3,78	<i>Hmbs1</i>	3,76	<i>Edn1</i>	1,84
6AL9	15	<i>Ednra</i>	7,96	<i>Hmbs1</i>	6,67	<i>Edn1</i>	6,57
6AL10	16	<i>Ednra</i>	6,25	<i>Hmbs1</i>	6,68	<i>Edn1</i>	5,75
6AP5	17	<i>Ednra</i>	5,34	<i>Hmbs1</i>	6,27	<i>Edn1</i>	8,13
6AP6	18	<i>Ednra</i>	7,97	<i>Hmbs1</i>	7,83	<i>Edn1</i>	2,84
6AP9	19	<i>Ednra</i>	10,59	<i>Hmbs1</i>	10,77	<i>Edn1</i>	4,67
6L2	20	<i>Ednra</i>	5,21	<i>Hmbs1</i>	3,28	<i>Edn1</i>	7,04
6L3	21	<i>Ednra</i>	10,56	<i>Hmbs1</i>	14,06	<i>Edn1</i>	15,17
6P1	22	<i>Ednra</i>	2,19	<i>Hmbs1</i>	2,17	<i>Edn1</i>	13,93
6P7	23	<i>Ednra</i>	11,56	<i>Hmbs1</i>	4,58	<i>Edn1</i>	9,16
6P8	24	<i>Ednra</i>	8,25	<i>Hmbs1</i>	5,94	<i>Edn1</i>	5,49
8A2	25	<i>Ednra</i>	9,07	<i>Hmbs1</i>	6,95	<i>Edn1</i>	5,79
8A4	26	<i>Ednra</i>	8,1	<i>Hmbs1</i>	7,99	<i>Edn1</i>	8,97
8A6	27	<i>Ednra</i>	8,81	<i>Hmbs1</i>	8,67	<i>Edn1</i>	9,31
8AL2	28	<i>Ednra</i>	5,78	<i>Hmbs1</i>	5,59	<i>Edn1</i>	3,81

8AL5	29	<i>Ednra</i>	5,62	<i>Hmbs1</i>	6,45	<i>Edn1</i>	2,37
8AL9	30	<i>Ednra</i>	2,97	<i>Hmbs1</i>	5,7	<i>Edn1</i>	5,36
8AP2	31	<i>Ednra</i>	6,95	<i>Hmbs1</i>	6,54	<i>Edn1</i>	5,32
8AP3	32	<i>Ednra</i>	4,62	<i>Hmbs1</i>	6,82	<i>Edn1</i>	6,1
8AP4	33	<i>Ednra</i>	3,1	<i>Hmbs1</i>	7,27	<i>Edn1</i>	6,28
8L1	34	<i>Ednra</i>	9,3	<i>Hmbs1</i>	8,88	<i>Edn1</i>	6,31
8L6	35	<i>Ednra</i>	5,61	<i>Hmbs1</i>	5,35	<i>Edn1</i>	3,2
8L7	36	<i>Ednra</i>	5,85	<i>Hmbs1</i>	9,1	<i>Edn1</i>	4,95
8P3	37	<i>Ednra</i>	9,48	<i>Hmbs1</i>	6,34	<i>Edn1</i>	10,03
8P5	38	<i>Ednra</i>	7,88	<i>Hmbs1</i>	7,66	<i>Edn1</i>	5,27
10A0	39	<i>Ednra</i>	6,46	<i>Hmbs1</i>	5,71	<i>Edn1</i>	5,49
10A1	40	<i>Ednra</i>	9,84	<i>Hmbs1</i>	13,13	<i>Edn1</i>	7,35
10AL3	41	<i>Ednra</i>	6,25	<i>Hmbs1</i>	8,68	<i>Edn1</i>	8,03
10AL6	42	<i>Ednra</i>	6,04	<i>Hmbs1</i>	8,44	<i>Edn1</i>	4,55
10AP1	43	<i>Ednra</i>	7,92	<i>Hmbs1</i>	10,94	<i>Edn1</i>	25,22
10AP7	44	<i>Ednra</i>	4,78	<i>Hmbs1</i>	7,33	<i>Edn1</i>	4
10L4	45	<i>Ednra</i>	6,64	<i>Hmbs1</i>	8,1	<i>Edn1</i>	8,7
10L5	46	<i>Ednra</i>	6,54	<i>Hmbs1</i>	9,6	<i>Edn1</i>	33,37
10P2	47	<i>Ednra</i>	10,38	<i>Hmbs1</i>	8,25	<i>Edn1</i>	8,58
10P6	48	<i>Ednra</i>	8,05	<i>Hmbs1</i>	7,15	<i>Edn1</i>	6,87
K1	49	<i>Ednra</i>	9,97	<i>Hmbs1</i>	4,2	<i>Edn1</i>	6,29
K2	50	<i>Ednra</i>	28,68	<i>Hmbs1</i>	10,95	<i>Edn1</i>	/
K3	51	<i>Ednra</i>	6,79	<i>Hmbs1</i>	4,09	<i>Edn1</i>	3,46
K4	52	<i>Ednra</i>	/	<i>Hmbs1</i>	17,68	<i>Edn1</i>	/
K5	53	<i>Ednra</i>	5,53	<i>Hmbs1</i>	4,15	<i>Edn1</i>	2,59
K6	54	<i>Ednra</i>	5,38	<i>Hmbs1</i>	6,03	<i>Edn1</i>	2,32
K7	55	<i>Ednra</i>	14,59	<i>Hmbs1</i>	5,64	<i>Edn1</i>	7,76
K8	56	<i>Ednra</i>	7,5	<i>Hmbs1</i>	6,09	<i>Edn1</i>	5,73
K	57	<i>Ednra</i>	7,76	<i>Hmbs1</i>	6,33	<i>Edn1</i>	7,27
K9	58	<i>Ednra</i>	8,45	<i>Hmbs1</i>	7,64	<i>Edn1</i>	6,83
K10	59	<i>Ednra</i>	4,21	<i>Hmbs1</i>	6,34	<i>Edn1</i>	3,06
K11	60	<i>Ednra</i>	8,63	<i>Hmbs1</i>	10,63	<i>Edn1</i>	20,43
K12	61	<i>Ednra</i>	5,63	<i>Hmbs1</i>	6,78	<i>Edn1</i>	4,34

V nadaljevanju smo s pomočjo le-teh izvedli normalizacijo na hišni gen *Hmbs*, tako da smo povprečne koncentracije mRNA *Edn1* in *Ednra* delili s povprečno koncentracijo hišnega gena *Hmbs* v istem vzorcu, kar prikazuje Preglednica IX.

**Preglednica IX:** Prikaz končnih rezultatov po normalizaciji na hišni gen *Hmbs*

Vzorci	številka	<i>Ednra/Hmbs</i>	<i>Edn1/Hmbs</i>
4A10	1	1,16637478	0,83712785
4A11	2	1,95791583	1,43687375
4AL11	3	0,92298981	0,67044168
4AP10	4	1,17730496	0,74184397
4AP11	5	1,62545455	1,16606061
4L10	6	1,86472603	1,39554795
4L11	7	1,28125	0,96381579
4P10	8	1,17653509	0,52302632
4P11	9	1,11340206	1,06185567

6A5	10	1,60070671	1,03710247
6A7	11	1,6012966	0,8897893
6A8	12	1,09356015	0,66221142
6AL1	13	1,16220736	1,21906355
6AL8	14	1,00531915	0,4893617
6AL9	15	1,1934033	0,9850075
6AL10	16	0,93562874	0,86077844
6AP5	17	0,85167464	1,29665072
6AP6	18	1,01787995	0,36270754
6AP9	19	0,98328691	0,43361188
6L2	20	1,58841463	2,14634146
6L3	21	0,75106686	1,07894737
6P1	22	1,00921659	1,61976744
6P7	23	2,52401747	2
6P8	24	1,38888889	0,92424242
8A2	25	1,30503597	0,83309353
8A4	26	1,01376721	1,12265332
8A6	27	1,01614764	1,07381776
8AL2	28	1,03398927	0,68157424
8AL5	29	0,87131783	0,36744186
8AL9	30	0,52105263	0,94035088
8AP2	31	1,06269113	0,81345566
8AP3	32	0,67741935	0,89442815
8AP4	33	0,4264099	0,86382393
8L1	34	1,0472973	0,71058559
8L6	35	1,04859813	0,59813084
8L7	36	0,64285714	0,54395604
8P3	37	1,49526814	1,58201893
8P5	38	1,02872063	0,68798956
10A0	39	1,13134851	0,9614711
10A1	40	0,74942879	0,55978675
10AL3	41	0,72004608	0,92511521
10AL6	42	0,71563981	0,53909953
10AP1	43	0,72394881	0,96962707
10AP7	44	0,6521146	0,54570259
10L4	45	0,81975309	1,07407407
10L5	46	0,68125	1,57183231
10P2	47	1,25818182	1,04
10P6	48	1,12587413	0,96083916
K1	49	2,37380952	1,49761905
K2	50	2,61917808	/
K3	51	1,6601467	0,84596577
K4	52	/	/
K5	53	1,33253012	0,62409639
K6	54	0,89220564	0,38474295
K7	55	2,58687943	1,37588652
K8	56	1,23152709	0,9408867
K	57	1,22590837	1,14849921
K9	58	1,10602094	0,89397906
K10	59	0,66403785	0,48264984
K11	60	0,81185325	1,9219191

K12		61		0,83038348		0,64011799
-----	--	----	--	------------	--	------------

Metoda, ki smo jo uporabili, je relativna metoda kvantifikacije, saj določamo izražanje *Edn1* in *Ednra* glede na izražanje hišnega gena *Hmbs* v posameznem vzorcu. Izračunana vrednost nad 1 torej pomeni, da se je preučevan gen bolje izražal od hišnega gena v istem vzorcu, vrednost pod 1 pa da se je preučevan gen slabše izražal kot hišni gen v istem vzorcu. V preglednicah VII in VIII sta z rumeno označena vzorca VZ50 in VZ52, z določitvijo aktivnosti katerih smo imeli težave med eksperimentalnim delom. Aparat ju namreč ni zaznal pri celotnem trojniku vzorca (angl. undetected), torej je bila količina cDNA premajhna, da bi lahko izmerili Ct. Sklepamo, da sta bila vzorca slabše prepisana iz mRNA v cDNA, saj smo podobne rezultate dobili tudi pri preučevanju izražanja drugih genov, ki so vpleteni v proces ateroskleroze. Kljub ponovnemu prepisu in ponavljanju nanašanja vzorcev smo dobili iste rezultate, ali pa nam je zmanjkalo vzorca za ponovitev. Vzrok je verjetno v slabšem izražanju genov v vzorcu. Opazili smo, da prihaja pri vzorcih podgan, ki predstavljajo kontrolno skupino do variabilnosti (velika SD) v izražanju genov kljub temu, da niso prejemale nobene terapije. Rezultati so nas presenetili, čeprav je jasno, da izražanje genov ne more biti enako pri različnih živalih. Pri vzorcu VZ 55 (kontrola) smo opazili močno odstopanje v izražanju preučevanih genov glede na preostale kontrole. Možni vzroki za odstopanje so lahko: slabo stanje živali, preparacija aortnih obročkov podgan, obešanje obročkov v kivete, lahko tudi nepravilno shranjevanje vzorca. Posledično smo morali pri statistični obravnavi omenjen vzorec izpustiti.

Da bi lažje razumeli, kaj naši rezultati pomenijo, smo jih razdelili v skupine glede na obravnavan parameter (npr. vrsto terapije, čas trajanja terapije,...) in jih ustrezno statistično ovrednotili. Zaradi premajhnega števila vzorcev v posameznih terapevtskih skupinah (ponekod smo imeli le enega ali dva vzorca) smo združili 4. in 6. tenen terapije v t.i. zgodnje terapevtsko obdobje ter 8. in 10. tenen terapije v t.i. pozno terapevtsko obdobje. Združevanje vzorcev je bilo nujno, da smo lahko izvedli statistično analizo naših rezultatov. Zaradi obsežnosti obravnavane statistične analize smo se v nadaljevanju diplomske naloge osredotočili večinoma na statistično značilne rezultate.

## 4.2. OCENA VPLIVA TERAPIJE NA IZRAŽANJE *Edn1* IN *Ednra*

V Preglednica X smo zbrali končne rezultate preučevanja izražanja *Edn1* in *Ednra* z uporabo različnih statističnih metod. Pri vseh testih smo kot statistično značilno opredelili vrednost  $p < 0,05$ . S puščicami je nakazano zvišano ( $\uparrow$ ) oziroma znižano ( $\downarrow$ ) izražanje posameznega gena pri določeni terapiji oziroma kombinaciji terapij. S sivo barvo so označene tiste vrednosti, pri katerih je prišlo do statistično značilnih sprememb v izražanju obravnavanih genov pri  $p < 0,05$ .

### Preglednica X: Končni rezultati statistične analize za *Edn1* in *Ednra*

Legenda: A, atorvastatin; AL, kombinacija atorvastatina in losartana; AP, kombinacija atorvastatina in perindoprila; L, losartan; P, perindopril; 0, kontrolna skupina (brez terapije); 1, zgodnje terapevtsko obdobje (4 + 6 tednov); 2, pozno terapevtsko obdobje (8 + 10 tednov);  $\uparrow$ , zvišano izražanje gena;  $\downarrow$ , znižano izražanje gena.

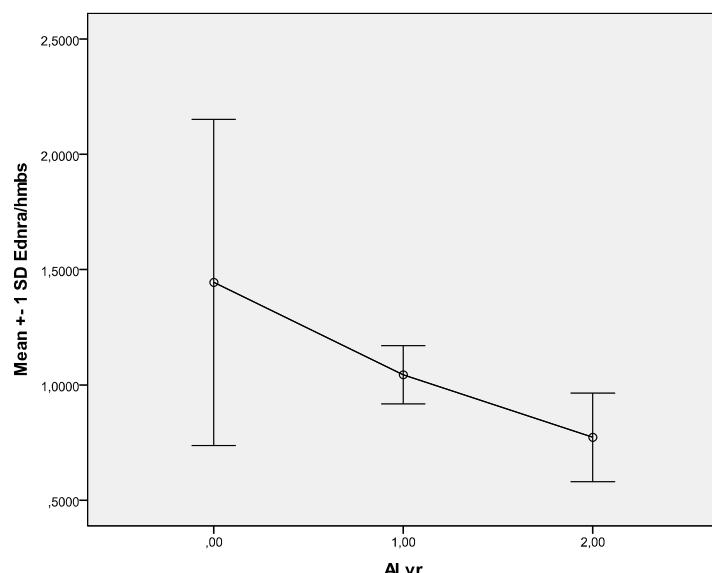
mRNA	terapija	$\uparrow \downarrow$	ANOVA	Tukey	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney
<b><i>Ednra</i></b>	A	$\uparrow_{0,1} \text{ in } \downarrow_{1,2}$	$p = 0,379^*$	/	$p = 0,281$	/
	L	$\downarrow_{0,1} \text{ in } \downarrow_{1,2}$	$p = 0,189$	/	$p = 0,099$	/
	P	$\downarrow_{1,2}$	$p = 0,828$	/	$p = 0,985$	/
	AL	$\downarrow_{0,2} \text{ in } \downarrow_{1,2}$	$p = 0,079^*$	$p_{0,2} = 0,080$	$p = 0,048$	$p_{0,2} = 0,027$ $p_{1,2} = 0,047$
<b><i>Edn1</i></b>	AP	$\downarrow_{0,2} \text{ in } \downarrow_{1,2}$	$p = 0,071^*$	$p_{0,2} = 0,060$	$p = 0,028$	$p_{0,2} = 0,011$ $p_{1,2} = 0,047$
	A	$\downarrow_{1,2}$	$p = 0,947$	/	$p = 0,986$	/
	L	$\uparrow_{0,1} \text{ in } \downarrow_{1,2}$	$p = 0,262$	/	$p = 0,227$	/
	P	$\uparrow_{0,1} \text{ in } \downarrow_{1,2}$	$p = 0,645$	/	$p = 0,525$	/
	AL	$\downarrow_{0,1} \text{ in } \downarrow_{1,2}$	$p = 0,408$	/	$p = 0,553$	/
	AP	$\downarrow_{0,1} \text{ in } \uparrow_{1,2}$	$p = 0,646$	/	$p = 0,745$	/

Opomba: \* pomeni nehomogenost varianc

### 4.2.1. *Ednra*:

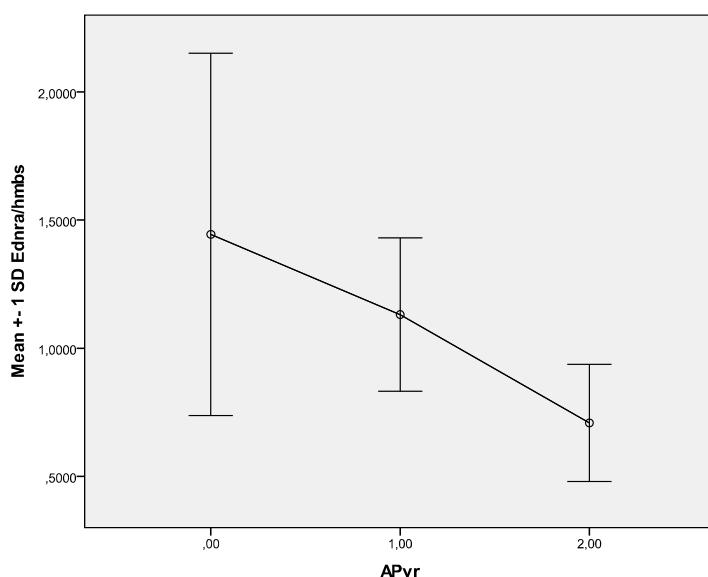
- Kombinirana terapija z atorvastatinom in losartanom statistično značilno zniža izražanje *Ednra* med kontrolno skupino in poznim (8+10 tednov) terapevtskim obdobjem (Mann-Whitney,  $U = 9,00$ ,  $z = -2,21$ ,  $p = 0,027$ ). Do statistično značilnega znižanja izražanja *Ednra* prihaja tudi med zgodnjim in poznim obdobjem terapije (Mann-Whitney,  $U = 3,00$ ,  $z = -1,98$ ,  $p = 0,047$ ). Učinek kombinirane terapije z

atorvastatinom in losartanom v subterapevtskih koncentracijah na znižanje izražanja *Ednra* prikazuje Graf 3.



**Graf 3:** Prikaz povprečnih vrednosti izražanja *Ednra* in SD po časovnih obdobjih pri kombinirani terapiji z atorvastatinom in losartanom v subterapevtskih odmerkih

- Kombinirana terapija z atorvastatinom in perindoprilom statistično značilno zniža izražanje *Ednra* med kontrolno skupino in poznim terapevtskim obdobjem (Mann-Whitney,  $U = 6.00$ ,  $z = -2.53$ ,  $p = 0.011$ ). Do statistično značilnega znižanja izražanja *Ednra* prihaja tudi med zgodnjim in poznim obdobjem (Mann-Whitney,  $U = 3.00$ ,  $z = -1.98$ ,  $p = 0.047$ ). Učinek kombinirane terapije z atorvastatinom in perindoprilom v subterapevtskih koncentracijah na znižanje izražanja *Ednra* prikazuje Graf 4.

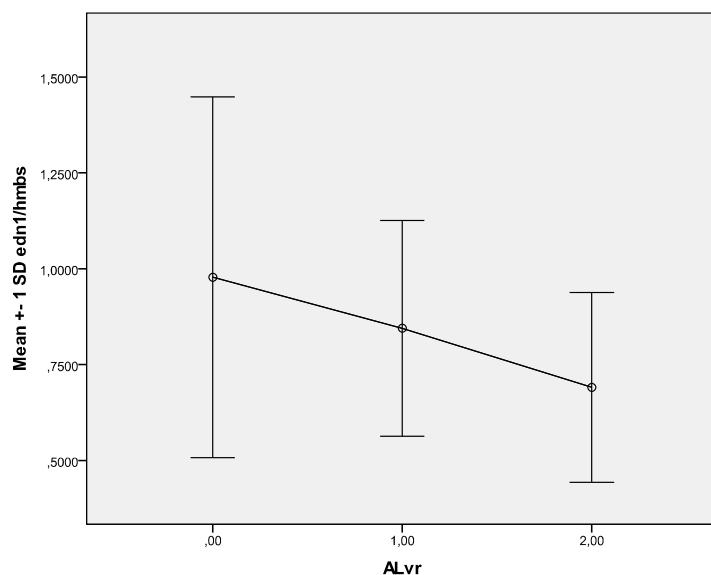


**Graf 4:** Prikaz povprečnih vrednosti izražanja *Ednra* in SD po časovnih obdobjih pri kombinirani terapiji z atorvastatinom in perindoprilom v subterapevtskih odmerkih

- Tako terapija ( $F(5, 48) = 3.24$ ,  $p = 0.013$ ) kot čas terapije ( $F(1, 48) = 13.76$ ,  $p = 0.001$ ) statistično značilno vplivata na izražanje gena *Ednra*, medtem ko njuna interakcija ni značilna ( $p > 0.05$ ). S testom Bonferroni potrdimo, da prihaja do statistično značilnega znižanja izražanja *Ednra* med zgodnjim in poznim terapevtskim obdobjem ( $p = 0.001$ ). Poleg tega z istim testom ugotovimo, da prihaja do statistično značilnega znižanja izražanja *Ednra* med kontrolno skupino in terapijo s kombinacijo atorvastatina in losartana ( $p = 0.035$ ) ter med kontrolno skupino in terapijo s kombinacijo atorvastatina in perindoprila ( $p = 0.042$ ).

#### 4.2.2. *Edn1*:

Pri *Edn1* nismo ugotovili statistično značilnega spremenjanja izražanja pri nobeni izmed terapij oziroma kombinacij terapij s subterapevtskimi odmerki ( $p > 0.05$ ). Kljub temu smo lahko zaznali določen trend znižanja izražanja *Edn1* pri kombinirani terapiji z atorvastatinom in losartanom glede na zgodnje in pozno terapevtsko obdobje v primerjavi s kontrolno skupino (Graf 5).



**Graf 5:** Prikaz povprečnih vrednosti izražanja *Edn1* in SD po časovnih obdobjih pri kombinirani terapiji z atorvastatinom in losartanom v subterapevtskih odmerkih (ni statistične značilnosti, viden le trend upadanja)

#### 4.3. KORELACIJA IZRAŽANJA GENOV S %MR IN %MK

- Izražanje *Ednra* je povezano s povečano sposobnostjo relaksacije pri kombinirani terapiji z atorvastatinom in losartanom. S povečanjem odstotka relaksacije (glede na razdelitev po tercilih) se namreč statistično značilno povečuje tudi izražanje *Ednra*,  $F(2, 6) = 16.76$ ,  $p = 0.003$ .
- S spremembou kontrakcije ni bilo nobenih statistično značilnih povezav (po razdelitvi po percentilih).
- Obstaja statistično značilna korelacija med izražanjem *Ednra* in % MR relaksacije,  $r_s = 0.31$ ,  $p = 0.019$  ne glede na terapijo.
- Med izražanjem *Edn1* oziroma *Ednra* in % MK ni bilo nobene statistično značilne korelacijs (p < 0.05).
- Pri terapiji z atorvastatinom ni nobene statistično značilne povezave med izražanjem preučevanih genov in % MR ( $p < 0.05$ ). Do enakih zaključkov smo prišli pri opazovanju korelacijs med izražanjem genov in % MK ( $p < 0.05$ ).
- Pri terapiji z losartanom ni nobene statistično značilne povezave med izražanjem preučevanih genov in % MR ( $p < 0.05$ ). Do enakih zaključkov smo prišli pri opazovanju povezave med izražanjem genov in % MK ( $p < 0.05$ ).
- Pri terapiji s perindoprilom ni nobene statistično značilne povezave med izražanjem preučevanih genov in % MR ( $p < 0.05$ ). Do enakih ugotovitev smo prišli pri % MK ( $p < 0.05$ ).
- Pri kombinirani terapiji z atorvastatinom in losartanom je vidna statistično značilna pozitivna povezava med izražanjem *Ednra* in % MR,  $r_s = 0.83$ ,  $p = 0.005$ . Izražanje *Edn1* in % MK negativno korelirata,  $r_s = -0.90$ ,  $p = 0.001$ . Med seboj pozitivno korelirata izražanje genov *Ednra* in *Agtr1a* (gen, ki kodira receptor za angiotenzin II),  $r_s = 0.77$ , pri ravni statistične značilnosti  $p = 0.009$ .
- Pri kombinirani terapiji z atorvastatinom in perindoprilom ni nobene statistično značilne korelacijs med izražanjem preučevanih genov in % MR ( $p < 0.005$ ). Do enakih ugotovitev smo prišli pri % MK ( $p < 0.005$ ).

## 5. RAZPRAVA

Do danes je bilo opravljenih mnogo kliničnih študij, ki so preučevale zaščitne pleiotropne učinke statinov in nekaterih zdravil za zdravljenje povišanega krvnega tlaka na delovanje endotelija in na togost žil v terapevtskih koncentracijah in pri klinično že izraženih znakih srčno-žilnih bolezni. V večini opravljenih študij so potrdili njihovo ugodno zaščitno delovanje na endotelij in na zmanjšanje togosti arterij (33, 34, 37, 42, 57, 70). Proces ateroskleroze se začne že zelo zgodaj, nato sledi dolgo obdobje mirovanja preden se izrazijo prvi klinični znaki arterijske bolezni, kot sta angina pektoris ali miokardni infarkt. Začetne spremembe arterijske stene so tako prisotne že pri zdravih ljudeh srednjih let in s starostjo samo še napredujejo (20). Z zdravim življenjskim slogom lahko pripomoremo k upočasnjevanju teh sprememb, vendar se ne moremo izogniti staranju. Postavili smo si vprašanje o smiselnosti uporabe subterapevtskih odmerkov statinov ali antihipertenzivov ozziroma njihovih kombinacij z namenom preprečevanja ozziroma upočasnjevanja začetnih aterosklerotičnih sprememb. Logično lahko predpostavljamo, da bi lahko manjše, zgodnje okvare arterijske stene pri asimptomatičnih, na videz zdravih ljudeh, uspešno pozdravili z nižjimi (subterapevtskimi) odmerki tistih zdravil, ki dokazano izboljšajo delovanje arterij pri polnem terapevtskem odmerku, v prisotnosti že večjih napredovalih sprememb. Z nižjimi odmerki zmanjšamo tudi pojavnost neželenih stranskih učinkov zdravil.

Endotelijska disfunkcija predstavlja začetno stopnjo ateroskleroze, za katero so značilni zmanjšana sinteza, sproščanje in aktivnost NO iz endotelija žil. Ima pomembno fiziološko vlogo pri uravnavanju krvnega tlaka, krvnega pretoka in je pomemben klinični kazalec endotelijske funkcije (37, 70). V primeru njegove okvare se poruši ravnotesje med vazodilatatorji (NO, prostaciklin, EDHF) in vazokonstriktorji (ET-1, angiotenzin II, tromboksan A<sub>2</sub>) endotelija v smer delovanja slednjih (71). Pomanjkanje NO povzroči vazokonstrikcijo, agregacijo trombocitov, povečano proliferacijo GMC ter povečano adhezijo monocitov in levkocitov na endotelij. Endotelin-1, ki ga sproščajo EC žil, je najmočnejši dolgodelujoč vazokonstriktor in mitogen. Spodbuja vnetje, trombozo, proliferacijo GMC in fibrozo in s tem prispeva k zamašitvi žil. Obstaja veliko študij, ki potrjujejo njegovo pomembno vlogo v procesu aterogeneze. Eksperimentalni rezultati na živalskih modelih hiperholesterolemije in ateroskleroze potrjujejo, da je v aterosklerotični

žili zvišana raven izražanja gena za ET-1 (*Edn1*) in gena za endotelinski receptor tipa A (*Ednra*). S farmakoterapevtskim znižanjem izražanja omenjenih genov bi verjetno lahko pomembno prispevali k upočasnjevanju aterosklerotičnih sprememb.

V diplomski nalogi smo želeli preveriti, ali že subterapevtske koncentracije atorvastatina, losartana, perindoprila oziroma kombinacija atorvastatina in enega od omenjenih antihipertenzivov znižajo izražanje *Edn1* oziroma *Ednra*. V nadaljevanju smo želeli ugotoviti, ali je izražanje *Edn1* oziroma *Ednra* povezano s funkcijskimi spremembami na obročkih podganjih torakalnih aort (sposobnost maksimalne relaksacije oziroma kontrakcije aorte) pri subterapevtskih odmerkih atorvastatina, losartana, perindoprila oziroma pri kombinaciji atorvastatina in enega od omenjenih antihipertenzivov. Z uporabo metode qPCR smo izmerili izražanje *Edn1* in *Ednra*, relativno glede na izbran hišni gen *Hmbs* v vzorcih izoliranih torakalnih aort podgan, ki so prejemale statin, enega izmed antihipertenzivov ali kombinacijo statina in antihipertenziva. Nato smo izvedli obsežno statistično analizo izmerjenih vrednosti.

Že Hernandez-Perera in sodelavci so potrdili, da atorvastatin in simvastatin zavirata izražanje *Edn1* in sintezo ET-1 v EC aorte goveda na ravni transkripcije (72). Z dodatkom mevalonata, a ne z dodatkom holesterola, je zaviralni učinek statinov na izražanje *Edn1* izzvenel. Sklepali so, da zaviranje sinteze holesterola s statini ni odgovorno za znižanje izražanja *Edn1*, temveč je to posledica pomanjkanja izoprenoidov mevalonatne poti. Tudi Ozaki in sodelavci so v primeru inkubacije EC popkovne vene človeka in fluvastatina dokazali statistično značilno znižanje izražanja *Edn1* in zmanjšan nastanek ET-1 (73). Zadnje študije navajajo, da so Rho GTPaze ključne za uravnavanje izražanja *Edn1* na ravni transkripcije, pod vplivom statinov (74). Še vedno pa ni pojasnjeno, na kakšen način Rho proteini uravnavajo aktivnost promotorja *Edn1*. Študija Kawane in sodelavcev je pokazala, da je medsebojna interakcija med transkripcijskima dejavnikoma AP-1 in GATA-2 ključna za uravnavo transkripcije *Edn1* v EC (10, 27, 74). Statini naj bi predvsem z zaviranjem geranilgeraniliranja preprečevali nastanek Rho GTPaz in s tem pomembno zavirali izražanje *Edn1* (74). Omenjen mehanizem naj bi bil odgovoren za zaviranje vazokonstrikcije in proliferacije, posredovane z ET-1. S tem naj bi statini pomembno izboljšali delovanje endotelija žil, neodvisno od znižanja ravni holesterola (pleiotropni efekt).

Na podlagi rezultatov iz prej omenjenih raziskav smo v tej diplomski nalogi predvidevali, da bi lahko tudi z uporabo nizkih subterapevtskih odmerkov atorvastatina znižali izražanje *Edn1* v tkivu podganje aorte. Kljub pričajočim pozitivnim dokazom različnih študij, nam s to raziskavo ni uspelo potrditi zaviralnega učinka statinov na izražanje *Edn1*. S subterapevtskimi odmerki atorvastatina namreč nismo dokazali statistično značilnega znižanja izražanja *Edn1*. Verjetno je negativen rezultat posledica uporabe nizkih odmerkov statinov (uporabili smo 20% spodnje terapevtske koncentracije), kajti v večini opravljenih raziskav so uporabili terapevtske odmerke. Prav tako smo glede na princip delovanja preučevanih antihipertenzivov in glede na rezultate iz predhodno objavljenih študij z uporabo terapevtskih odmerkov pričakovali, da bodo že subterapevtski odmerki losartana in perindoprila znižali izražanje *Edn1* v tkivu podganje torakalne aorte (75, 76). Več študij je predpostavljalo povezanost med delovanjem angiotenzina II in ET-1. Hong H.J. in sodelavci so potrdili, da angiotenzin II pomembno vpliva na zvišanje izražanja *Edn1* z aktivacijo receptorja AT1 (75). Z antagonistom receptorja za angiotenzin II (olmesartanom) so ugotovili znižano izražanje *Edn1* v GMC podganjih aort. Izvedli so tudi analizo promotorja *Edn1* in dokazali, da ima AP-1 odločilno vlogo pri uravnavanju izražanja *Edn1* v GMC, ki je spodbujeno z angiotenzinom II. Prav tako so Zhu in sodelavci dokazali, da losartan po 12-ih tednih terapije pomembno zniža izražanje *Edn1* v žilah spontano hipertenzivnih podgan in na ta način izboljša delovanje endotelija (77). S terapijo z antagonisti receptorja za angiotenzin II torej lahko zavremo škodljive učinke angiotenzina II in s tem tudi pomembno znižamo izražanje *Edn1*, kar ugodno vpliva na delovanje žilja. Kljub rezultatom iz prej navedenih študij z našim eksperimentalnim delom nismo dokazali statistično pomembnega znižanja izražanja *Edn1* niti z losartanom niti s perindoprilom v subterapevtskih odmerkih. Do podobnih ugotovitev je prišla tudi korejska raziskovalna skupina, ki je preučevala spremembe izražanja določenih genov na modelu spontano hipertenzivnih podgan, ki so prejemale losartan (10mg/kg/dan) 3 oziroma 5 tednov (40). Z uporabo metode qPCR so ugotovili, da nizki odmerki losartana niso pomembno vplivali na izražanje *Edn1* in ET-1 v srčnem tkivu podgan. Sklepali so, da je to posledica uporabe nizkih odmerkov. Še večja pričakovanja smo imeli pri kombinirani terapiji z atorvastatinom in enim od antihipertenzivov (losartan, perindopril) zaradi potencialnega sinergističnega delovanja, a tudi v tem primeru nismo dokazali statistično značilnega znižanja izražanja *Edn1*. Neskladnost naših rezultatov z rezultati iz predhodnih študij je verjetno posledica uporabe nizkih koncentracij uporabljenih zdravilnih učinkovin

ali pa so za to krive metodološke omejitve, npr. majhno število vzorcev v posameznih skupinah. Posledično je možno, da med preiskovanimi skupinami vseeno obstaja statistično značilna razlika, čeprav je mi nismo uspeli dokazati. Glede na rezultate iz preteklih študij, ki govorijo v prid znižanju izražanja *Edn1* pod vplivom preučevanih zdravilnih učinkovin, bi bilo smiselno meritve ponoviti na večjem številu vzorcev v posameznih terapevtskih skupinah.

V nadaljevanju smo preučevali izražanje *Ednra*, ki je v primerjavi z *Edn1* bistveno manj raziskan, o čemer pričajo tudi skopi podatki v literaturi. Z našo raziskavo smo ugotovili, da subterapevtski odmerki atorvastatina, losartana in perindoprila niso znižali izražanja *Ednra* v tkivu podganje torakalne aorte, kar je v nasprotju z našimi predpostavkami glede na podatke pridobljene iz literature (76, 78, 79). Xu in sodelavci so namreč potrdili, da atorvastatin in mevastatin pomembno znižata predhodno spodbujeno izražanje *Ednra* v GMC podganje aorte in posledično zmanjšata proliferacijo GMC (78). Po rezultatih novejše študije Lina Y.J. in sodelavcev naj bi angiotenzin II spodbujal izražanje *Ednra* v aorti podgan ter spodbujal vezavo ET-1 predvsem na ET<sub>A</sub>. Z uporabo antagonistov receptorja za angiotenzin II so dokazali pomembno znižano izražanje *Ednra* ter zmanjšano vezavo ET-1 na receptor (79). Omenjena študija je predvidevala, da angiotenzin II povečuje z ET-1 sproženo vazokonstrikcijo preko spodbujanja izražanja *Ednra*, kar naj bi dokazovalo, da obstaja med angiotenzinom II in ET-1 sinergistični učinek. Ruiz-Ortega in sodelavci so v primeru kinaprila pokazali znižano izražanje *Ednra* ter zmanjšano nastajanje ET-1 in ET<sub>A</sub> (76). Kljub temu, da pri uporabi posameznih zdravilnih učinkovin nismo zabeležili vpliva na izražanje *Ednra*, smo pri kombinirani terapiji z atorvastatinom in losartanom ter z atorvastatinom in perindoprilom v subterapevtskih odmerkih dokazali statistično značilno znižanje izražanja *Ednra* v tkivu podganje torakalne aorte. Uspešnost kombinirane terapije smo pričakovali, saj smo sklepali, da lahko z antiaterogenim delovanjem preko dveh različnih mehanizmov dosežemo učinek že pri subterapevtskih koncentracijah. Namreč, več kot je prijemališč za zdravilne učinkovine, nižja koncentracija zdravilnih učinkovin je potrebna za njihovo delovanje (sinergizem). Možna razloga za sinergistični učinek sočasne terapije z atorvastatinom in losartanom oziroma perindoprilom na znižanje izražanja *Ednra* je v medsebojnem dopolnjevanju učinkov atorvastatina na sočasno znižanje izražanja *Ednra* in *Agtr1* (gena, ki kodira receptor za angiotenzin II) (80) na eni strani ter učinkov losartana (antagonist receptorja za angiotenzin II) oziroma

perindoprila (ACE inhibitor) in njunim vplivom na preprečevanje škodljivih učinkov posredovanih z angiotenzinom II na drugi strani. Prepletanje medsebojnega zaviralnega vpliva omenjenih zdravilnih učinkov na renin-angiotenzin-aldosteronski sistem (RAAS) sistem ima za posledico skupni učinek, ki je večji kot le seštevek vpliva posamezne zdravilne učinkovine. Na podlagi rezultatov naše raziskave in po podatkih iz literature lahko torej sklepamo, da lahko z zaviranjem angiotenzina II preko različnih mehanizmov učinkoviteje znižamo izražanje *Ednra* (79). Več objavljenih študij namreč potrjuje sinergistično delovanje med statini in antagonisti receptorja za angiotenzin II v subterapevtskih odmerkih, kar ima za posledico večji zaščitni učinek na arterijsko steno kot monoterapija (81, 82). Zelo verjetno je kombinirana terapija v subterapevtskih odmerkih bolj učinkovita za preprečevanje nastanka začetnih aterosklerotičnih sprememb.

V naslednji fazi raziskave smo preučevali povezanost izražanja *Edn1* ozziroma *Ednra* s funkcijskimi spremembami na izoliranih podganjih torakalnih aortah pri subterapevtskih odmerkih atorvastatina, losartana, perindoprila ozziroma njihovih kombinacijah. S testi funkcijске odzivnosti žilnih obročkov smo žeeli preveriti odzivnost žilnih obročkov, njihovo sposobnost kontrakcije in relaksacije v povezavi z izražanjem omenjenih genov. Pri starejših, a še vedno mladih podganah se namreč povečuje sposobnost maksimalne kontrakcije aortnih obročkov, spodbujene s fenilefrinom in zmanjšuje maksimalna sposobnost relaksacije izzvane z acetilholinom, ki je odvisna od endotelija. Ob staranju se zaradi degenerativnih in senescentnih procesov maksimalna kontrakcija veča, saj nastaja več konstriktorjev, relaksacija pa manjša zaradi pomanjkanja relaksantov. Po podatkih iz študije Novelle in sodelavcev naj bi bile omenjene spremembe povezane z znižanjem izražanja *eNos* in zmanjšanim nastankom NO v mišjih aortah (83). Hkrati se pri starejših osebkih zmanjša tudi elastičnost arterij (togost arterij zaradi pomanjkanja elastina), tako da se žile manj krčijo in še manj sproščajo. S starostjo se torej okvir odzivnosti zmanjša. S terapijo s statini in antihipertenzivi želimo vplivati na omenjene spremembe. Oba testa funkcijске odzivnosti aortnih obročkov sta pokazala predvsem znižanje maksimalne sposobnosti kontrakcije pri vseh obravnavanih terapijah. Zabeležili smo tudi zvečano maksimalno sposobnost kontrakcije, vendar ne pri vseh terapijah. Z našo raziskavo smo ugotovili, da obstaja statistično značilna negativna povezava med izražanjem *Edn1* in sposobnostjo maksimalne kontrakcije pri kombinirani terapiji z atorvastatinom in losartanom. Na prvi pogled je omenjena povezava nelogična, saj smo predpostavljeni, da

obstaja med parametrom po pozitivna korelacija. Glede na podatke v literaturi in na samo delovanje ET-1, smo namreč predvidevali, da bo pod vplivom kombinirane terapije atorvastatina in losartana sposobnost maksimalne kontrakcije zmanjšana, zmanjšano pa bi moralo biti tudi izražanje *Edn1* (84). Izražanje gena za ET-1 se namreč odraža v nastali mRNA, ki se sprva prepiše v preproET-1, nato ga cepijo furinu podobne peptidaze do proET-1, ki je neaktivен. Šele z ECE nastane aktivni ET-1, kar predstavlja pomembno stopnjo varovanja vazokonstriktornega odziva ET-1. Čeprav je bilo mRNA veliko, je lahko nastalega aktivnega ET-1 malo in je posledično manjša tudi kontrakcija žilnih obročkov. Žal v našem poskusu nismo merili količine vseh vmesnih stopenj biosinteze endotelinov in količine končnega peptida. Prav tako tudi ne količine ECE, ki bi bila lahko zmanjšana, vendar tega ne moremo zanesljivo potrditi. Zato lahko le sklepamo na manjši nastanek endotelinov glede na naše rezultate testa funkcijске odzivnosti žil.

Nazadnje smo ugotavljali povezavo med izražanjem *Ednra* in funkcijskimi spremembami na izoliranih podganjih torakalnih aortah pri subterapevtskih odmerkih atorvastatina, losartana, perindoprila oziroma pri kombinaciji atorvastatina in enega od omenjenih antihipertenzivov. Pri kombinirani terapiji z atorvastatinom in losartanom smo zabeležili statistično značilno pozitivno povezavo med izražanjem *Ednra* in sposobnostjo maksimalne relaksacije. Omenjena ugotovitev ni skladna z našimi začetnimi predpostavkami in podatki iz literature. Predvidevali smo, da s kombinirano terapijo atorvastatina in losartana pomembno znižamo izražanje *Ednra* in s tem povečamo maksimalno sposobnost relaksacije podganjih torakalnih aort ter zmanjšamo maksimalno sposobnost kontrakcije. Običajna zanka uravnave aktivnega ET-1 se aktivira, ko se zmanjša raven ET-1, zato se poveča izražanje *Ednra* in posledično tudi sinteza ET<sub>A</sub> receptorjev, da se kompenzira odsotnost ET-1. Ker je agonista ET-1 manj, nastane malo kompleksov ET-1-ET<sub>A</sub>, zato je kontrakcija zmanjšana. Posledično bodo imeli relaksanti navidezno večji učinek, saj bo konstriktorjev manj in zato se žile bolj relaksirajo. Pri kombinirani terapiji z atorvastatinom in perindoprilom nismo uspeli dokazati povezanosti s funkcijskimi spremembami torakalnih aort, kot smo pričakovali.

## 6. SKLEPI

V okviru diplomske naloge smo želeli ugotoviti, ali že subterapevtski odmerki atorvastatina, losartana, perindoprila in njihove kombinacije, ki delujejo antiaterogeno, vplivajo na izražanje *Edn1* in *Ednra* v izoliranem tkivu podganjih torakalnih aort, sicer zdravih podgan. Na podlagi rezultatov v diplomski nalogi lahko zaključimo:

- Skupina podgan, ki je prejemala kombinirano terapijo z atorvastatinom in losartanom v pozrem terapevtskem obdobju (8 + 10 tednov), je imela statistično značilno nižje izražanje *Ednra* v obročkih torakalne aorte v primerjavi s kontrolno skupino ( $p = 0.027$ ). Prav tako je do statistično značilnega znižanja izražanja *Ednra* prišlo tudi med zgodnjim in poznim terapevtskim obdobjem ( $p = 0.047$ ).
- Pri kombinirani terapiji z atorvastatinom in perindoprilom je bilo izražanje *Ednra* statistično značilno nižje v pozrem terapevtskem obdobju kot pri kontrolni skupini ( $p = 0.011$ ). Do statistično značilnega znižanja izražanja *Ednra* je prišlo tudi med zgodnjim in poznim obdobjem ( $p = 0.047$ ).
- Ugotovili smo, da tako terapija ( $p = 0.013$ ) kot čas terapije ( $p = 0.001$ ) statistično značilno vplivata na izražanje gena *Ednra*, medtem ko njuna interakcija ni signifikantna ( $p > 0.05$ ). S testom Bonferroni smo potrdili, da prihaja do statistično značilnega nižjega izražanja *Ednra* med zgodnjim in poznim terapevtskim obdobjem ( $p = 0.001$ ). Do statistično značilnega znižanega izražanja *Ednra* je prišlo pri skupini, ki je prejemala kombinirano terapijo atorvastatina in losartana v primerjavi s kontrolno skupino ( $p = 0.035$ ) ter pri skupini s kombinirano terapijo atorvastatina in perindoprila glede na kontrolno skupino ( $p = 0.042$ ).
- Dokazali smo statistično značilno pozitivno povezavo med izražanjem *Ednra* in sposobnostjo maksimalne relaksacije pri kombinirani terapiji z atorvastatinom in losartanom.
- Nismo ugotovili statistično značilnega spremenjanja izražanja *Edn1* pri nobeni izmed terapij s subterapevtskimi odmerki. Kljub temu se je pokazal trend znižanja izražanja *Edn1* pri kombinirani terapiji z atorvastatinom in losartanom.
- Obstaja statistično značilna negativna povezava med izražanjem *Edn1* in sposobnostjo maksimalne kontrakcije pri kombinirani terapiji z atorvastatinom in losartanom.

S pričujočo raziskavo smo ugotovili, da predvsem kombinacija subterapevtskih odmerkov atorvastatina in losartana ter kombinacija subterapevtskih odmerkov atorvastatina in perindoprila statistično pomembno znižata izražanje *Ednra* v izoliranem tkivu podganjih torakalnih aort, ki je odgovoren za vazokonstrikcijo žil v endoteliju. S kombinirano terapijo subterapevtskih odmerkov preučevanih zdravil lahko zaščitno delujemo na žilje. Na ta način zelo verjetno zmanjšamo ali celo izničimo neželene stranske učinke preučevanih zdravil, kar je pomembno v primeru nadaljnega preučevanja preventivne terapije na zdravih ljudeh.

Največji problem raziskovalnega dela je bila velikost vzorca, saj smo pri nekaterih posameznih skupinah imeli le po enega ali dva predstavnika, kar onemogoča ustrezeno statistično analizo. To je pogost problem pri raziskavah na živalskem modelu, saj smo omejeni s številom poskusnih živali. Vzorce istih živali zato običajno uporabimo za preučevanje več različnih parametrov v okviru drugih raziskav. Vsekakor bi bilo smiselno ponoviti to delo na večjem številu vzorcev, ki so ustrezeno enakomerno zastopani v preučevanih skupinah (glede na vrsto terapije in čas trajanja terapije). Lahko bi zamenjali tudi vrsto terapije, npr. namesto losartana (sartana z najnižjo lipofilnostjo) bi lahko uporabili zelo lipofilen telmisartan, ki se je v več študijah izkazal za učinkovitejšega pri izkazovanju zaščitnih pleiotropnih učinkov na žilje (43). Bolj lipofilne zdravilne učinkovine namreč lažje penetrirajo v tkiva. Zaželeno bi bilo tudi raziskati, kako se izražata *Edn1* in *Ednra* v živalskem modelu s predklinično zaznavnimi spremembami žilja (npr. okvaro endotelija) po terapiji s subterapevtskimi odmerki preučevanih zdravilnih učinkovin in njihovih kombinacij. Na ta način bi dobili natančnejši vpogled v znotrajcelične mehanizme, s katerimi endotelini in njihovi receptorji pomembno prispevajo k razvoju ateroskleroze. Čeprav ima *Ednra* pomembno vlogo pri razvoju embrija in sodeluje v mnogih fizioloških procesih ter je vpletен v patogenezo različnih obolenj, ostajajo mehanizmi uravnavanja njegovega izražanja še vedno neznanka. Prav tako bi bilo smiselno istočasno preučevati vpliv terapije na izražanje gena, ki kodira endotelinski receptor tipa B (*Ednrb*), saj so prav ET<sub>B</sub> receptorji na EC žil odgovorni za sproščanje vazodilatatorjev in posledično vodijo v želeno vazodilatacijo.

Poleg raziskav izražanja genov bi bilo smiselno meriti izražanje in aktivnosti peptidov ET-1, ET<sub>A</sub> in ET<sub>B</sub> ter preučevati posttranslacijske modifikacije teh peptidov. V primeru

pozitivnih rezultatov bi lahko preučevali izražanje *Edn1* in *Ednra* ter povezanost njunega izražanja s funkcijskimi spremembami žil ob jemanju subterapevtskih odmerkov statinov, antihipertenzivov ali njihove kombinacije tudi na človeškem žilnem tkivu. Omejitev te raziskave je bila namreč ta, da smo pridobili podatke iz poskusov na podghanah. Fiziologija in patofiziologija podgan se pomembno razlikujeta od človeka, zato ne moremo direktno primerjati dobljenih rezultatov. Vsekakor dobljeni rezultati na izoliranih torakalnih aortah podgan pomembno prispevajo k boljšemu razumevanju principa delovanja subterapevtskih odmerkov preučevanih zdravil in ugotavljanju njihove učinkovitosti pri izboljšanju delovanja žilja. Predvsem s kombinirano terapijo statina (atorvastatina) in enega izmed antihipertenzivov (losartana, perindoprila) v nizkih odmerkih bi lahko pomembno izboljšali delovanje arterijske stene ter s tem že v zgodnjem obdobju upočasnili nastanek in napredovanje ateroskleroze. Preučevan princip terapije bi lahko predstavljal nov pristop v preventivi srčno-žilnih bolezni, ki so v razvitem svetu še vedno v porastu. Vsekakor so potrebne nadaljnje študije, ki bodo rezultate pridobljene v tej diplomski nalogi preverile in pojasnile mehanizme, ki so vpleteni v zaščitno delovanje omenjenih zdravil na žilje preko spremenjanja izražanja preučevanih genov.

## 7. LITERATURA

1. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988;332:411-5.
2. Schmitz-Spanke S, Schipke JD. Potential role of endothelin-1 and endothelin antagonists in cardiovascular diseases. *Basic Res Cardiol*. 2000;95:290-8.
3. Barton M, Yanagisawa M. Endothelin: 20 years from discovery to therapy. *Can J Physiol Pharmacol*. 2008;86:485-98.
4. Unic A, Derek L, Hodak N, Marijancevic D, Ceprnja M, Serdar T, et al. Endothelins - clinical perspectives. *Biochimia Medica*. 2011;21(3):231-42.
5. Kawanabe Y, Nauli SM. Endothelin. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68:195-203.
6. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:2863-7.
7. Davenport AP, Maguire JJ. Endothelin. *Handb Exp Pharmacol*. 2006;176 Pt1:295-329.
8. Wanecek M, Weitzberg E, Rudehill A, Oldner A. The endothelin system in septic and endotoxin shock. *European Journal of Pharmacology*. 2000;407(1-2):1-15.
9. Drevenšek G, Budihna MV, editors. Importance of localisation of endothelin receptors in human coronary arteries. *Cardiovascular Diseases: 32nd memorial meeting devoted to professor Janez Plečnik/ International symposium in memory of professor Rene Favaloro*; 2001 December 6-8, 2001; Medical faculty, Ljubljana, Slovenia.
10. Stow LR, Jacobs ME, Wingo CS, Cain BD. Endothelin-1 gene regulation. *FASEB J*. 2011;25(1):16-28.
11. Attina T, Camidge R, Newby DE, et al. Endothelin antagonism in pulmonary hypertension, heart failure, and beyond. *Heart*. 2005;91:825-31.
12. Kogoj P, Hawlina S, Bunc M. Od endotelija odvisno uravnavanje žilnega napona. *Med Razgl*. 2008;47:31-42.
13. Schneider MP, Boesen EI, Pollock DM. Contrasting actions of endothelin ET(A) and ET(B) receptors in cardiovascular disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007;47:731-59.

14. Hynynen MM, Khalil RA. The vascular endothelin system in hypertension - recent patents and discoveries. *Recent Patents Cardiovasc Drug Discov.* 2006;1(1):95-108.
15. Chun M, Liyanage UK, Lisanti MP, Lodish HF. Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(24):11728-32.
16. Nilsson D, Wackenfors A, Gustafsson L, Ugander M, Ingmansson R, Edvinsson L, et al. PKC and MAPK signalling pathways regulate vascular endothelin receptor expression. *Eur J Pharmacol.* 2008;580(1-2):190-200.
17. Poredič P, Poredič P, Visnovič-Poredič A. Pomen odkrivanja predkliničnih oblik ateroskleroze. *Zdrav Vestn.* 2006;75:475-81.
18. Ribarič S, et al. Temelji patološke fiziologije. 1. ed. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo; 2009.
19. Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D, Osredkar J, Horvat M, Keber I, et al. Interna medicina. Ljubljana: Littera picta, 2005 (Ljubljana : Pleško); 2005.
20. Lunder M, Janić M, Skarlovnik A, Turk M, Habljan S, Šabovič M. Staranje arterijskega sistema. *Zdrav Vestn.* 2012;81(9):653-63.
21. Janić M, Lunder M, Šabovič M. Okrnjeno delovanje endotelija. *Med Razgl.* 2011;50(3):297-305.
22. Atherosclerosis. [6.3.2012]; Available from: <http://www.scientific-art.com/portfolio%20medicine%20pages/atherosclerosis.htm>.
23. Wang X, Douglas SA, Louden C, Vickery-Clark LM, Feuerstein GZ, E.H. O. Expression of endothelin-1, endothelin-3, endothelin-converting enzyme-1, and endothelin-A and endothelin-B receptor mRNA after angioplasty-induced neointimal formation in the rat. *Circ Res.* 1996;78(2):322-8.
24. Xu CB, Sun Y, Edvinsson L. Cardiovascular risk factors regulate the expression of vascular endothelin receptors. *Pharmacol Ther.* 2010;127(2):148-55.
25. Aitsebaomo J, Kingsley-Kalles ML, Wu Y, Quertermous T, Patterson C. Vezf1/DB1 is an endothelial cell-specific transcription factor that regulates expression of the endothelin-1 promoter. *J Biol Chem.* 2001;276(42):39197-205.
26. Rodríguez-Pascual F, Busnadio O, Lagares D, Lamas S. Role of endothelin in the cardiovascular system. *Pharmacological research.* 2011;63(6):463-72.

27. Kawana M, Lee ME, Quertermous EE, Quertermous T. Cooperative interaction of GATA-2 and AP1 regulates transcription of the endothelin-1 gene. *Mol Cell Biol* 1995;15(8):4225-31.
28. Hosoda K, Nakao K, Tamura N, Arai H, Ogawa Y, Suga S, et al. Organization, structure, chromosomal assignment, and expression of the gene encoding the human endothelin-A receptor. *J Biol Chem*. 1992;267(26):18797-804.
29. Yamashita J, Yoshimasa T, Arai H, Hiraoka J, Takaya K, Miyamoto Y, et al. Cis elements for transcriptional regulation of the human endothelin-A receptor gene. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1995;26(3):S26-S8.
30. Yamashita J, Yoshimasa T, Arai H, Hiraoka J, Takaya K, Miyamoto Y, et al. Identification of cis-elements of the human endothelin-A receptor gene and inhibition of the gene expression by the decoy strategy. *The journal of biological chemistry*. 1998;273(26):15993-9.
31. Dimondo JP, Yang CC, Holy S, Claxton C, Prody C. Sequence of the 5'-flanking and 5'-UTR regions of the rat endothelin-A receptor gene. *DNA Seq*. 1996;6(5):285-91.
32. Li P, Oparil S, Sun JZ, Thompson JA, Chen YF. Fibroblast growth factor mediates hypoxia-induced endothelin-A receptor expression in lung artery smooth muscle cells. *J Appl Physiol*. 2003;95(2):643-51.
33. Lunder M, Žiberna L, Drevenšek G, Šabovič M. Zaščitni pleiotropni učinki statinov. *Zdrav Vestn*. 2011;80:39-49.
34. Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:89-118.
35. Babelova A, Sedding DG, Brandes RP. Anti-atherosclerotic mechanisms of statin therapy. *Curr Opin Pharmacol*. 2013;13(2):260-4.
36. Lunder M, Janić M, Habjan S, Šabovič M. Subtherapeutic, low dose fluvastatin improves functional and morphological arterial wall properties in apparently healthy, middle-aged males - a pilot study. *Atherosclerosis*. 2011;215(2):446-51.
37. Karter Y, Curgunlu A, Ertürk N, Vehid S, Mihmanli I, Ayan F. Effects of low and high doses of atorvastatin on arterial compliance. *Jpn Heart J*. 2003;44(6):953-61.
38. Murrow JR, Sher S, Ali S, Uphoff I, Patel R, Porkert M, et al. The differential effect of statins on oxidative stress and endothelial function: atorvastatin versus pravastatin. *J Clin Lipidol*. 2012;6(1):42-9.

39. Vukan V. Arterijska hipertenzija; primerjava zaviralcev ACE in sartanov. Farm Vestn. 2013;64(1):3-10.
40. Cha JH, Lee HR, Kim KC, Cho MS, Hong YM. Changes of gene expressions in spontaneously hypertensive rat model after losartan treatment. Korean Circ J. 2012;42(11):761-8.
41. Munger MA. Use of Angiotensin receptor blockers in cardiovascular protection: current evidence and future directions. P&T. 2011;36(1):22-40.
42. Chrysant SG, Chrysant GS. The pleiotropic effects of angiotensin receptor blockers. J Clin Hypertens (Greenwich). 2006;8(4):261-8.
43. Takai S, Kirimura K, Jin D, Muramatsu M, Yoshikawa K, Mino Y, et al. Significance of angiotensin II receptor blocker lipophilicities and their protective effect against vascular remodeling. Hypertens Res. 2005;28(7):593-600.
44. Chrysant SG. Stroke prevention with losartan in the context of other antihypertensive drugs. Drugs Today (Barc). 2004;40(9):791-801.
45. Flammer AJ, Hermann F, Wiesli P, Schwegler B, Chenevard R, Hürlimann D, et al. Effect of losartan, compared with atenolol, on endothelial function and oxidative stress in patients with type 2 diabetes and hypertension. J Hypertens. 2007;25(4):785-91.
46. Sonoda M, Aoyagi T, Takenaka K, Uno K, Nagai R. A one-year study of the antiatherosclerotic effect of the angiotensin-II receptor blocker losartan in hypertensive patients. A comparison with angiotension-converting enzyme inhibitors. Int Heart J. 2008;49(1):95-103.
47. Yao EH, Fukuda N, Matsumoto T, Kobayashi N, Katakawa M, Yamamoto C, et al. Losartan improves the impaired function of endothelial progenitor cells in hypertension via an antioxidant effect. Hypertens Res. 2007;30(11):1119-28.
48. Martins-Oliveira A, Castro MM, Oliveira DM, Rizzi E, Ceron CS, Guimaraes D, et al. Contrasting effects of aliskiren versus losartan on hypertensive vascular remodeling. Int J Cardiol. 2013;167(4):1199-205.
49. Sato Y, Fujii S, Imagawa S, Ohmura K, Ohmura Y, Andoh Y, et al. Platelet aggregability in patients with hypertension treated with angiotensin II type 1 receptor blockers. J Atheroscler Thromb. 2007;14(1):31-5.
50. Jiménez AM, Montón M, García R, Núñez A, Gómez J, Rico L, et al. Inhibition of platelet activation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats: comparison of losartan, candesartan, and valsartan. J Cardiovasc Pharmacol. 2001;37(4):406-12.

51. Porteri E, Rodella L, Rizzoni D, Rezzani R, Paiardi S, Sleiman I, et al. Effects of olmesartan and enalapril at low or high doses on cardiac, renal and vascular interstitial matrix in spontaneously hypertensive rats. *Blood Press.* 2005;14(3):184-92.
52. Ferrari R, Guardigli G, Ceconi C. Secondary prevention of CAD with ACE inhibitors: a struggle between life and death of the endothelium. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2010;24(4):331-9.
53. Fox KM, Investigators. EtOrocewPiscAd. Efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial (the EUROPA study). *Lancet.* 2003;362(9386):782-8.
54. Group PC. Randomised trial of a perindopril-based blood-pressure-lowering regimen among 6,105 individuals with previous stroke or transient ischaemic attack. *Lancet.* 2001;358(9287):1033-41.
55. Meurin P. The ASCOT trial: clarifying the role of ACE inhibition in the reduction of cardiovascular events in patients with hypertension. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2006;6(5):327-34.
56. Bertrand ME. Provision of cardiovascular protection by ACE inhibitors: a review of recent trials. *Curr Med Res Opin.* 2004;20(10):1559-69.
57. Krysiak R, Okopień B. Pleiotropic effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors in normotensive patients with coronary artery disease. *Pharmacol Rep.* 2008;60(4):514-23.
58. Dinicolantonio JJ, Lavie CJ, O'Keefe JH. Not all angiotensin-converting enzyme inhibitors are equal: focus on ramipril and perindopril. *Postgrad Med* 2013;125(5):154-68.
59. Ferrari R, Fox K. Insight into the mode of action of ACE inhibition in coronary artery disease: the ultimate EUROPA story. *Drugs.* 2009;69(3):265-77.
60. Krysiak R, Okopień B. Lymphocyte-suppressing action of angiotensin-converting enzyme inhibitors in coronary artery disease patients with normal blood pressure. *Pharmacol Rep.* 2011;63(5):1151-61.
61. Ferrari R. Angiotensin-converting enzyme inhibition in cardiovascular disease: evidence with perindopril. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2005;3(1):15-29.
62. User's manual Pure LinkTM RNA Mini Kit (invitrogen, Carlsbad, California, ZDA)  
Available from:  
[https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/purelink\\_rna\\_mini\\_kit\\_man.pdf](https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/purelink_rna_mini_kit_man.pdf).

63. Expert user's guide Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent technologies Palo Alto, California). Available from:  
[http://www.chem.agilent.com/library/usermanuals/Public/G2946-90004\\_Vespucci\\_UG\\_eBook\\_%28NoSecPack%29.pdf](http://www.chem.agilent.com/library/usermanuals/Public/G2946-90004_Vespucci_UG_eBook_%28NoSecPack%29.pdf).
64. Štrukelj B, Kos J, al. e. Biološka zdravila: od gena do učinkovine. 1. ed. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo; 2007.
65. Protocol for High-Capacity cDNA Archive Kit [november 2014]; Available from: [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_041198.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041198.pdf).
66. Real Time PCR: From Theory to Practice. [november 2014]; Available from: <http://core.cgrb.oregonstate.edu/sites/default/files/Real%20Time%20PCR.From%20Theory%20to%20Practice.pdf>.
67. Yuan CC, Peterson RJ, Wang CD, Goodsaid F, Waters DJ. 5' Nuclease Assays for the Loci CCR5-+/ $\Delta$ 32, CCR2-V64I, and SDF1-G801A Related to Pathogenesis of AIDS Clinical Chemistry. 2000;46(1):24-30.
68. ABI Prism 7000 Sequence Detection System User guide. [november 2014]; Available from:  
<http://www2.udel.edu/ctcr/sites/udel.edu.ctcr/files/ABI%20Prism%207000%20Sequence%20Detection%20System%20User%20Guide.pdf>.
69. Ruedrich ED, Henzel MK, Hausman BS, Bogie KM. Reference gene identification for reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction analysis in an ischemic wound-healing model. J Biomol Tech 2013;24(4):181-6.
70. Wolfrum S, Jensen KS, Liao JK. Endothelium-dependent effects of statin. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003;23(5):729-36.
71. Bourque SL, Davidge ST, Adams MA. The interaction between endothelin-1 and nitric oxide in the vasculature: new perspectives. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2011;300(6):1288-95.
72. Hernández-Perera O, Pérez-Sala D, Navarro-Antolín J, Sánchez-Pascuala R, Hernández G, Díaz C, et al. Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. J Clin Invest. 1998;101(12):2711-9.

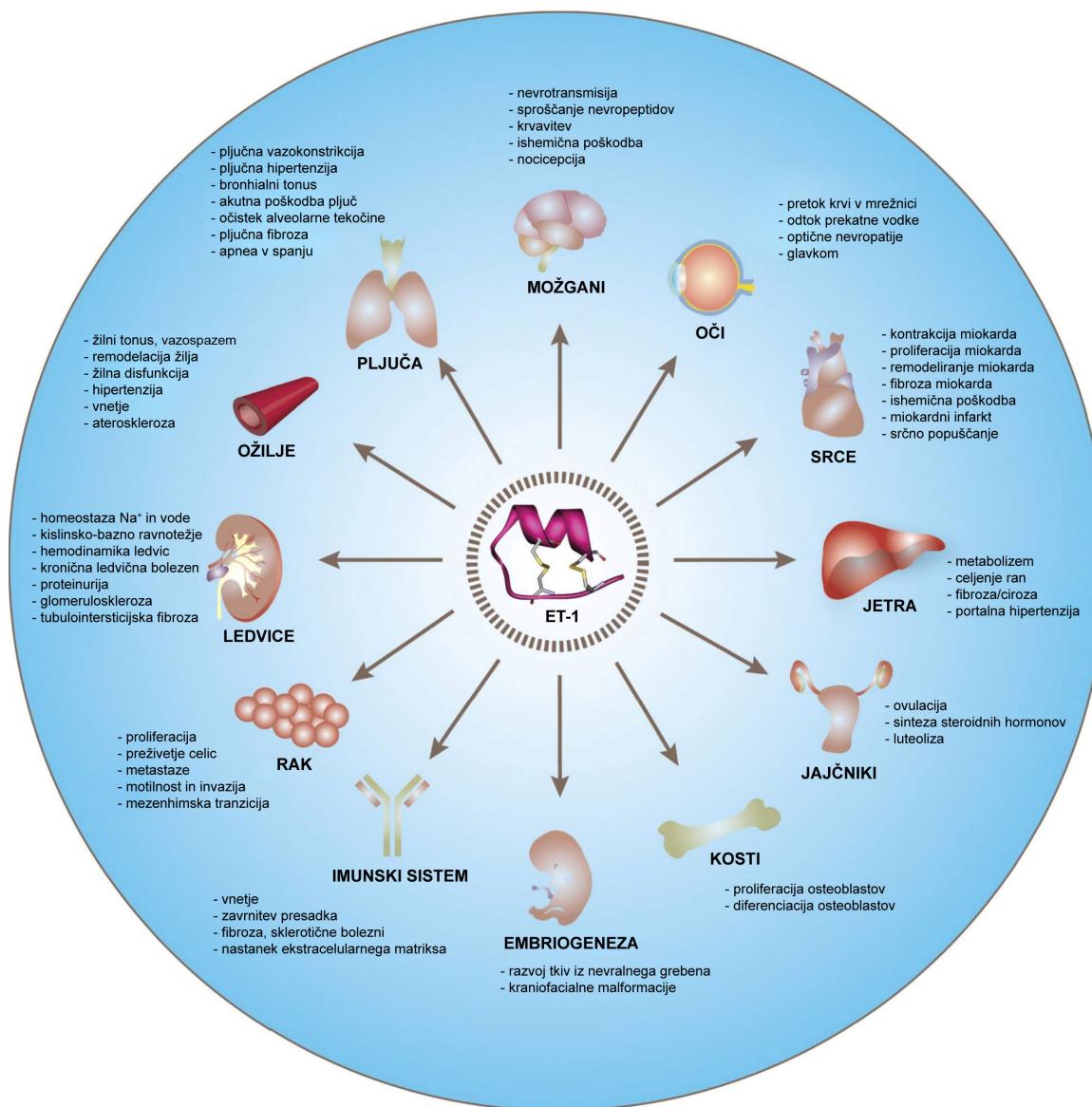
73. Ozaki K, Yamamoto T, Ishibashi T, Matsubara T, Nishio M, Aizawa Y. Regulation of endothelial nitric oxide synthase and endothelin-1 expression by fluvastatin in human vascular endothelial cells. *Jpn J Pharmacol* 2001;85(2):147-54.
74. Hernández-Perera O, Pérez-Sala D, Soria E, Lamas S. Involvement of Rho GTPases in the transcriptional inhibition of preproendothelin-1 gene expression by simvastatin in vascular endothelial cells. *Circ Res*. 2000;87(7):616-22.
75. Hong HJ, Chan P, Liu JC, Juan SH, Huang MT, Lin JG, et al. Angiotensin II induces endothelin-1 gene expression via extracellular signal-regulated kinase pathway in rat aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 2004;61(1):159-68.
76. Ruiz-Ortega M, Gómez-Garre D, Liu XH, Blanco J, Largo R, Egido J. Quinapril decreases renal endothelin-1 expression and synthesis in a normotensive model of immune-complex nephritis. *J Am Soc Nephrol*. 1997;8(5):756-68.
77. Zhu WW, Liu XP, Wu N, Zhao TT, Zhao Y, Zhang J, et al. Beneficial effects of losartan on vascular injury induced by advanced glycosylation end products and their receptors in spontaneous hypertension rats. *Mol Cell Biochem*. 2007;304(1-2):35-43.
78. Xu CB, Stenman E, Edvinsson L. Reduction of bFGF-induced smooth muscle cell proliferation and endothelin receptor mRNA expression by mevastatin and atorvastatin. *Biochem Pharmacol*. 2002;64(3):497-505.
79. Lin YJ, Kwok CF, Juan CC, Hsu YP, Shih KC, Chen CC, et al. Angiotensin II enhances endothelin-1-induced vasoconstriction through upregulating endothelin type A receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;451(2):263-9.
80. Kanaki AI, Sarafidis PA, Georgianos PI, Kanavos K, Tziolas IM, Zebekakis PE, et al. Effects of low-dose atorvastatin on arterial stiffness and central aortic pressure augmentation in patients with hypertension and hypercholesterolemia. *Am J Hypertens* 2013;26(5):608-16.
81. Yi I, Lee JJ, Park JS, Zhang WY, Kim IS, Kim Y, et al. Enhanced effect of losartan and rosuvastatin on neointima hyperplasia. *Arch Pharm Res* 2010;33(4):593-600.
82. Ceriello A, Assaloni R, Da Ros R, Maier A, Piconi L, Quagliaro L, et al. Effect of atorvastatin and irbesartan, alone and in combination, on postprandial endothelial dysfunction, oxidative stress, and inflammation in type 2 diabetic patients. *Circulation* 2005;111(19):2518-24.
83. Novella S, Dantas AP, Segarra G, Vidal-Gómez X, Mompeón A, Garabito M, et al. Aging-related endothelial dysfunction in the aorta from female senescence-accelerated

mice is associated with decreased nitric oxide synthase expression. *Exp Gerontol.* 2013;48(11):1329-37.

84. Rodrigo E, Maeso R, Muñoz-García R, Navarro-Cid J, Ruilope LM, Cachofeiro V, et al. Endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: consequences of chronic treatment with losartan or captopril. *J Hypertens.* 1997;15(6):613-8.

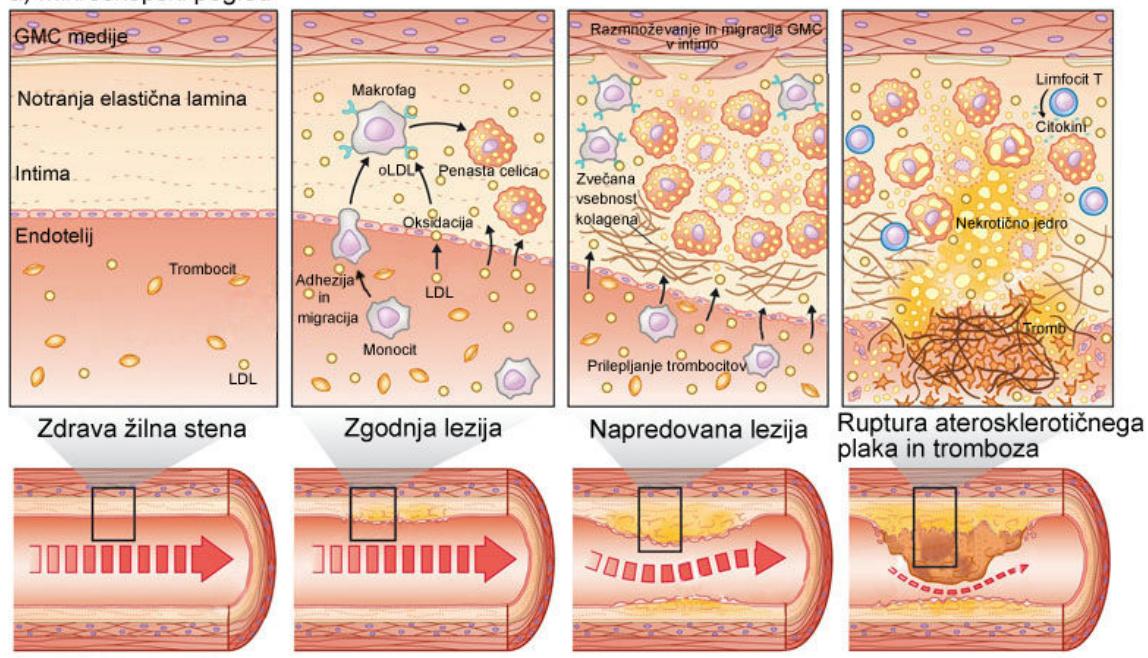
## PRILOGE

### Priloga 1: Biološki učinki ET-1 in primeri kliničnih manifestacij (10)

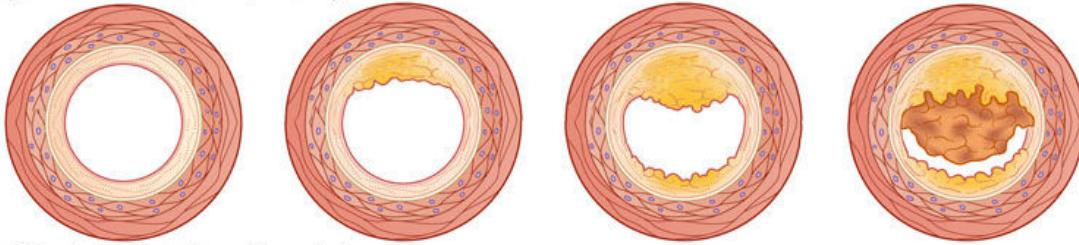


**Priloga 2:** Nastajanje aterosklerotične lehe v arteriji (22)

a) Mikroskopski pogled



b) Vzdolžni makroskopski pogled



c) Prečni makroskopski pogled



Prvo stopnjo v razvoju ateroskleroze predstavlja endoteljska disfunkcija. Endoteljska disfunkcija pospešuje vstopanje lipoproteinov v arterijsko steno in njihovo oksidacijo, vstopanje monocitov in limfocitov T v arterijsko steno, proliferacijo GMC, sintezo zunajceličnega matriksa, spodbuja vazokonstrikcijo in protrombotično stanje v svetlini arterije (18).

**Priloga 3:** Primer delovne sheme z vpisanimi pozicijami pipetiranja (za gen *Ednra*)

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>A</b>	EDNRA14	EDNRA14	EDNRA14	EDNRA14	EDNRA7	EDNRA7	EDNRA7	EDNRA7	EDNRA3,5	EDNRA3,5	EDNRA3,5	EDNRA3,5
<b>B</b>	EDNRA1,75	EDNRA1,75	EDNRA1,75	EDNRA1,75	EDNRA0,88	EDNRA0,88	EDNRA0,88	EDNRA0,88	NK	NK		
<b>C</b>	VZ1	VZ1	VZ1	VZ2	VZ2	VZ2	VZ3	VZ3	VZ4	VZ4		VZ4
<b>D</b>	VZ5	VZ5	VZ5	VZ6	VZ6	VZ6	VZ7	VZ7	VZ8	VZ8		VZ8
<b>E</b>	VZ9	VZ9	VZ9	VZ10	VZ10	VZ10	VZ11	VZ11	VZ12	VZ12		VZ12
<b>F</b>	VZ13	VZ13	VZ13	VZ14	VZ14	VZ14	VZ15	VZ15	VZ16	VZ16		VZ16
<b>G</b>	VZ17	VZ17	VZ17	VZ18	VZ18	VZ18	VZ19	VZ19	VZ20	VZ20		VZ20
<b>H</b>	VZ21	VZ21	VZ21	VZ22	VZ22	VZ22	VZ23	VZ23	VZ24	VZ24		VZ24