

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

ADRIJANA GAŠPAROVIĆ

**PROUČEVANJE NIVOJA mRNA ŽILNOCELIČNEGA
ADHEZIJSKEGA PROTEINA-1 (*VCAM1*) V PLAZMI BOLNIKOV S
KORONARNO ATEROSKLEROZO**

**PLASMA LEVEL mRNA VASCULAR CELL ADHESION
MOLECULE-1 (*VCAM1*) IN PATIENTS WITH CORONARY
ATHEROSCLEROSIS**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Magistrsko delo sem opravljala na Katedri za klinično kemijo in biokemijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani, pod mentorstvom izr.prof.dr. Darka Černeta. Merjenje koncentracije proteina VCAM-1 je bilo opravljeno v Laboratoriju za žilne bolezni KC Ljubljana, merjenje koncentracij CRP, HOL, LDL, HDL in TG pa v laboratoriju Splošne bolnišnice Jesenice.

Zahvala

Zahvaljujem se predvsem mentorju za izkazano strokovno pomoč in nasvete pri opravljanju magistrske naloge, vsem zaposlenim na Katedri za klinično kemijo in biokemijo ter svoji družini za nesebično podporo.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Darka Černeta.

Adrijana Gašparović

.....

Predsednik komisije: prof. dr. Borut Božič

Mentor: izr. prof. dr. Darko Černe

Član komisije: doc. dr. Bojan Doljak

Ljubljana, junij 2011

VSEBINA

SEZNAM OKRAJŠAV	5
POVZETEK	7
1. UVOD	8
1.1. ATEROSKLEROZA	8
1.1.1. KORONARNA ATEROSKLEROZA (CAD)	9
1.1.2. DEJAVNIKI TVEGANJA ZA RAZVOJ ATEROSKLEROZE	10
1.1.3. LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA TVEGANJA ZA RAZVOJ ATEROSKLEROZE	12
1.1.4. PREPREČEVANJE ATEROSKLEROZE	13
1.1.5. ATEROSKLEROZA NA CELIČNO-MOLEKULARNEM NIVOJU	14
1.2. ADHEZIJSKE MOLEKULE IN NJIHOV POMEN	16
1.2.1. VCAM-1	17
1.3. ZUNAJCELIČNE NUKLEINSKE KISLINE IN NJIHOVA UPORABA V BIOMEDICINI	20
1.3.1. IZVOR IN LASTNOSTI ZNK	21
1.3.2. UPORABA ANALIZE ZNK V LABORATORIJSKI MEDICINI	21
2. IZHODIŠČA IN NAMEN DELA	23
3. MATERIALI IN METODE	24
3.1. MATERIALI	24
3.1.1. VZORCI	24
3.1.2. MATERIALI IN APARATURA	24
3.2. METODE	26
3.2.1. SPLOŠNE METODE	26
3.2.2. IZOLACIJA ZUNAJCELIČNIH NUKLEINSKIH KISLIN	28
3.2.3. PREPIS MRNA V CDNA	29
3.2.4. PRIPRAVA INTERNE KONTROLE	30
3.2.5. VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU (RT-PCR)	31
3.2.6. MERJENJE KONCENTRACIJE PROTEINA VCAM-1, CRP, HOL, HDL, LDL, IN TG	34
3.2.7. STATISTIČNA ANALIZA	35
4. REZULTATI	36
5. RAZPRAVA	40
6. ZAKLJUČKI	43
7. LITERATURA	44

8. PRILOGE	48
<u>PRILOGA I: REZULTATI MERITEV IN IZRAČUNANE STANDARDIZIRANE VREDNOSTI GLEDE NA IZRAŽANJE HIŠNEGA GENA</u>	<u>48</u>
<u>PRILOGA II: SERUMSKE KONCENTRACIJE PROTEINA VCAM-1, CRP, HOL, LDL, HDL IN TG</u>	<u>51</u>

SEZNAM OKRAJŠAV

AKS (angl. acute coronary sindrom) – akutni koronarni sindrom

Apo AI/AII – apolipoprotein 1/2

Apo B – apolipoprotein B

Apo E – apolipoprotein E

CAD (angl. coronary artery disease) – koronarna arterijska bolezen

CAT L – katepsin L

CD40 (angl. cluster of differentiation 40) – CD40

cDNA – DNA komplementarna mRNA

CRP (angl. C-reactive protein) – C reaktivni protein

ELISA (angl. enzyme-linked immunosorbent assay)

HDL (angl. high density lipoprotein) – lipoprotein visoke gostote

HMG-CoA - hidroksimetilglutaril-koencim A

HOL - holesterol

ICAM-1 (angl. intercellular cell adhesion molecule-1) – znotrajcelična adhezijska molekula-1

IFN- γ – interferon γ

IL-1/4/6/8 – interlevkin 1/4/6/8

IL- β – interlevkin β

kDa – kilodalton, oznaka za velikost molekul

LDL (angl. low density lipoprotein) – lipoprotein nizke gostote

Lp(a) – lipoprotein (a)

MCP-1 (angl. monocyte chemoattractant protein-1) – monocitni kemoatraktantni protein-1

mg/L – miligram snovi raztopljen v litri raztopine

mmol/L – mmol množine topljenca na liter raztopine

MMP9 (angl. matrix metaloproteinase 9) –metaloproteinaza matriksa 9

mRNA (angl. messenger ribonuclear acid) – informacijska ribonukleinska kislina

ng/mL – nanogram snovi raztopljen v mililitru raztopine

NO – dušikov oksid

PECAM-1 (angl.platelet endothelial cell adhesion molecule-1) – trombocitna endotelno celična adhezijska molekula-1

PGK-1 (angl. phosphoglycerate kinase-1) – fosfogliceratkinaza-1

Rcf – (angl. Relative Centrifugal Force) – relativna centrifugalna sila

RT – reverzna transkripcija

RT-PCR (angl. real-time polymerase chain reaction) – verižna reakcija s polimerazo v realnem času

SKS – stabilni koronarni sindrom

Taq DNA polimeraza – *Thermus aquaticus* DNA polimeraza

TF (angl. tissue factor) – tkivni dejavnik

TG - trigliceridi

TNF- α (angl. tumour necrosis factor- α) – dejavnik tumorske nekroze α

VCAM-1 (angl. vascular cell adhesion molecule) – žilnocelični adhezijski protein-1

VCAM1- gen ki kodira protein VCAM-1

VLA-4 (angl. very late antigen-4) – zelo pozen antigen-4, $\alpha 4\beta 1$ integrin

VLDL (angl. very low density lipoprotein) – lipoprotein zelo nizke gostote

zNK – zunajcelične nukleinske kisline

POVZETEK

Koronarna ateroskleroza (CAD) je vodilni vzrok smrtnosti v razvitem svetu, a predvideva se da bo do leta 2020 postala vodilni vzrok smrtnosti tudi v nerazvitih deželah. V razviti obliki ponavadi privede do infarkta miokarda, možganske kapi ali periferne žilne bolezni. Vnetje je v patogenezi ateroskleroze izjemno pomembno in levkociti imajo ključno vlogo v razvoju aterosklerotične lehe. Aktivirani žilni endotelij poveča izražanje žilnoceličnega adhezijskega proteina-1 (VCAM-1) na katerega se lahko vežejo monociti in limfociti. Ti potem lahko vstopajo skozi žilni endotelij ter sproščajo citokine in encime pomembne za napredovanje poškodbe. VCAM-1 je identificiran kot obetajoč diagnostični kazalec in potencialna protivnetna terapevtska tarča.

V magistrski nalogi smo nameravali dokazati, da imajo bolniki s CAD višji plazemski nivo mRNA *VCAM1* kot zdravi preiskovanci ter da v plazmi bolnikov s CAD nivo mRNA *VCAM1* korelira s koncentracijo proteina VCAM-1. Da bi hipotezi dokazali, smo nivo mRNA *VCAM1* izmerili s pomočjo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (RT-PCR), pri čemer je sodelovalo 24 vzorcev bolnikov z stabilnim koronarnim sindromom (SKS), 32 vzorcev bolnikov z akutnim koronarnim sindromom (AKS) ter 30 vzorcev zdravih preiskovancev. Hkrati je bila v serumu izmerjena tudi koncentracija proteina VCAM-1, C-reaktivnega proteina (CRP), ter določen lipidni profil (HOL, HDL, LDL, TG).

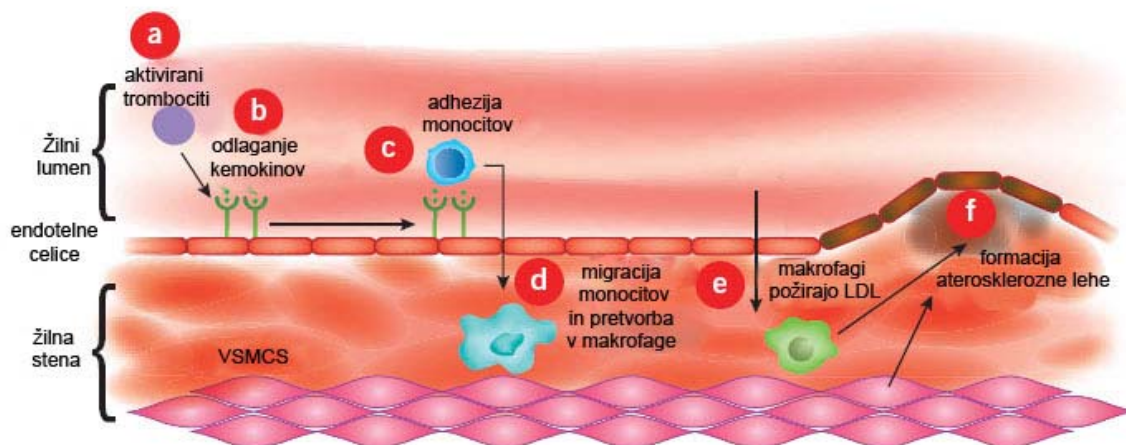
Ugotovili smo, da je AKS močno povezan s povišanim nivojem mRNA *VCAM1*, medtem ko je protein VCAM-1 povezan tako z AKS kot tudi s SKS. Dokazali smo, da imajo statini značilen vpliv tako na mRNA *VCAM1* kot tudi na VCAM-1. Znižane vrednosti HDL holesterola so bile povezane z zvišanimi vrednostmi mRNA *VCAM1*, medtem ko so bile znižane vrednosti celotnega holesterola povezane z zvišano koncentracijo proteina VCAM-1. Ta odnos je verjetno posledica jemanja statinov, ki znižujejo holesterol, ampak očitno ne delujejo na izražanje proteina VCAM-1, ali pa škodljivih učinkov statinov zaradi visokih odmerkov. Ugotovili smo tudi, da obstaja le šibka korelacija med nivojem mRNA *VCAM1* v plazmi in koncentracijo proteina VCAM-1 v serumu, verjetno zaradi *in vivo* dogajanj na nivoju mRNA pred samo sintezo proteina. Z optimizacijo metod in dodatnimi raziskavami v preučevanju nivoja mRNA *VCAM1* bomo lahko v prihodnosti pridobili zlati standard za zgodnjo neinvazivno diagnostiko CAD in njenih smrtno nevarnih zapletov.

1. UVOD

1.1. ATEROSKLEROZA

Ateroskleroza je bolezen velikih in srednje velikih arterij pri kateri se na notranji površini arterijske stene odlagajo maščobne oz. aterosklerotične lehe. Proces se začne že v otroštvu ter kot tak ne povzroča nobenih simptomov, dokler ne pride do kritičnega zoženja arterij, pri čemer simptome povzroča nezadosten dotok kisika i hranljivih snovi do organov in tkiv. Simptomi so lahko progresivni (nastanejo kadar se žila postopno zožuje) ali nagli, (žila se akutno zamaši, najpogosteje kot posledica odtrganega dela aterosklerotične lehe) (1,2). Najzgodnejša patološka sprememba v krvni žili, ki postane aterosklerotična, je poškodba žilnega endotelija. Slednja zveča izražanje adhezijskih molekul na celicah endotelija in zmanjša njihovo zmožnost za izločanje dušikovega oksida (NO) ter drugih snovi, ki preprečujejo adhezijo makromolekul, trombocitov in monocitov na epitelij.

Po nastanku poškodbe endotelija se na mestu poškodbe začnejo kopičiti cirkulirajoči monociti in lipidi, pretežno lipoproteini nizke gostote (LDL). Monociti prehajajo skozi endotelij, vstopajo v intimo žilne stene in se diferencirajo v makrofage. Ti potem požirajo in oksidirajo nakopičene lipoproteine, kar jim da penasti videz. Penaste makrofagne celice se kopičijo v krvni žili in ustvarjajo tako imenovano, maščobno progo. S časom se maščobne proge povečujejo in med seboj združujejo, a zaradi proliferacije okolnega vezivnega in gladkega mišičnega tkiva postaja maščobna plošča ali leha vse večja. Poleg tega, makrofagi izločajo snovi, ki povzročijo vnetje in nadaljnjo proliferacijo gladkega mišičnega in fibroznega tkiva na notranji strani arterijske stene. Lipidno odlaganje in celična proliferacija sta lahko tako obsežni, da lehe ki štrlijo v lumen značilno zmanjšajo krvni pretok, včasih pa popolnoma zamašijo žilo. Tudi, če ne pride do zaprtja, fibroblasti na koncu v leho izločijo veliko gostega vezivnega tkiva, arterije pa zaradi skleroze (fibroze) postanejo izjemno trdne in neraztegljive. Naknadno se, poleg holesterola in drugih lipidov pogosto odlagajo tudi kalcijeve soli ter nastanejo kalcifikati, ki močno povečajo trdoto arterije. Sklerotične arterije postanejo manj elastične ter zaradi degeneriranih področij v steni lahko počijo.



Slika1: Razvoj ateroskleroze (17).

Na mestih, kjer aterosklerotične lehe štrlijo v lumen žile, predisponira njihova groba površina nastanek krvnih trombov. Nastali tromb ali embolus lahko popolnoma prepreči pretok krvi (1).

1.1.1. Koronarna ateroskleroza (CAD)

Kadar proces ateroskleroze zajame koronarne (srčne) arterije, govorimo o koronarni aterosklerozi ali koronarni srčni bolezni (CAD). CAD se klinično manifestira po 40 letu starosti s pojavnostjo 0,5 %. Koronarna srčna bolezen je najpomembnejša kategorija bolezni srca in ožilja. Zajema stabilno in nestabilno angino pectoris, tiho ishemijo, sindrom X, Prinzmetalovo variantno angino, akutni miokardni infarkt, ishemično kardiomiopatijo in nenadno srčno smrt. Akutni koronarni sindrom (AKS), kot „podskupina“ koronarne srčne bolezni, vključuje nestabilno angino pectoris, akutni miokardni infarkt in nenadno srčno smrt ter slovi kot najpogostejše življenjsko ogrožajoče stanje, ki vodi v trajno zaporo koronarnih žil oz. ishemijo, okvaro in nekrozo. Lahko rečemo, da je koronarna srčna bolezen stabilna angina pectoris, ki jo prekinjajo epizode AKS. Največja težava je ta, da sta akutni miokardni infarkt in nenadna srčna smrt pogosto prva klinična manifestacija bolezni.

Aterosklerozi se ne moremo izogniti, ker se razvija pri vseh osebah ob staranju, toda jo lahko z ustreznim načinom življenja upočasnimo in se izognemo njenim zapletom. Skoraj polovica prebivalcev v Združenih državah Amerike in Evropi umira zaradi srčno-žilnih

bolezni. V Sloveniji je smrtnost rahlo nižja (2,3,4). Pri približno dveh tretinah umrlih je vzrok smrti tromboza ene ali več koronarnih arterij, pri preostali tretjini pa je vzrok smrti tromboza ali krvavenje iz žil v drugih organih, predvsem v možganih (možganska kap), ledvicah, jetrih, prebavnem traktu in ekstremitetah (1). Na spremembe v možganih lahko kaže glavobol, šum v ušesih, motnje koncentracije in spomina, občutek neravnotežja, slabost v rokah in nogah. Tem kliničnim znakom lahko sledi možganska kap. Srčna kap lahko sledi po bolečini za prsnico, hitrem utrujanju po manjših naporih ali v mirovanju, slabosti, vrtoglavici, glavobolu, lahko pa se tudi pojavi popolnoma nenadno. Periferna bolezen se kaže z zmanjšano močjo v mišicah, bolečino zaradi manjšega napora ali mirovanja, oz. z zmanjšano prekrvljenostjo (2). Predvidevanje razvoja bolezni in dogodkov je zelo težavno, zato je vsak novi diagnostični kazalec več kot dobrodošel.

1.1.2. Dejavniki tveganja za razvoj ateroskleroze

Pomemben dejavnik v nastanku ateroskleroze je visoka koncentracija holesterola v krvni plazmi v obliki LDL. Plazemsko koncentracijo teh lipoproteinov, bogatih z holesterolom, zvišuje več dejavnikov, med katerimi so najpogostejši vnašanje hrane, ki vsebuje nasičene maščobe, debelost in fizična neaktivnost. Povečano vnašanje hrane, bogate z holesterolom tudi lahko zviša plazemske koncentracije LDL, vendar v manjši meri (1). Divji (naravni) tip LDL sam po sebi ni aterogen, ker je vstopanje v celice preko LDL receptorja regulirano z negativno povratno zvezo. Aterogeni postanejo, ko se pod vplivom različnih mehanizmov spremenijo (oksidiran, desializiran, gosti, glikiran LDL) in v celice vstopajo preko receptorjev čistilcev (angl. scavenger receptors), kjer ni več negativne povratne zveze (3). Zanimiv primer so kunci, ki imajo zaradi rastlinske prehrane normalno majhne koncentracije holesterola v plazmi. Zelo močno aterosklerozo v njihovem arterijskem sistemu lahko izzovemo enostavno tako, da jih vsak dan hranimo s hrano bogato s holesterolom (1).

Družinska hiperholesterolemija je bolezen, pri kateri se avtosomno dominantno deduje genska mutacija receptorjev za LDL na membranah celic. Kadar teh receptorjev ni, jetra ne morejo absorbirati niti lipoproteinov srednje niti lipoproteinov nizke gostote. Brez absorpcije se notranji sistem jetrnih celic ne odziva na povratno inhibicijo z visoko plazemsko koncentracijo holesterola, temveč se nekontrolirano sintetizirajo nove količine holesterola (1). Zaradi tega se v krvi izločijo visoke količine lipoproteinov zelo nizke

gostote (VLDL), ki se presnovijo v LDL. Bolniki imajo torej v krvi visoko koncentracijo VLDL in LDL. V manjši meri (2-5 %) pa gre za okvaro apolipoproteina B-100, zaradi česar je pri teh bolnikih zmanjšana afiniteta vezave LDL lipoproteinov za receptor. Pri homozigotnih oblikah bolezni, ki je na srečo redka (1/1.000.000), so koncentracije celotnega holesterola v krvi lahko 15,5-26,0 mmol/L, oziroma 4-6 krat višje od normalnih vrednosti. Ti bolniki ponavadi umirajo pred 20. letom starosti zaradi infarkta miokarda ali pa drugih posledic aterosklerotičnega zožanja žil po celem telesu (5).

V zadnjem času je veliko pozornosti posvečeno lipoproteinom visoke gostote (HDL). Predvideva se, da je HDL zmožen absorbcije kristalov holesterola, ki se začnejo nalagati na stenah arterij (1). Imamo različne podvrste HDL, kot so z lipidi siromašen Apo AI, diskoidni in sferični HDL, ki imajo različno sestavo oz. različno število apolipoproteinov Apo AI in Apo AII. Apo AI je koencim lecitin-holesterol-acil transferaze ali katepsina L (CAT L), serinske esteraze, odgovorne za esterifikacijo holesterola, ki se potem, ko ga celica ne rabi več, s pomočjo HDL vrne nazaj v jetra. Dokazano je, da HDL delujejo zaščitno proti pojavu kliničnih znakov ateroskleroze. Zaradi tega pri osebah z velikim razmerjem HDL in LDL lipoproteinov obstaja veliko manjša verjetnost za razvoj ateroskleroze (3). Pri nekaterih osebah lahko pride do razvoja ateroskleroze, čeprav imajo normalne vrednosti holesterola in lipoproteinov. Znani dejavniki, ki lahko prispevajo k razvoju ateroskleroze so: fizična neaktivnost in debelost, družinska anamneza, sladkorna bolezen, hipertenzija, hiperlipidemija, starost, povečan vnos alkohola in kajenje (2). Hipertenzija vsaj dvakrat poveča tveganje za nastanek koronarne ateroskleroze. Podobno je ob prisotnosti sladkorne bolezni. Če pa sta hkrati prisotni hipertenzija in sladkorna bolezen, tveganje za razvoj koronarne ateroskleroze je 8 krat večje. Če pa je prisotna še hiperlipidemija, tveganje naraste na 20 krat, kar kaže na sinergistično obnašanje rizičnih dejavnikov. Pri večini ljudi z prekomerno telesno težo so pogosto hkrati prisotni vsi tri omenjeni dejavniki, kar zelo zveča tveganje za aterosklerozo in njene posledice kot so infarkt miokarda, možganska kap ter ledvične bolezni. V zgodnji in srednji življenski dobi so moški bolj dovzetni za razvoj ateroskleroze od žensk, kar privede do zaključka, da mogoče moški spolni hormoni delujejo aterogeno ali pa da ženski spolni hormoni delujejo zaščitno. Torej, nekateri dejavniki zvišujejo tveganje za aterosklerozo s povečevanjem koncentracije LDL v plazmi, nekateri pa (npr. hipertenzija) dosežejo enak učinek z

povzročanjem poškodbe žilnega endotelija in pa nekatere druge spremembe žilnega tkiva, ki ustvarijo ugodno okolje za odlaganje holesterola (1).

1.1.3. Laboratorijska diagnostika tveganja za razvoj ateroskleroze

Osnovno laboratorijsko oceno tveganja za razvoj ateroskleroze določimo z izvajanjem osnovnega lipidnega profila. V sklopu tega določamo koncentracijo celotnega holesterola (HOL), LDL in HDL holesterola ter trigliceridov (TG). Spremenjena koncentracija TG kaže le na motnje v presnovi lipoproteinov, ni pa samostojen dejavnik tveganja. Še boljši pokazatelj ocene tveganja je določanje apolipoproteinov B in A1, vendar njihovo merjenje še ni prisotno v rutinski laboratorijski analizi. Pod poglobljeno laboratorijsko analizo lahko štejemo elektroforezno ločbo lipoproteinov ter gensko analizo.

Pri približno $\frac{1}{4}$ populacije obstaja posebna vrsta lipoproteinov nizke gostote, poimenovana lipoprotein (a) (Lp (a)) z vsebujočim dodatnim apolipoproteinom (a), ki skoraj podvoji tveganje za pojav ateroskleroze. Koncentracija Lp (a) je genetsko pogojena in je neodvisen dejavnik tveganja za ishemične srčno-žilne bolezni, podobno kot homocistein. Točen mehanizem teh aterogenih učinkov se še preučuje (4). Na zapletenosti ateroskleroze kažejo tudi eksperimentalne raziskave z ugotovitvami, da višek železovih ionov v krvi lahko povzroči aterosklerozo zaradi morebitnega nastanka prostih radikalov, ki posledično poškodujejo stene krvnih žil. Kljub izjemnim napredkom v medicini imamo še vedno zelo malo laboratorijskih kazalcev trenutnega aterosklerotičnega dogajanja v žilni steni. Poznamo številne slikovne tehnike, vendar jih je večina uporabnih le v poznejših fazah bolezni. Zato se največja pozornost usmerja v iskanje kazalcev zgodnjih žilnih sprememb, med katerimi so C-reaktivni protein (CRP) kot kazalec vnetja v zdravi populaciji, kazalci oksidativnega stresa (oksidirani LDL in protitelesa proti temu), kazalci poškodbe endotelija (VCAM-1, ICAM-1, MCP-1), nestabilnosti aterosklerotične lehe (MMP9), tromboembolnih zapletov (TF), ter genov zunajcelične mRNA, ki se povečano izražajo v procesu ateroskleroze (1,4).

1.1.4. Preprečevanje ateroskleroze

Najpomembnejši ukrepi za preprečevanja nastanka in razvoja ateroskleroze v nevarno srčno-žilno bolezen so:

- 1) vzdrževanje normalne telesne teže, fizična aktivnost in uživanje hrane, ki v glavnem vsebuje nenasičene maščobe z majhno vsebnostjo holesterola;
- 2) preprečevanje hipertenzije z zdravo prehrano in vzdrževanjem fizične aktivnosti in učinkovito nadziranje krvnega pritiska s pomočjo antihipertenzivov ob pojavu hipertenzije;
- 3) učinkovito nadziranje sladkorja v krvi z inzulinom ali drugimi zdravili, ob pojavu sladkorne bolezni;
- 4) izogibanje kajenju.

V preprečevanju ateroskleroze so se kot učinkovita pokazala nekatera zdravila za zniževanje koncentracije lipidov in holesterola v plazmi. Večina holesterola ki nastaja v jetrih, se transformira v žolčne kisline in v tej obliki izloča v dvanajstnik. Več kot 90 % teh žolčnih kislin se v končnem delu vitega črevesa reabsorbira in ponovno izloča v žolč. Tako vsaka snov, ki reagira z žolčnimi kislinami v prebavnem traktu in preprečuje njihovo vračanje v obtok lahko zmanjša zaloge žolčnih kislin v krvi. To povzroči večjo pretvorbo jetrnega holesterola v nove žolčne kisline. S takim mehanizmom poveča uživanje ovsenih kosmičev delež jetrnega holesterola in iz njega nastalih novih žolčnih kislin ter zaradi tega ne nastaja nov LDL in posledično aterogene lehe. Za vezavo žolčnih kislin v črevesju in njihovo povečano izločanje z blatom se lahko uporabijo nekatere smole.

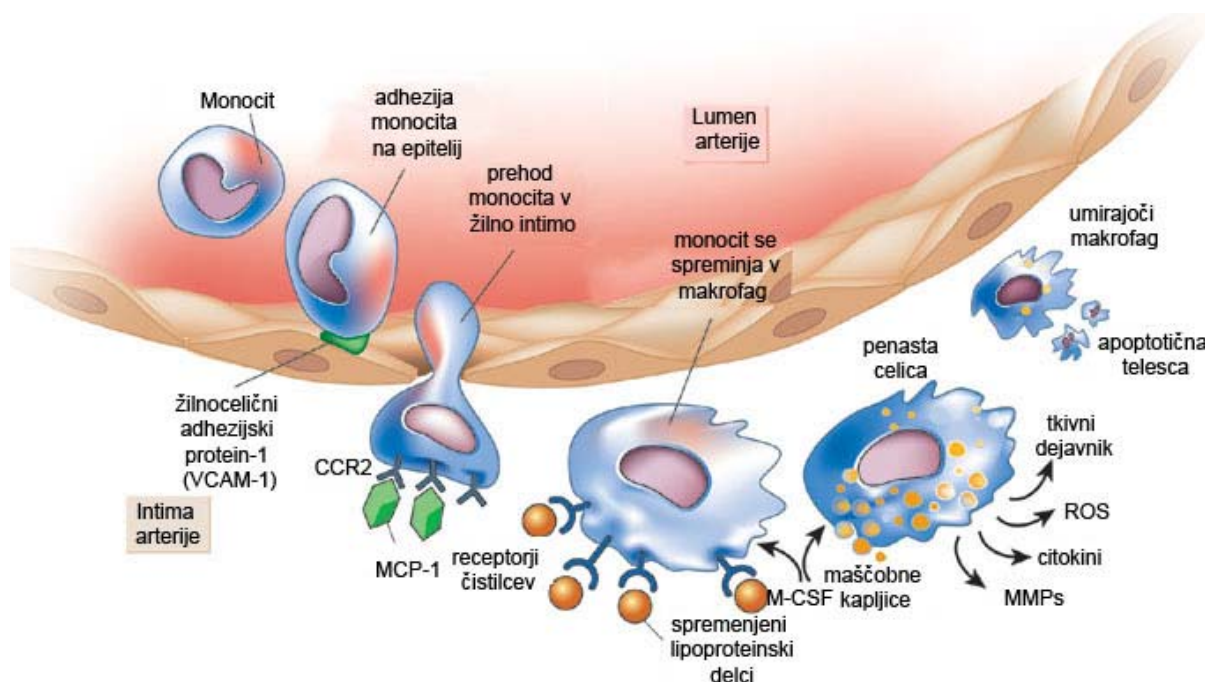
Statini so skupina zdravil, ki kompetitivno inhibirajo encim hidroksimetilglutaril-koencim A (HMG-CoA) reduktazo, ki predstavlja „ozko grlo“ v sintezi holesterola. Na ta način se v jetrih zmanjša sinteza holesterola in poveča število receptorjev za lipoproteine nizke gostote, kar ponavadi zmanjša plazemsko koncentracijo lipoproteinov nizke gostote za 20-50 %. Statini lahko imajo tudi druge ugodne učinke v preprečevanju ateroskleroze, kot je npr. zmanjševanje vnetja v žilni steni in se danes pogosto uporabljajo pri zdravljenju bolnikov s povišano vrednostjo holesterola v plazmi. Na splošno raziskave kažejo, da se z zniževanjem koncentracije LDL holesterola oz. LDL za vsakih 0,025 mmol/L, smrtnost zaradi srčno-žilnih bolezni zmanjša za 2 % (1). Torej so preventivni ukrepi zelo pomembni v preprečevanju ateroskleroze in njenih zapletov.

1.1.5. Ateroskleroza na celično-molekularnem nivoju

V fizioloških pogojih žilni endotelij loči sestavine krvi od zunanjih plasti arterijske stene. Celice endotelija sintetizirajo dušikov oksid (NO), ki ima številne protiaterogene učinke, vključno s vazodilatacijo, inhibicijo adhezije levkocitov in agregacije trombocitov, ter protivnetne in protitrombotične učinke. Pod vplivom hipertenzije, dislipidemije ali npr. kajenja, se lahko pojavi disfunkcija endotelija v smislu sinteze NO, kar lahko omogoči razvoj vnetnega stanja in ateroskleroze. Vnetje omogoča razvoj samega ateroma, pa tudi rupturo aterosklerotične lehe.

Razvoj aterosklerotične lehe je proces, sestavljen iz več korakov. Inicijalna endotelna disfunkcija privede do sprememb v normalnem homeostatskem ravnovesju endotelija. LDL se kopiči v arterijski žilni steni in povzroča proliferacijo gladko-mišičnih celic (GMC). LDL se progresivno oksidira, pride do premika, oz. diapedeze levkocitov (monocitov in limfocitov) v spremenjeno področje ter do nastanka z lipidi obremenjenih makrofagov ali penastih celic (6). Vezava monocitov na žilni endotelij je pomemben zgodnji dogodek pri aterogenezi in je posredovana s številnimi celičnimi adhezijskimi molekulami, vključno z žilnoceličnim adhezijskim proteinom-1 (VCAM-1) in znotrajceličnim adhezijskim proteinom-1 (ICAM-1) (7). Trombocitna endotelno-celična adhezijska molekula-1 (PECAM-1) je tudi ključnega pomena za migracijo levkocitov in diapedezo. Študije so pokazale, da obstajajo snovi (npr. katehin iz zelenega čaja), ki inhibirajo izražanje teh molekul na celicah endotelija, ki je sproženo z oksidiranim LDL ali vnetnimi citokini (8).

Nakopičeni makrofagi sproščajo citokine in encime vključno z metaloproteinazami matriksa (MMP), ki so odgovorne za razgrajevanje povezovalnega tkivnega matriksa, oziroma destabilizacijo aterosklerotične lehe. Razvijajoča se plošča, prekrita s fibrozno kapo, postopno prehaja v napredujočo in kompleksno poškodbo. Vnetne celice se torej naprej kopičijo, razgrajuje se zunajcelični matriks, potem pa pride do apoptoze gladko-mišičnih celic in tanjšanja fibrozne kape aterosklerotične lehe. Pri nekaterih posameznikih pride iz še ne popolnoma pojasnjenih vzrokov do destabilizacije lehe ter potencialne nevarnosti za trombozo in žilno zaprtje (infarkt miokarda, možganska kap, periferne žilne bolezni).



Slika 2: Prehod monocitov in njihova usoda v intimi arterije (18).

Kliniki skušajo uporabiti dodatna orodja, da bi z večjo verjetnostjo lahko identificirali bolnike z visokim tveganjem za kardiovaskularne bolezni. Cirkulirajoči biološki označevalci so pomembni za identifikacijo, ocenjevanje, oz. prognozo in zdravljenje teh bolezni. Aktivacija vnetja ni opazna samo v žilni steni, ampak se vnetje lahko zasledi tudi v periferni krvi. Pri bolnikih s CAD je značilen porast števila nevtrofilcev in limfocitov T, prav tako pa tudi zvišan nivo številnih vnetnih dejavnikov. Po drugi strani nekatere kardiovaskularne bolezni kažejo dnevni cikel aktivnosti, pa tako cerebrovaskularne in kardiovaskularne dogodke ponavadi zasledimo v zgodnjih jutranjih urah. Opažena so tudi dnevna nihanja dejavnikov vnetnega dogajanja pri bolnikih z akutnim koronarnim sindromom, kar lahko uporabimo za boljše razumevanje in kontrolo dogajanja v žilni steni ter preprečevanje akutnih zapletov (9). Najbolj pomembni označevalci akutnega koronarnega sindroma, pri katerih je smiselno slediti dnevna nihanja, so: interleukin 6, metaloproteinaze matriksa (MMP), VCAM-1, ICAM-1, topni ligand CD40 in C-reaktivni protein (9). Odkrito je tudi, da sta tkivno izražanje in plazemske koncentracije vnetnih dejavnikov in mediatorjev (CRP, VCAM-1, ICAM-1 in kemokini), povezani s povečanim tveganjem za hipertenzijo. Tako se sklene zaprti krog, kjer je hipertenzija lahko vzrok kot tudi posledica poškodbe endotelija in žilnih zapletov (10). Pozornost, ki se posveča CRP-u je najbolj usmerjena v zgodnje odkrivanje razvoja kardiovaskularnih bolezni v navidezno

zdravi populaciji ljudi. Prognostični potencial adhezijskih molekul in citokinov še vedno ni razjasnjen (11). Kljub novim slikovnim tehnikam, pravočasna in pravilna diagnoza akutnih zapletov ostaja izziv. Veliki potencial kažejo sodobnejši biološki označevalci.

1.2. ADHEZIJSKE MOLEKULE IN NJIHOV POMEN

Obstajajo različne celične adhezijske molekule, kot so: integrini, selektini in imunoglobulinska naddružina (npr. VCAM-1, ICAM-1). Imunoglobulinska naddružina je osrednjega pomena za razvoj zarodka in imunskega ter vnetnega odziva. Ti membranski glikoproteini, izraženi na površini celic, omogočajo interakcijo in adhezijo drugih celic na zunajcelični matriks. Strukturno so zgrajeni iz kratkega citoplazemskega repa in zunajceličnega dela, sestavljenega iz imunoglobulinu podobnih ponovitev. Mnoge adhezijske molekule imajo vlogo pri mobilizaciji levkocitov. Proces prehajanja levkocitov skozi žilni endotelij sestavljajo:

- Primarna levkocitno-endotelijska interakcija privezovanja in kotaljenja
- Sekundarna levkocitno-endotelijska interakcija potrjevanja adhezije
- Transendotelijska migracija

Selektini so zadolženi za primarno levkocitno-endotelijsko interakcijo. Levkociti izpostavljajo L-selektin, aktivirane endotelijske celice E-selektin, P-selektin se pa nahaja na aktiviranih trombocitih in endotelijskih celicah. Nizko afinitetna narava interakcij med selektini in ogljikohidratnimi ligandi tarčnih celic omogoča levkocitom v obtoku privezovanje in kotaljenje vzdolž žilnega endotelija ter sproščanje v primeru, da do potrjevanja adhezije ne pride. Potrjevanje adhezije je odvisno od prisotnosti integrinov na aktiviranih levkocitih, ki interagirajo z adhezijskimi molekulami žilnega endotelija. Zelo pozen antigen-4 (VLA-4) ali integrin $\alpha 4\beta 1$ se izraža na monocitih in limfocitih, ne pa na nevtrofilcih in interagira z VCAM-1 v aktiviranem žilnem endoteliju (skupaj z integrinom $\alpha 4\beta 7$); levkocitni funkcijsko-vezan antigen-1 interagira z ICAM-1 in ICAM-2. Sploščeni levkociti, vezani za endotelij, nato vstopajo v tretjo fazo procesa - endotelijsko transmigracijo. Trombocitno-endotelijska celično adhezijska molekula-1 (PECAM-1) izražena na obeh, endotelijskih celicah in levkocitih, omogoča prehod levkocitov med endotelnimi celicami. Levkociti prehajajo žilni endotelij, vodeni z kemotaktičnim

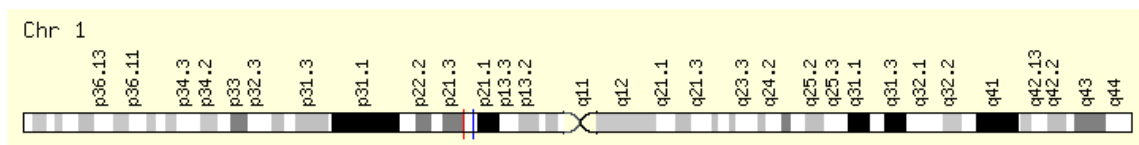
koncentracijskim gradientom citokinov. Ta citokinski gradient zagotavljajo med drugimi monocitni kemoatraktantni protein-1 (MCP-1) in interleukin-8 (IL-8). Skozi zgodnje faze razvoja ateroma so levkociti privlečeni na mesto vnetja. VCAM-1 ni normalno izražen v fizioloških pogojih. V ustreznih vnetnih pogojih se žilni endotelij aktivira zaradi izpostavitve vnetnim citokinom, kot so dejavnik tumorske nekroze- α (TNF- α) ali IL- β , ter pride do hitrega izražanja genov, ki vodi v izražanje VCAM-1 na žilnem endoteliju (6).

1.2.1. VCAM-1

VCAM-1 ali CD106 (angl. cluster of differentiation 106) je pravzaprav prototipni označevalec aktivacije endotelijskih celic. Velik je 100-110 kDa in sestavljen iz 715 aminokislinskih ostankov. Od tega je 674 aminokislinskih ostankov zunaj endotelijskih celic, 22 aminokislinskih ostankov v transmembranski regiji, preostanek (19 aminokislinskih ostankov) pa predstavlja citoplazemski rep. Omogoča adhezijo monocitov, limfocitov, eozinofilcev, bazofilcev in celo celic melanoma na endotelij. Izražajo ga tudi GMC in makrofagi v postopnem razvoju aterosklerotične poškodbe, ter nevronske celice in fibroblasti v povezavi z drugimi vnetnimi pogoji. Znano je, da se izraža v najbolj zgodnjih makroskopskih aterogenih poškodbah - maščobnih progah. NO in L-arginin (aminokislina, iz katere NO izhaja) zmanjšujejo endotelijsko izražanje VCAM-1 s pomočjo citokin-stimulirajočega endotelija. V isti smeri delujejo blokirajoča monoklonska protitelesa usmerjena proti adhezijski molekuli ali določenim citokinom. Z druge strani pa so TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-4 in IL-6, ki jih izražajo levkociti, okarakterizirani kot induktorji izražanja endotelijsko-celičnih adhezijskih molekul podobno kot tudi VCAM-1. Ostaja pa vprašanje kateri tip vnetnih celic je najbolj pomemben v produkciji citokinov, oz. indukciji adhezijskih molekul. Mogoče monociti, nevtrofilci, limfociti in mastociti ustvarjajo takšno mešanico citokinov, da imajo približno enak vpliv na izražanje omenjenih molekul ali pa obstaja točno določeni iniciator aktivacije. Zhang in sod. menijo, da je izmed množice različnih citokinov in molekul, TNF- α najverjetneje osrednji citokin v tem zapletenem sistemu (12). VCAM-1 se sčasoma sprošča s površine endotelija s proteolitskim razkrajanjem, kar omogoča merjenje topne oblike VCAM-1 v plazmi. Do zdaj so koncentracije topnih oblik celičnih adhezijskih molekul (CAM-ov), merjene z metodo ELISA slabo korelirale z drugimi označevalci endotelne aktivnosti in so kazale šibko

povezavo z trenutnim žilnim dogajanjem. Imunohistokemično merjenje celičnega izražanja VCAM-1 z večjo verjetnostjo kaže na resnična patofiziološka dogajanja (6,7).

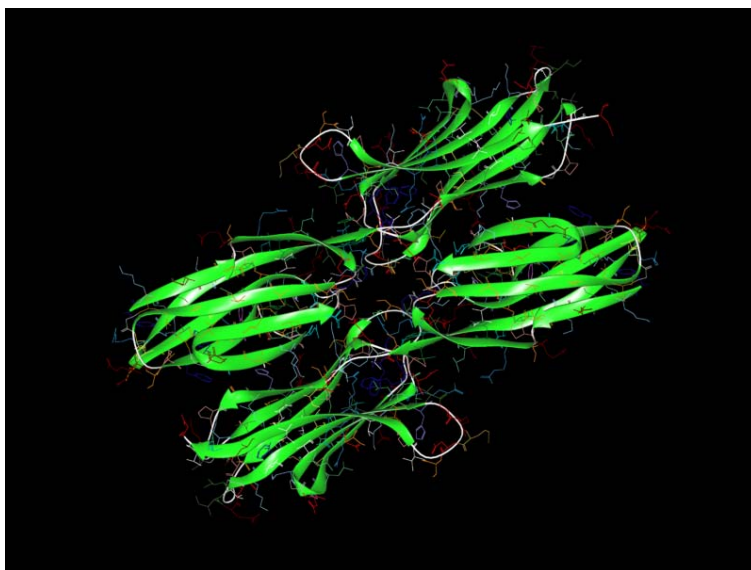
Gen, ki kodira za VCAM-1 je visoko konzerviran znotraj številnih vrst in ima veliko vlogo pri imunskih odzivih. Nahaja se na kromosomu 1.



Slika 3: Položaj *VCAM1* na kromosomu 1 (13).

VCAM-1 vsebuje šest ali sedem imunoglobulinskih domen (C2-tip) in se izraža le po citokinski stimulaciji. Poznamo dva RNA transkripta, ki kodirata različne izoforme pri človeku: transmembranski protein sestavljen iz sedmih imunoglobulinu podobnih domen in protein z domenami 1-3 in 5-7. Domene 1 in 4 so odgovorne za vezavo liganda.

Produkt genskega izražanja je površinsko-celični sialoglikoprotein tipa I. Zanimivo je, da tako mišja kot podganja VCAM-1 izkazujeta zelo visoko podobnost s človeškim proteinom (76 % in 77 %). Ravno zaradi tega razloga so bile izvedene številne študije na živalskih modelih (13,14).



Slika 4: Sekundarna struktura VCAM-1 (19).

V *in vitro* študijah je potrjeno, da VCAM-1 spodbuja močno povezanost na $\alpha 4\beta 1$ integrin na levkocitih. Bilo je tudi dokazano, da je celična adhezija na poškodovanih karotidnih arterijah mišk z izbitim genom za Apo E (Apo E^{-/-}) močno zavrnjena z uporabo VLA-4 blokirajočih protiteles. *In vivo* študije na živalih so privedle do spoznanja, da VCAM-1 „knockout“ miške ne preživijo verjetno zaradi tega, ker je $\alpha 4\beta 1$:VCAM-1 interakcija nujna tudi za fetalni razvoj. Raziskave aterogeneze pri miškah z Apo E^{-/-} in hkrati z izbitim genom za LDL-receptor (model človeške hiperholesterolemije) so dale variabilne rezultate glede drugih adhezijskih molekul. Glede VCAM-1 je nadaljnji napredek sledil potem, ko so raziskovalci razvili miš s prisotno D4D mutacijo. Te miši imajo pomanjkanje enega od dveh vezavnih mest za vezavo VCAM-1, hkrati pa izražanje VCAM-1 (2-8 % divjega tipa) zagotavlja preživetje. Po križanju takšnega genotipa z miško z izbitim genom za LDL-receptor in hranjenju tako dobljenih miši s proaterogeno prehrano, je bilo napredovanje ateroskleroze zelo zmanjšano (6).

Znanstveniki so na živalskih modelih dokazali, da se napredovanje aterosklerotične poškodbe značilno zmanjša z zmanjšanjem izražanja VCAM-1. Predvideva se, da se tudi pri ljudeh z zmanjševanjem izražanja VCAM-1 lahko upočasni napredovanje ateroskleroze. Opazovalne študije so pokazale povezanost med endotelijskim izražanjem VCAM-1 humanih celic in znanimi dejavniki tveganja za srčno-žilne bolezni, kot so hiperholesterolemija in dolgotrajna hiperglikemija. Ob terapiji s statini in antagonisti angiotenzina II naj bi se izražanje VCAM-1 zmanjšalo. Močan vpliv na patogenezo ateroskleroze imajo povečan oksidativni stres v žilnih celicah, nekateri mikroorganizmi (virusi) ter nevtralizacijski mehanizmi in sistemi v telesu, ki naj bi nevtralizirali nevarne produkte. V raziskavi CART (Canadian Anti-oxidant Restenosis Trials) so preiskovali klinične učinke sukcinobukola, substance, ki med drugim inhibira izražanje VCAM-1, vendar zaradi kompleksnosti procesa ne moremo trditi o pozitivnih učinkih. Problem je tudi ta, da težko klinično ugotavljamo kakršnekoli spremembe skozi krajši čas ter ne vemo, ali so rezultati dejansko posledica našega ukrepanja ali zgolj naključja povzročenega z nekaterimi drugimi mehanizmi v tako zapletenem procesu (6,7). Številne metode se uporabljajo v terapiji ateroskleroze: zdravljenje konvencionalnih dejavnikov tveganja (statini, antihipertenzivi), antioksidanti in protivnetna terapija. Zdravljenje konvencionalnih dejavnikov tveganja je zmerno uspešno, medtem ko zdravljenje z naravnimi antioksidanti ni pokazalo učinka (6).

Akhtar in sod. so skušali na miših *in vivo* kvantificirati izražanje VCAM-1 s pomočjo neinvazivnega magnetno resonančnega molekularnega slikanja z uporabo monoklonskih protiteles proti VCAM-1, označenih z mikrodenci železovega oksida. Slednji ni biorazgradljiv in je zato onemogočena uporaba na ljudeh kljub dobri korelaciji z tkivno VCAM1 mRNA (15). Li in sod. so ugotovili, da adipocitokin adiponektin značilno zavira izražanje VCAM-1 in ICAM-1 v žilni steni, kar privede do zmanjševanja aterosklerotične poškodbe in preprečevanja nadaljnjega razvoja ateroskleroze (20). Tudi drugi znanstveniki pred njimi so trdili, da ima VCAM-1 ključno vlogo v začetku razvoja ateroskleroze, niso pa omenjali ICAM-1 v istem stadiju (21,22). Izvedene so številne študije vpliva statinov (npr. atorvastatina, simvastatina) na adhezijske molekule v povezavi s poškodbo miokarda, hiperlipidemijo in sladkorno boleznijo (23,24). Simvastatin npr. zavira s ligandom CD40 inducirano izražanje VCAM-1, ampak ob hkratni terapiji z mevalonsko kislino ta učinek izostane (25). Odkrili so tudi, da pri bolnikih s stabilno angino pectoris, predhodno tretiranih z atorvastatinom, pride do zmanjševanja endotelijske aktivnosti, medtem ko pri bolnikih z akutnim koronarnim sindromom, ki niso prejeli terapije, ni tega učinka. To kaže na možni kardioprotektivni učinek atorvastatina v smislu zmanjševanja vnetja, ne pa tudi zaviranja izražanja VCAM-1, ker med skupinama ni bilo značilne razlike (26). Mišji modeli močno podpirajo teorijo o ključni vlogi adhezijskih molekul v razvoju ateroskleroze, vendar ekstrapolacija istih na človeški model ostaja negotova. Ni še dokazano, da ima inhibicija VCAM-1 kardioprotektivni učinek.

1.3. ZUNAJCELIČNE NUKLEINSKE KISLINE IN NJIHOVA UPORABA V BIOMEDICINI

Zunajcelične nukleinske kisline (zNK), kot samo ime pove, se nahajajo izven celice in sicer v plazmi, serumu ali drugih bioloških tekočinah, kot so urin, likvor in bronhialni izpirek. Zaradi dejstva, da krožijo po telesu, jih imenujemo tudi cirkulirajoče nukleinske kisline. Že leta 1947 sta jih odkrila Mandel in Metais, vendar so zaradi tedaj omejenih možnosti pridobivanja in analitike nukleinskih kislin nekaj časa počivale v zgodovini kot ne preveč uporabne. Zanimanje so ponovno izzvale po odkritju, da je njihova koncentracija zvišana pri bolnikih s sistemskim eritematoznim lupusom, nagli razvoj pa so doživele ob iznajdbi novih analitskih tehnik in metod za kvantitativno analizo nukleinskih kislin.

Danes se analiza zNK uporablja predvsem v tumorski in prenatalni diagnostiki, vendar dejstvo, da imajo zNK iste lastnosti kot nukleinske kisline celic, iz katerih izhajajo, jim zagotavlja svetlo prihodnost v diagnostiki številnih drugih bolezni (27,28).

1.3.1. Izvor in lastnosti zNK

Značilnost zNK je, da so prisotne v relativno nizkih koncentracijah in jih sestavljajo sorazmerno majhni fragmenti, ki jih je mnogo težje izolirati kot večje celične nukleinske kisline. Pri zdravih ljudeh zunajcelična DNA izvira iz limfocitov in drugih jedrnih celic, predvsem kot posledica njihove apoptoze. Upravičeno sklepamo, da so mehanizmi sproščanja iz celic pri RNA enaki (29). Po izvoru zNK lahko razdelimo na divji tip (celice jih normalno izločajo), tumorski tip, fetalni, humani eksogeni tip (na primer sproščene iz transplantiranega organa) in nehumani tip zNK (sproščene iz bakterij, virusov in gliv). V plazmi se lahko nahajajo v prosti obliki, v obliki apoptotičnih telesc, mono- in oligonukleosomov (strukturno povezane s histoni) ter vezane na proteine plazme. Raziskave so pokazale, da imajo eksogeno vnešeni nukleosomi relativno kratko razpolovno dobo (le nekaj minut), kar kaže na zelo učinkovite mehanizme odstranjevanja. Nasprotno, zNK, endogeno vezane na proteine ali pa prisotne različne patološke razmere močno upočasnijo njihovo odstranjevanje. Sama koncentracija zNK je rezultat ravnotežja mehanizmov sproščanja iz celic (fiziološka ali patološka apoptoza, liza, nekroza, aktivno izločanje) in mehanizmov odstranjevanja (razgradnja z endonukleazami, odstranjevanje s celicami retikuloendotelnega sistema, makrofagi). Znanstveniki menijo, da je pri zdravih ljudeh apoptoza prevladujoč mehanizem pojava zNK. V plazmi zdravih je koncentracija zunajcelične DNA do 50 µg/L in zunajcelične RNA do 250 µg/L, pri bolnikih pa oba nivoja lahko presežeta 3000 µg/L (27).

1.3.2. Uporaba analize zNK v laboratorijski medicini

Analiza zNK omogoča neinvaziven vpogled v določeno tkivo, oz. organ, kar je bila ena največjih želja sodobne medicine, vsakega zdravnika in bolnika. Zunajcelične nukleinske kisline so zelo uporabne v tumorski diagnostiki. Mnogi avtorji so ugotovili, da imajo bolniki z rakom višjo koncentracijo zunajcelične DNA kot bolniki z nemalignimi

boleznimi (29). Poleg tega so dokazali značilno višjo koncentracijo pri bolnikih z metastazami v primerjavi z bolniki z rakom brez metastaz, vendar niso našli značilne povezave med količino zunajcelične DNA in lokalizacijo ali velikostjo primarnega tumorja. Koncentracija dobro korelira z uspešnostjo radioterapije, vendar pa je odnos obratno sorazmeren (29). Analiza zNK ploda v krvi matere predstavlja še večji izziv od analize zNK pri rakavih bolnikih. V materinem krvnem obtoku jih zasledimo kot posledico sproščanja iz apoptotičnih in poškodovanih celic posteljice (npr. trofoblastov in eritroblastov). Proti koncu nosečnosti plodova zunajcelična DNA predstavlja 6 % celotnih zunajceličnih DNA, je visoko fragmentirana, kar izkoriščamo za koncentriranje in ločevanje, žal pa to hkrati onemogoča detekcijo večjih genskih delecij in insercij. Mnogi laboratoriji za molekularno diagnostiko že rutinsko določajo spol in RhD status ploda, ugotavljajo motnje v rasti in razvoju posteljice, ter presejalno odkrivajo in izključujejo različne X- vezane dedne bolezni (27). Sodobne raziskave v aterogenomiki so usmerjene na odkrivanje genov, ki se tipično izražajo v posameznih celicah udeleženih v aterosklerotični lehi, v različnih stopnjah razvoja ateroskleroze ali v različnih patomorfoloških oblikah bolezni. Najpomembnejši geni, ki se v tem procesu povečano izražajo so *VCAM1* (kodira za VCAM-1), *CCL2* (kodira za MCP-1), geni ki kodirajo E-selektin in trombospondin-1 ter številni drugi. *MMP9* (kodira za MMP9), *CTSS* in *CTSB* (kodirajo za katepsin S in B) so geni odgovorni za nestabilnost aterosklerotične lehe (28). Raziskave merjenja, oz. proučevanja nivojev mRNA v aterosklerozi so še v povojih. Ugotovili so, da v plazmi bolnikov s CAD obstajajo mRNA genov, ki z povečanim izražanjem v žilni steni spremljajo ali spodbujajo razvoj ateroskleroze. Poleg tega so ugotovili, da je pri bolnikih s CAD, v povezavi s terapijo s statini in aspirinom, zvišan nivo mRNA *CTSS*, ne pa tudi nivo mRNA *CTSB*. Zvišane vrednosti nivoja mRNA *CTSS* so bile povezane z višjimi vrednostmi nivoja mRNA *CD40*. Verižna reakcija s polimerazo (RT-PCR) v realnem času v kombinaciji z reverzno transkripcijo je postala metoda izbora za hitro in točno profiliranje mRNA v bioloških vzorcih, oz. izražanje tarčnega gena. Poleg pomnoževanja tarčnih fragmentov cDNA, ki jih omogoča tudi klasična izvedba PCR, metoda RT-PCR omogoča merjenje PCR produktov v vsakem ciklu pomnoževanja na temelju porasta fluorescenčnega signala, ki je sorazmeren količini cDNA v vzorcu.

2. IZHODIŠČA IN NAMEN DELA

Adhezijska molekula VCAM-1 ima pomembno vlogo v razvoju ateroskleroze. Poškodovane endotelijske celice močno zvečajo njegovo sintezo in protein izpostavijo na celično površino. To omogoča adhezijo krvnih monocitov na poškodovani endotelij in vstopanje celic v žilno steno, kar je eden ključnih dogodkov aterogeneze.

Določanje koncentracije žilnoceličnega adhezijskega proteina VCAM-1 odraža trenutno dogajanje v žilni steni in je obetajoč diagnostični kazalec. Zunajcelična mRNA *VCAM1* v krvi bolnikov s CAD še ni bila izmerjena.

V nalogi smo nameravali dokazati naslednji hipotezi:

1. Bolniki s CAD imajo višji plazemski nivo mRNA *VCAM1* kot zdravi preiskovanci.
2. V plazmi bolnikov s CAD nivo mRNA *VCAM1* korelira s koncentracijo proteina VCAM-1.

Da bi hipotezi dokazali, bomo poskusili izmeriti nivo mRNA *VCAM1* v skupini bolnikov s CAD in skupini zdravih prostovoljcev brez kliničnih znakov ateroskleroze. Komercialno dosegljive analizne postopke bomo spremenili skladno s predhodnimi izkušnjami merjenja plazemskih mRNA na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za Farmacijo v Ljubljani. Izmerjene nivoje mRNA *VCAM1* bomo primerjali z izmerjenimi koncentracijami proteina VCAM-1. Potrjeni hipotezi bi pomenili, da lahko postopek merjenja plazemskega nivoja mRNA *VCAM1* uporabimo kot raziskovalno orodje neinvazivnega spremljanja izražanja mRNA *VCAM1* v poškodovani aterosklerotični žilni steni.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

3.1.1. Vzorci

V namen raziskave je bilo zbranih 86 vzorcev krvi bolnikov s CAD in zdravih prostovoljcev. Vzorci bolnikov s CAD so bili zbrani na Kliničnem oddelku za kardiologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani, kjer so klinično opredeljeni. Vzorci zdravih prostovoljcev so bili zbrani na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Od vseh sodelujočih so bila pridobljena pisna soglasja, raziskavo pa je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko. Bilo je 70 % moških in 30 % žensk, od tega pa 32 bolnikov z akutnim koronarnim sindromom (AKS), 24 bolnikov s stabilnim koronarnim sindromom (SKS), ter 30 zdravih prostovoljcev. Diagnozo CAD so zdravniki postavili na temelju klinične in družinske anamneze, EKG meritev, koronarne angiografije in laboratorijskih meritev; potrdili pa z vsaj eno prisotno žilno stenozo. Slednja je opredeljena kot zožitev premera žilnega lumna za več kot 50 % v koronarni epikardialni arteriji ali eni izmed večjih vej koronarne arterije. Pridobili so še podatke o drugih prisotnih bolezenskih stanjih kot so hipertenzija in sladkorna bolezen, in o terapiji z zdravili (statini, ACE inhibitorji, aspirin). Izključitveni kriterij so bila druga prisotna vnetna stanja, ledvične (serumska koncentracija kreatinina $>120 \mu\text{mol/L}$) in jetrne bolezni, bolezni ščitnice in rakava obolenja.

Naključno izbrani zdravi prostovoljci so osebe, ki niso nikoli čutile prsne bolečine ali navajale drugih zdravstvenih težav in so po SCORE (Systemic Coronary Risk Evaluation) modelu imele manj kot 10 % tveganje za razvoj ishemičnih koronarnih zapletov v naslednjih 10-ih letih.

3.1.2. Materiali in aparatura

- Pipete, pipetni nastavki, mikroeprovete (Eppendorf, Nemčija), falkonke - Centrifuge tubes RNA, DNA free (TPP, Švica), pipetni nastavki Tip One RNase free (Starlab, Nemčija)

- Detergent RNase Zap (Applied Biosystem, ZDA)
 - Reagenčni komplet za izolacijo zNK QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit (Quiagen, Nemčija)
 - Komplet za vakumsko postajo QIAvac 24 Plus (Quiagen, Nemčija)
 - Reagenčni komplet za sintezo cDNA SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, ZDA)
 - Reagenčni komplet za izolacijo RNA RNeasy® Mini Kit (Quiagen, Nemčija)
 - Hidrolizirajoče sonde TaqMan® Pre-Developed Assay Reagents - Human ACTB/PPIA/VCAM-1 (Applied Biosystem, UK)
 - Reagenčni komplet za izvedbo PCR Fast Start Universal Probe Master (ROX) (Roche, Nemčija)
 - Rakcijske ploščice MicroAmp® Optical 96-Well Optical Reaction Plate with Barcode (Applied Biosystem, UK)
 - Samolepilna folija MicroAmp® Optical Adhesive Film (Applied Biosystem, UK)
 - Quantikine® Human sVCAM-1 ELISA (R&D Systems, ZDA)
-
- Avtoklav (Kambič, Semič, Slovenija)
 - Komora za izolacijo RNA: DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M-AR (Biosan, Riga, Latvija)
 - vrtinčnik FVL-2400N Combi-Spin (Biosan, Riga, Latvija)
 - PCR aparat PCR/Thermal Cycler MWG Primus 96 Plus (MWG - Biotech AG, Ebersberg, Nemčija)
 - Centrifuga Cenrifuge 5804 R (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
 - Centrifuga Centric 322A (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
 - Mikrocentrifuga Centrifuge 5415R (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
 - Vodna kopel Water bath thermostat WB-4MS (Biosan, Riga, Latvija)
 - Termostat Cooling-heating Thermostat CH-100 (Biosan, Riga, Latvija)
 - pH meter SeavenEasy S20 (Mettler Toledo, Nönikon, Švica)
 - ABI Prism® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem, Warrington, UK)
 - Računalniki, hladilniki, zmrzovalniki.

3.2. METODE

3.2.1. Splošne metode

3.2.1.1. Zbiranje in priprava vzorcev

Preiskovancem je bila pred angiografijo in 12 ur po zadnjem obroku na Kliničnem oddelku za kardiologijo (UKC Ljubljana) odvzeta periferna kri v epruveto z dodatkom antikoagulantu EDTA (Becton Dickinson, Velika Britanija). Delo smo potem nadaljevali v Molekularnem laboratoriju Fakultete za farmacijo v Ljubljani. Plazmo je bilo treba v roku 1 ure od odvzema previdno ločiti od celic, ker bi v nasprotnem, zaradi lize, lahko prišlo do lažno zvišanih vrednosti preiskovanega analita. Zato v raziskavo nismo vključili hemoliziranih vzorcev. Zbrane vzorce smo najprej 10 minut centrifugirali (4°C, 1600 x g) in plazmo v aseptičnih pogojih prenesli v novo epruveto, ter ponovno centrifugirali, vendar z višjo centrifugalno močjo (4°C, 16000 x g). Delali smo v aseptični komori. Tako pripravljeno plazmo smo do analize shranili v tekočem dušiku na temperaturi -80°C v alikvotih od 220-850 µL.

3.2.1.2. Priprava 1x PBS pufra

1x PBS pufer smo uporabili kot dodatek plazmi vzorcev v katerih je volumen plazme bil manj kot 1 mL, da bi v vseh vzorcih dobili enake izhodiščne volumne potrebne za izolacijo mRNA.

Reagenti:

10x PBS pufer s sestavo:

- 80 g NaCl,
- 2 g KCl,
- 14,4 g Na₂HPO₄,
- 2,4 g KH₂PO₄,
- 800 mL dH₂O

Postopek:

Najprej smo pripravili 10x pufer PBS in 100 mL tega dopolnili z dH₂O do 1 L. Uravnali smo pH na 7,4 z dodatkom NaOH. Tako pripravljen 1x pufer PBS smo avtoklavirali in shranili v hladilniku do uporabe.

3.2.1.3. Priprava 2 % agaroznega gela in elektroforeza

Za preverjanje zanesljivosti postopka, oz. specifičnosti oligonukleotidnih sond v RT-PCR reakciji smo izvedli elektroforezo na 2 % agaroznem gelu v trajanju 20 min ob napetosti $U = 100 \text{ mV}$ in jakosti $I = 400 \text{ mA}$.

Reagenti:

- 50x TAE pufer (vsebuje 240 g tris baze, 57,1 mL 100 % očetne kisline, 100 mL 0,5M EDTA in ultračisto H₂O do 1000 mL)
- Ultračista H₂O
- Agaroz (Sigma Aldrich, ZDA)
- SYBR Safe (Invitrogen, ZDA)
- PCR označevalec velikosti (Promega, ZDA)
- Nanašalni pufer ksilencianol

Postopek:

V digestoriju smo pripravili elektroforezni nosilec in namestili ustrezni glavniček. Iz 50x TAE pufra smo naredili 1 L 1x TAE z redčenjem 20 mL 50x TAE z ultračisto H₂O. Natehtali smo 1,5 g agaroze in jo raztopili v 75 mL 1xTAE pufra s segrevanjem v mikrovalovni pečici. Dodali smo 7 μL interkalirajočega barvila SYBR Safe, gel vlili v elektroforezni nosilec in pustili 20 min da se strdi. Med tem smo elektroforezno kadičko napolnili z 1x TAE pufrom. Ko se je gel strdil smo ga prenesli v kadičko in v vdolbinice na gelu nanесли PCR označevalec velikosti in vzorce, ki smo jim predhodno dodali nanašalni

pufer. Po končani elektroforezi smo gel slikali s pomočjo Gene Snap računalniškega programa.

3.2.2. Izolacija zunajceličnih nukleinskih kislin

Preden smo začeli s izolacijo smo komoro za izolacijo čistili z detergentom RNase Zap in izpostavili delovanju UV-svetlobe za 35 minut. Izolacijo zNK iz 1 mL vzorca smo izvedli v štirih korakih po navodilih proizvajalca z uporabo komercialnega reagenčnega kompleta QIAamp[®] Circulating Nucleic Acid Kit (Quiagen, Nemčija).

Reagenti:

- Proteinaza K
- ACL pufer (vsebuje RNA nosilec)
- ACB pufer
- Spiralna pufra ACW1 in ACW2
- 97 % etanol
- AVE pufer

Postopek:

1. Vzorce smo najprej lizirali z dodatkom proteinaze K in ACL pufra, ki skupaj zagotavljajo denaturirajoče pogoje, ter inaktivacijo RNaz in popolno sproščanje nukleinskih kislin iz proteinov, lipidov in veziklov.
2. Z dodatkom pufra ACB (vsebuje RNA nosilec) smo zagotovili optimalne pogoje za vezavo zNK na membrano in lizate prenesli na kolonice QIAmp Mini Column. S pomočjo vakuma smo lizat presesali skozi kolonico, omogočili vezavo zNK na silikatno membrano, hkrati pa smo se z ustreznimi pogoji (soli, pH) znebili proteinov in drugih kontaminatov, ki bi lahko pozneje motili PCR reakcijo.
3. Po 5 minutni inkubaciji na ledu je sledilo 3x spiranje morebitnih preostalih nečistoč s kolone na kateri so bile vezane zNK. (Pri tretjem spiranju smo zaradi boljše učinkovitosti uporabili pripravljen 97 % etanol brez RNaz.)
4. Elucijo zNK s kolone smo izvedli s 50 µL pufra AVE, tako da smo prvi dobljeni eluat spet nanesti na kolono in ponovili postopek zaradi boljšega izkoristka elucije.

Po končani izolaciji smo, zaradi občutljivosti in nestabilnosti mRNA takoj nadaljevali s prepisom slednje v cDNA obliko, ki je veliko bolj stabilna.

3.2.3. Prepis mRNA v cDNA

Za prepis mRNA v cDNA smo uporabili komercialni reagenčni komplet SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, ZDA) po navodilih proizvajalca. Ta zagotavlja aktivnost encima reverzne transkriptaze v optimalnih pogojih za sintezo verig cDNA, ki so komplementarne mRNA ter omogoča njihovo uporabo pri kvantitativni metodi verižne reakcije s polimerazo v realnem času ali RT-PCR (angl. Real time - polimerase chain reaction) metodi.

Reagenti:

- 10x Super Script® Enzyme Mix (vsebuje reverzno transkriptazo)
- 5x VILO™ Reaction Mix (vsebuje oligonukleotidne začetnike, MgCl₂, deoksinukleotid monofosfate)
- Eluat mRNA

Postopek:

Eluat smo inkubirali 5 min v vodni kopeli na 65 °C nato pa hladili 5 min na ledu, da se RNA vijačnice linearizirajo in s tem lažje prepišejo v cDNA. Združili smo po 12 µL raztopine 5x VILO™ Reaction Mix in po 6 µL raztopine 10x Super Script® Enzyme Mix, ter dodali po 42 µL eluata mRNA za vsak vzorec posebej. Za večjo učinkovitost prepisa smo vzorce inkubirali 120 min pri temperaturi 42 °C.

Preglednica I: Pogoji reakcije reverzne transkripcije (RT)

faza	temperatura	čas
prileganje začetnikov	25 °C	10 min
prepisovanje	42 °C	120 min
prekinitvev reakcije	85 °C	5 min

Sintetizirano cDNA smo nato do analize shranili v zmrzovalniku na -80°C.

3.2.4. Priprava interne kontrole

Interna kontrola nam služi za uravnavanje enotnega fluorescenčnega praga na reakcijskih ploščicah in s tem zmanjšanja medserijske neponovljivosti. Analiziramo lahko samo eno reakcijsko ploščico naenkrat, vemo pa da pogoji nikoli niso popolnoma enaki (nihanje napetosti, detektorja, zmanjševanje delovnih ur žarnice...). Interna kontrola deluje tudi kot pozitivna kontrola, ki hkrati potrdi kakovost sond uporabljenih pri RT-PCR reakciji. Na razpolago smo imeli tumorsko pljučno tkivo, ki je bogato z RNA.

Za izolacijo RNA smo uporabili komercialni reagenčni komplet RNeasy[®] Mini Kit (Quiagen, Nemčija) in delali po navodilih proizvajalca.

Reagenti:

- RLT pufer (vsebuje β -merkaptoetanol)
- 70 % etanol
- pufer RW1
- pufer RPE (vsebuje absolutni etanol)
- voda brez RNaz

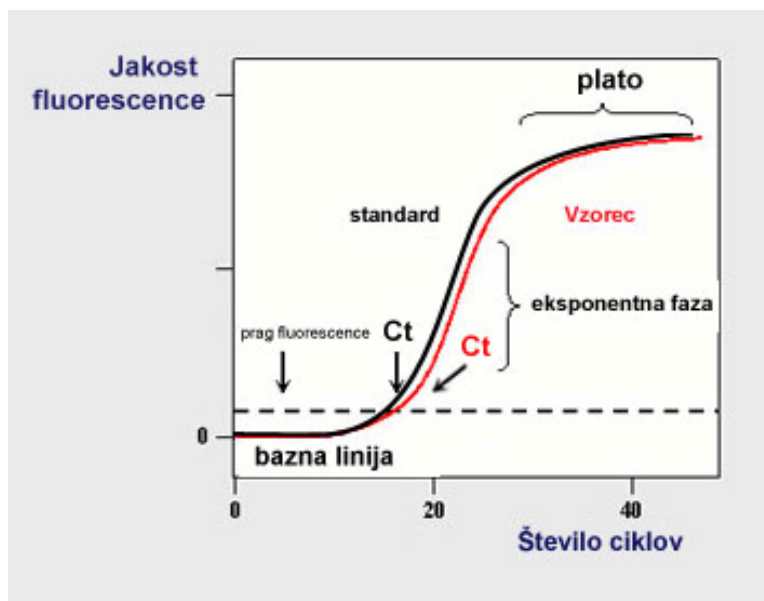
Postopek:

Vzeli smo tkivo iz zmrzovalnika in ga prenesli v terilinico. Tkivu smo takoj dodali tekoči dušik, ker se ne sme odtaliti, in začeli z drobljenjem. Pred tem smo si pripravili 6 posodice (število posodice izberemo odvisno od količine RNA, ki jo potrebujemo) z po 600 μ L pufra RLT, ki smo mu dodali β -merkaptoetanol. Ko je bilo tkivo dovolj zdrobljeno, smo suspenzijo prenesli v pripravljene posodice tako, da je bilo v vsaki približno 20 mg tkiva. S pomočjo ultrazvočne palčke smo tkivo dodatno homogenizirali in tako omogočili lažje sproščanje RNA iz celic. Sledilo je centrifugiranje in nadaljevanje dela v aseptični komori za izolacijo RNA. Supernatant smo prenesli v čiste posodice, dodali po 600 μ L 70 % etanola in premešali. Raztopino smo v dveh korakih prenesli na mini kolonice in centrifugirali. Po spiranju kolonic s pufrom RW1 in dvakratnim spiranjem s pufrom RPE je sledila dvakratna elucija s 50 μ L vode brez prisotnih RNaz. Dobljeno RNA smo prepisali v

cDNA zaradi večje stabilnosti in potreb RT-PCR reakcije ter ustrezno redčili, da bi dobili približno enako razmerje cDNA, kot je to v vzorcih.

3.2.5. Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (RT-PCR)

Pri merjenju izražanja genov nam pogosto zadostuje podatek o razliki med vzorci, zato rezultate podajamo relativno kot razmerje med mRNA proučevanega gena in mRNA referenčnega gena, oziroma gena, katerega izražanje je enako pri vseh preiskovancih, neodvisno od zdravstvenega stanja, demografskih podatkov ali kakršnihkoli drugih podobnih okoliščin. Na osnovi izmerjene fluorescence v eksponentni fazi analizator nariše krivuljo, ki podaja odvisnost intenzitete fluorescenčnega signala posameznih vzorcev od števila ciklov. Krivulja pomnoževanja je razdeljena na dve fazi: eksponentna faza in neeksponentna plato faza. V eksponentni fazi se količina PCR produkta v vsakem ciklu podvoji. V poznejših ciklih se reakcija postopno upočasnjuje zaradi porabe sestavin reakcijske zmesi, manjše aktivnosti DNA polimeraze in kopičenje inhibitornih produktov ter zaradi tega preide v plato fazo. V začetnih ciklih fluorescenca ne preseže fluorescence ozadja. Sčasoma pa je količina produkta dovolj velika, da lahko zaznamo signal. Cikel, pri katerem se to zgodi, imenujemo cikel fluorescenčnega praga (ang. threshold line) oziroma Ct. Pri večjem začetnem številu kopij matrice signal prej preseže prag in tako določimo nižji Ct. Vrednosti Ct so obratno sorazmerne z začetnim številom kopij matrice in na osnovi njih primerjamo vzorce med seboj (31,32,33).



Slika 5: RT-PCR krivulja pomnoževanja (34).

Pri magistrski nalogi smo za merjenje plazemskih nivojev mRNA *VCAM1* uporabili sekvenčno-specifične TaqMan[®] hidrolizirajoče sonde. To so majhni oligonukleotidi (dolgi približno 20 baznih parov), komplementarni tarčni sekvenci in se skupaj z oligonukleotidni začetniki vežejo na cDNA. 5'-konec je označen s fluorescentnim reporterskim barvilom, 3'-konec je vezan na dušilec in hkrati onemogoča podaljševanje sonde. *Taq* DNA polimeraza (najpogosteje uporabljena) v procesu replikacije, oz. sinteze nove DNA verige hidrolizira sondo, kar privede do medsebojnega oddaljevanja reporterskega barvila in dušilca, ter pride do emitiranja fluorescence. Zaradi tega je koncentracija hidroliziranih sond direktno sorazmerna koncentraciji PCR produktov. Za vsak vzorec smo reakcijo izvedli v trojniku. Namesto enega referenčnega gena smo zaradi bolj kakovostne primerjave uporabili dva. Najprimernejša referenčna gena sta bila gen za ciklofilin A (*PPIA*) in gen za beta aktin (*ACTB*).

Reagenti:

- ddH₂O (dvakrat destilirana)
- Fast Start Universal Probe Master (ROX)

- komercialno pripravljena mešanica oligonukleotidnih začetnikov in sond (TaqMan[®] Pre-Developed Assay Reagents)

Postopek:

Preden smo začeli z delom smo z 3 % raztopino hipoklorita in 30 min delovanjem UV svetlobe, ščistili PCR komoro. Vse potrebne reagente in vzorce (cDNA) smo odtaljevali počasi na ledu. Vzorce smo, odvisno od merjenega gena, ustrezno razredčili z ddH₂O. Za proučevanje nivoja mRNA *VCAM1* je redčitev bila 1:4, za *PPIA* in *ACTB* pa 1:18.

V vsaki vdolbinici reakcijske ploščice MicroAmp[®] Optical 96-Well Optical Reaction Plate with Barcode (Applied Biosystem, ZDA) smo pripravili 25 µL reakcijske mešanice tako, da smo napipetirali po 11,75 µL razredčene vzorčne cDNA, 0,75 µL komercialno pripravljene mešanice oligonukleotidnih začetnikov in sond za posamezni gen, in po 12,5 µL univerzalne zmesi reagentov Fast Start Universal Probe Master (ROX), ki vsebuje vse ostale potrebne reagente za PCR reakcijo. Ploščico smo pokrili z samolepilno folijo MicroAmp[®] Optical Adhesive Film (Applied Biosystem, ZDA), jo zvrtnčili in centrifugirali 2 min pri 1200 x g.

Da bi zavrnili prisotnost kontaminacije in nespecifičnih reakcij, smo na vsaki ploščici namesto enega vzorca napipetirali samo ddH₂O (slepa proba). Kot interno kontrolo, ki nam je pozneje služila za uravnavanje enotnega fluorescenčnega praga (threshold line) reakcijskih ploščic in hkrati potrdila specifičnost reakcije za merjeni gen, smo uporabili cDNA prepisano iz izolirane mRNA tumorskega pljučnega tkiva.

Tako pripravljene ploščice smo analizirali v ABI Prism[®] 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem, ZDA) analizatorju pod naslednjimi pogoji:

Preglednica II: Pogoji RT-PCR

faza	temperatura	čas
aktivacija encima UNG*	50 °C	2 min
aktivacija polimeraze DNA	95 °C	10 min
denaturacija	95 °C	15 s
prileganje/ podaljševanje	60 °C	60 s  45x

*Encim uracil-N-glikozidaza (UNG, angl. uracil-N-glycosylase) ima vlogo razgrajevanja prisotnih preostalih kontaminatov in se z porastom temperature v naslednji fazi takoj inaktivira (35).

Določanje enotnega fluorescenčnega praga

Spremljanje rezultatov analize nam je omogočila programska računalniška oprema 7000 System SDS Software. Po končani RT-PCR reakciji smo za vsak merjeni gen morali določiti enotni fluorescenčni prag, da bi vzorce lahko sploh primerjali med seboj.

Glede na to, da smo vse vzorce, vključno z interno kontrolo delali v trojniku, smo izračunali povprečja meritev (Ct) internih kontrol za vsak gen posebej in fluorescenčni prag (angl. threshold line) posameznega merjenega gena uravnali na ustrezno aritmetično sredino interne kontrole. S tem smo zagotovili približno enake pogoje meritev vseh reakcijskih ploščic.

Agarozna gelska elektroforeza

Kljub temu, da proizvajalci garantirajo za specifičnost prileganja sond, smo želeli potrditi, da je temu res tako, s pomočjo agarozne gelske elektroforeze. Imeli smo na razpolago vzorce, izolirane mRNA, v katere smo namesto reagenta, ki vsebuje reverzno transkriptazo, dodali le dH₂O in s tem onemogočili prepis, prav tako pa tudi vzorce izolirane genomske DNA v različnih koncentracijah (10 ng/μL, 1 ng/μL, 0,5 ng/μL). Po izvedeni RT-PCR reakciji smo raztopine iz trojnika, za posamezen vzorec, združili v isto posodico, nanесли na gel in izvedli elektroforezo. Že RT-PCR metoda je z odsotnostjo fluorescenčnega signala pokazala, da ni bilo nespecifičnih pomnoževanj, kar je potrdila odsotnost PCR produktov na agaroznem gelu.

3.2.6. Merjenje koncentracije proteina VCAM-1, CRP, HOL, HDL, LDL, in TG

Koncentracija topnega žilnoceličnega adhezijskega proteina-1 (VCAM-1) je v serumu preiskovancev izmerjena z metodo ELISA in uporabo reagenčnega kompleta Quantikine[®] Human sVCAM-1 Immunoassay (R&D Systems, ZDA) v Laboratoriju za žilne bolezni KC Ljubljana. Metoda temelji na vezavi VCAM-1 proteina na monoklonska protitelesa vezana na mikroploščici ter na pozneje dodana sekundarna protitelesa, označena s hrenovo peroksidazo, ki potem ob dodatku substrata omogočajo merjenje intenzitete barve

proporcionalne koncentraciji VCAM-1 proteina v serumu vzorcev (36). Koncentracije celotnega holesterola in njegovih frakcij, trigliceridov ter CRP-a so določene v laboratoriju Splošne bolnišnice Jesenice.

3.2.7. Statistična analiza

Rezultate (Ct) iz trojnika za posamezen vzorec smo ovrednotili z aritmetično sredino, kjer je to bilo mogoče. Vse ostale meritve smo ponovili in potem delali selekcijo v računalniškem programu Microsoft Excel (Microsoft, ZDA). Pri 7-ih vzorcih nismo dobili signala pri meritvah. V primeru, ko je samo ena vrednost odstopala od preostalih dveh, smo jo izločili iz analize. Če je sipanje vseh vrednosti tudi po ponovljenih meritvah bilo veliko ($Sd > 0,8$) smo zaključili, da vrednosti ni mogoče izmeriti. Takšnih je bilo sedem vzorcev (8 %), zanesljivo pa smo izmerili nivo mRNA v 72 vzorcih (84 %). Dobljene Ct vrednosti tarčnega *VCAM1* gena smo standardizirali s pomočjo srednje Ct vrednosti obeh referenčnih genov $[(Ct(ACTB)+Ct(PPIA)) / 2]$ za posamezni vzorec. Torej, izračunali smo razliko izmerjenih Ct vrednosti tarčnega in referenčnih genov (ΔCt) po formuli: $\Delta Ct = Ct(VCAM1) - [(Ct(ACTB)+Ct(PPIA)) / 2]$ in poiskali vzorec z najmanjšim izražanjem tarčnega gena glede na referenčne, oz. vzorec z najvišjo vrednostjo ΔCt (ΔCt_{max}). Ker je plazemski nivo razmerje števila molekul mRNA *VCAM1* glede na število molekul mRNA referenčnih genov v istem vzorcu in uravnan na vzorec z najmanjšim izražanjem tarčnega gena, smo plazemski nivo mRNA tarčnega gena (*VCAM1*) izračunali po enačbi: $2^{(\Delta Ct_{max} - \Delta Ct)}$.

Statistično analizo smo opravili v računalniškem programskem paketu SPSS 17.0 (SPSS Inc., ZDA). Odločili smo se za analizo s pomočjo multivariantne linearne regresije, ki zahteva normalno porazdeljene vrednosti odvisne spremenljivke (37). S Kolmogorov-Smirnovovim testom smo ugotovili, da se vrednosti plazemskega nivoja mRNA *VCAM1* ne porazdeljujejo normalno in smo zato omenjene vrednosti logaritmirali. Logaritmiranje so zahtevale tudi vrednosti koncentracij proteina VCAM-1. Opisne spremenljivke smo binomsko kodirali.

4. REZULTATI

Analizirali smo plazmo in serum 86 preiskovancev, katere smo razdelili glede na spol, starost, prisotne bolezni, oz. stanja in zdravila, ki jih prejemajo. Za izvedbo statistične analize je pomembno, da so skupine približno enako velike. Iz Preglednice III je razvidno, da obstajajo določena odstopanja, predvsem pri starosti. Zdravi preiskovanci so bili mlajši. Ostale razlike (kajenje, družinska nagnjenost in sladkorna bolezen) ne moremo obravnavati, saj so posledica vključitvenih kriterijev za zdrave prostovoljce. Zdravi prostovoljci že po definiciji niso mogli biti kadilci, sladkorni bolniki ali imeti pozitivno družinsko anamnezo, saj bi tako imeli več kot 10 % tveganje za akutni koronarni dogodek v naslednjih 10 letih.

Preglednica III: Prikaz značilnosti preiskovancev

Preiskovanci	Zdravi	Stabilni koronarni sindrom (SKS)	Akutni koronarni sindrom (AKS)
N=86	N=30	N=24	N=32
Spol (moški/ženska)	20/10	15/9	26/6
Povprečna starost	42	62	66
Družinska nagnjenost (ne/da)	30/0	18/6	27/5
Kajenje (ne/da)	30/0	23/1	22/10
Sladkorna bolezen (ne/da)	30/0	14/10	22/10
Statini (ne/da)	30/0	1/23	11/21
Aspirin (ne/da)	30/0	2/22	13/19
ACE inhibitor (ne/da)	30/0	10/14	16/16
Koronarna angiografija (ne/enojna/dvojna/trojna žilna bolezen)	/	1/12/4/7	0/12/11/9

Kot je bilo pričakovano, referenčna gena sta izmerjena brez težav v vseh vzorcih. Nekaj težav smo imeli le pri merjenju *VCAM1*. Rezultati meritev mRNA *VCAM1* in izračunane standardizirane vrednosti glede na izražanje hišnih genov so podane v Prilogi I.

Po izvedenih meritvah v plazmi smo serumske vzorce istih preiskovancev transportirali v Laboratorij za žilne bolezni KC Ljubljana in v laboratorij Splošne bolnišnice Jesenice, kjer so določili koncentracije proteina VCAM-1, CRP, holesterola, LDL, HDL in TG. Rezultati so podani v Prilogi II.

Preverjali smo vplive in odnose zdravstvenega stanja preiskovancev, zdravil in posameznih vzporedno merjenih analitov, ter nivoja mRNA *VCAM1* in proteina VCAM-1. Najprej smo želeli analizirati korelacijo med plazemskim nivojem mRNA *VCAM1* in serumsko koncentracijo proteina VCAM-1. Postavili smo ničelno (H_0) in alternativno (H_a) hipotezo ter določili stopnjo tveganja $\alpha = 0,05$:

- H_0 : ϱ (grš. ro) je enak 0 (Ni povezave med spremenljivkama.)
- H_a : ϱ (grš. ro) ni enak 0 (Med spremenljivkama obstaja povezava.)

Iz rezultatov (Preglednica VI) vidimo, da med spremenljivkama obstaja povezava ($p < 0,05$), vendar glede na nizek Pearsonov koeficient korelacije je ta razmeroma šibka.

Preglednica IV: Korelacija mRNA *VCAM1* in proteinom VCAM-1.

		VCAMprot.	mRNA <i>VCAM1</i>
VCAMprot.*	Pearsonov coef. korelacije	1	,247 [*]
	Sig. (p) (2-stransko)		,038
	N	85	71
mRNA <i>VCAM1</i> *	Pearsonov coef. korelacije	,247 [*]	1
	Sig. (p) (2-stransko)	,038	
	N	71	72

*Vrednosti so logaritmično transformirane z namenom pridobitve normalne distribucije podatkov.

V nadaljevanju smo analizirali multivariantne vplive spremenljivk na mRNA *VCAM1* in protein VCAM-1 pri bolnikih s CAD. Zaradi šibke povezave smo v nadaljevanju mRNA *VCAM1* in protein VCAM-1 obravnavali ločeno. Zanimal nas je vpliv in odnos spremenljivk, ki so bile na razpolago iz zbranih podatkov o preiskovancih na plazemski nivo mRNA *VCAM1* in koncentracijo proteina VCAM-1. Zanimal nas je predvsem vpliv zdravil, ki so jih preiskovanci jemali, in povezava z drugimi merjenimi laboratorijskimi analiti. Zaradi omejitve testiranih kategorij glede na število preiskovancev smo analizo razdelili v dva dela.

Plazemski nivo mRNA *VCAM1* je močno povezan s AKS, ne pa z SKS. Jemanje statinov je povezano z višjim plazemskim nivojem mRNA *VCAM1*. V skupini 44 bolnikov s CAD, ki so jemali statine so bili nivoji mRNA *VCAM1* statistično značilno povišani ($\bar{x} = 0,88$) v primerjavi s primerjalno skupino, ki niso jemali statine ($\bar{x} = 0,73$) ($p < 0,05$) (Preglednica V). Z višjim plazemskim nivojem mRNA *VCAM1* so povezane tudi znižane vrednosti HDL holesterola ($p < 0,05$).

Preglednica V: Vpliv zdravil, zdravstvenega stanja in odnos med analiti, v povezavi z nivojem mRNA *VCAM1*.

Model	Nestandardizirani koeficienti		Standardizirani koeficienti	t	Sig.(p)
	B	Std. napaka	Beta		
(Konstanta)	,706	,068		10,422	,000

Stabilni koronarni sindrom (SKS)	,048	,099	,065	,488	,627
Akutni koronarni sindrom (AKS)	,224	,093	,321	2,414	,018

(Konstanta)	,753	,058		12,891	,000
statini01 (kodirano)	,286	,140	,419	2,051	,044
aspirin01 (kodirano)	-,075	,137	-,110	-,547	,586
ACEinhibitor01(kodirano)	-,159	,107	-,221	-1,488	,141

(Konstanta)	1,323	,207		6,383	,000
CRP	-,002	,004	-,052	-,439	,662
HOL	,160	,151	,542	1,060	,293
TG	-,120	,072	-,278	-1,673	,099
HDL	-,385	,131	-,595	-2,931	,005
LDL	-,217	,161	-,657	-1,343	,184

a. Odvisna spremenljivka: mRNA VCAM1Log

Iste spremenljivke smo nato primerjali z serumsko koncentracijo proteina VCAM-1 in ugotovili, da sta z njo povezana, tako SKS kot tudi AKS. V skupini 44 bolnikov s CAD, ki so jemali statine so bile koncentracije proteina VCAM-1 statistično značilno povišane ($\bar{x} = 3,14$) v primerjavi s primerjalno skupino, ki niso jemali statine ($\bar{x} = 3,01$) ($p < 0,05$) (Preglednica VI).

Preglednica VI: Vpliv zdravil, zdravstvenega stanja in odnos med analiti, v povezavi s koncentracijo proteina VCAM-1.

Model	Nestandardizirani koeficienti		Standardizirani koeficienti	t	Sig.
	B	Std. napaka	Beta		
(Konstanta)	3,001	,025		119,491	,000

Stabilni koronarni sindrom (SKS)	,152	,037	,478	4,140	,000
Akutni koronarni sindrom (AKS)	,077	,034	,260	2,253	,027

1	(konstanta)	3,012	,022		139,249	,000
	statini01 (kodirano)	,156	,050	,539	3,145	,002
	aspirin01 (kodirano)	-,020	,045	-,069	-,443	,659
	ACEinhibitor01(kodirano)	-,023	,040	-,078	-,579	,564

1	(Konstanta)	3,358	,075		44,611	,000
	CRP	,000	,001	,037	,342	,733
	HOL	-,136	,061	-1,135	-2,228	,029
	TG	,008	,029	,043	,273	,786
	HDL	,031	,054	,119	,575	,567
	LDL	,107	,065	,778	1,651	,103

a . Odvisna spremenljivka: VCAMprot. Log

5. RAZPRAVA

Zaradi možnosti neinvazivnega vpogleda v različna dogajanja v telesu in široke uporabnosti v zgodnji diagnostiki, tako ateroskleroze kot tudi številnih drugih bolezni, kvalitativne in kvantitativne analize zNK predstavljajo velik izziv. Ateroskleroza je danes dobro znana kot kronični vnetni proces, ki lahko privede do infarkta miokarda, možganske kapi in periferne žilne bolezni. Vloga vnetja v patogenezi ateroskleroze vodi v razvoj terapij, usmerjenih proti žilnem vnetju (27,28). Levkociti imajo ključno vlogo v razvoju aterosklerotične lehe. Raziskave so pokazale, da ima VCAM-1, na katerega se levkociti vežejo, ključno vlogo v zgodnji fazi razvoja ateroskleroze in je zaradi tega znanstvenikom zelo zanimiv, posebej na nivoju mRNA (6). Tako naj bi omogočal pravočasno odkrivanje bolezni, in preprečevanje hudih zapletov koronarne ateroskleroze (CAD), katera je ena od vodilnih vzrokov smrtnosti v razvitem svetu. VCAM-1 je že dlje časa tarča številnih

raziskovalnih študij, vendar kljub temu ni izjemnih napredkov kot bi jih pričakovali. Vzrok temu je verjetno zapletenost bolezenskega procesa ateroskleroze, ravno tako pa tudi tesna povezanost z načinom življenja, jemanjem zdravil in gensko predispozicijo za določene bolezni, ki so v povezavi z aterosklerozo. V tem sistemu težko ločimo vplive, vzroke in posledice. Zaradi tega je problematična opredelitev primerjalne skupine zdravih. Poleg tega vemo, da se ateroskleroza dejansko začne že v otroštvu in je še razlog več ta težavno opredelitev zdravstvenega stanja (1).

V sklopu magistrske naloge nam je uspelo izolirati in izmeriti nivo mRNA *VCAM1* v skupini zdravih in tudi v skupini bolnikov. Za merjenje nivoja mRNA *VCAM1* smo uporabili metodo RT-PCR, katera je zaradi visoke občutljivosti, dobre ponovljivosti in širokega dinamičnega območja bila najbolj primerna za detekcijo nizkih koncentracij mRNA v izhodiščnem materialu. Reakcija in vrednotenje podatkov je potekalo v zaprtem sistemu in je tako bila manjša možnost kontaminacije vzorcev. Vrednotenje rezultatov je potekalo brez gelske elektroforeze, kar je skrajšalo čas poskusa (32,33). Plazemski nivo smo zanesljivo izmerili pri 72 od 86 vzorcev (84 %). Pri sedmih vzorcih (8 %) je mRNA *VCAM1* bila v nemerljivih količinah, pri enakem številu vzorcev nivoja mRNA *VCAM1* pa ni bilo možno določiti, zaradi prevelike variabilnosti Ct meritev. Takšne rezultate smo dobili verjetno zaradi tega, ker se je mRNA *VCAM1* *in vivo* (v telesu) ali *in vitro* (v fazi izolacije) preveč razgradila in jo ni bilo mogoče izmeriti. Kljub temu, da smo delali z komercialnimi reagenčnimi kompleti po navodilih proizvajalca, bi bilo vseeno potrebno preveriti ključne korake pri izolaciji zNK (npr. količino dodanega RNA nosilca, čas in pogoje proteolize) v smislu optimizacije postopka in doseganja večje učinkovitosti izolacije. Poleg tega znanstveniki menijo, da s prisotnostjo bolezni bolj korelira prosta mRNA kot pa mRNA vezana na proteine ali druge komplekse. Povečata pa se koncentraciji obeh (37). Prosta mRNA je labilna in se je ob hidrolizi med izolacijo lahko fragmentirala, vezana mRNA *VCAM1* je pa bolj zaščitena proti razgradnji z RNA-zami, ter smo mogoče pri meritvah določili le slednjo. Pri delu smo posebej pazili na vzdrževanje aseptičnih pogojev in tako zmanjšali možnost kontaminacije in razgradnje nukleinskih kislin, predvsem mRNA. Kritična točka analize je lahko tudi nespecifična vezava komercialno pripravljenih oligonukleotidnih sond, vendar smo kakršnekoli dvome zavrnila z uporabo slepe probe, odsotnostjo signala v vzorcih brez reverzne transkripcije in z rezultati agarozne gelske elektroforeze po RT-PCR reakciji.

Ob analizi rezultatov smo uspeli dokazati vpliv zdravstvenega stanja na mRNA *VCAM1* in prav tako tudi na protein VCAM-1. AKS je bil močno povezan z mRNA in proteinom, medtem ko smo SKS našli le v povezavi z proteinom VCAM-1. To je mogoče zaradi tega, ker pri opredelitvi zdrave populacije skupina zdravih ni ustrezno izbrana, SKS je prikrit, in je zanemarjena prisotnost drugih bolezni in poškodb, ki bi lahko vplivale na izražanje VCAM-1. Če se ozremo na koncentracijo C-reaktivnega proteina v vzorcih, v katerih nismo mogli določiti nivoja mRNA *VCAM1* zaradi prevelike standardne napake, ugotovimo, da je pri polovici primerov CRP močno zvišan, to pa poleg CAD lahko kaže na prisotnost nekaterih drugih bolezni, kot na primer virusne okužbe ali druga obsežna vnetna dogajanja. To lahko podkrepi zastavljeno teorijo. Velika je verjetnost, da zaradi previsoke koncentracije CRP v krvi ali pa nekaterih drugih prisotnih dejavnikov nismo mogli izmeriti nivoja mRNA *VCAM1*. Ugotovili smo, da so v vseh vzorcih z izmerjenimi vrednostimi CRP >30 mg/L (6 vzorcev) koncentracije proteina VCAM-1 > 1000 ng/mL. Lahko sklepamo na močno povezavo, kar pa je logično glede na patofiziologijo ateroskleroze. CRP pričakovano zavzema najvišje vrednosti pri bolnikih s prisotnim akutnim koronarnim sindromom zaradi najbolj obsežne vnetne spremembe žilne stene v tej fazi bolezenskega procesa. Nikakor ne smemo zanemariti dejstva, da se koncentracija CRP močno zviša ob akutni koronarni poškodbi, katera je najpogostejši zaplet napredovale CAD. Primerjali smo tudi skupino bolnikov, ki jemljejo statine s skupino, ki statinov ne jemljejo. Ugotovili smo, da je jemanje statinov povezano z višjim plazemskim nivojem mRNA *VCAM1* in višjo koncentracijo proteina VCAM-1. Znano je bilo, da se pod vplivom statinov proces ateroskleroze upočasni, s tem pa tudi zmanjša izražanje VCAM-1 (6,11). Če poenostavimo, jemanje statinov bi moralo biti povezano z znižanim nivojem mRNA *VCAM1* in znižano koncentracijo proteina, vendar najnovejša spoznanja opozarjajo, da je ugoden učinek statinov na žilno steno odvisen tudi od odmerka zdravila in da visoki odmerki lahko vplivajo celo škodljivo (39,40,41,42,43). Dokazali smo tudi, da je znižana koncentracija HDL holesterola povezana z višjimi nivoji mRNA *VCAM1* v plazmi, kar potrjujejo znanstvena odkritja, da je ateroskleroza povezana z znižano koncentracijo HDL holesterola v krvi. Zanimivo je, da je zvišana koncentracija proteina VCAM-1 povezana z znižano koncentracijo celotnega holesterola, to pa potrjuje vpliv statinov na zniževanje holesterola, ne pa na samo sintezo proteina VCAM-1. Lahko bi tudi sklepali, da statini celo zvišujejo koncentracijo proteina VCAM-1 v krvi. Vprašanje je potem, koliko statini dejansko pomagajo v zdravljenju CAD. Z zniževanjem holesterola zmanjšujejo tveganje za

zaplete, vendar očitno ne vplivajo ali pa delujejo škodljivo na ključne dejavnike v razvoju bolezni kot je npr. VCAM-1.

Zakaj prihaja do razlik v povezavi mRNA in samega analiziranega proteina, z našo raziskavo nismo uspeli pojasniti. Očitno je, da se nivo mRNA *VCAM1* spremeni do sinteze proteina VCAM-1, ali pa odvisno od potreb obstaja večje časovno okno v procesu sinteze. Kljub temu lahko zaključimo, da sta mRNA *VCAM1* in serumski VCAM-1 daleč najboljši biološki kazalci CAD. Na izražanje kot tudi na zaviranje izražanja *VCAM1* vplivajo različni dejavniki, vendar še dandanes ni potrjen kardioprotektivni učinek ob zaviranju izražanja *VCAM1* (11). Ekstrapolacija raziskav z mišjih modelov na človeka ostaja negotova in nezanesljiva, število obolelih pa raste. Do zdaj uporabljeni kazalci so premalo specifični, diagnostične metode pa premalo občutljive. Če se po nadaljnjih raziskavah naši rezultati potrdijo, CAD bomo odkrivali s pomočjo merjenja serumske koncentracije VCAM-1, mRNA *VCAM1* pa bomo lahko uporabili za diferencialno diagnostiko SKS, oz. AKS. Zato so znanstvene raziskave na tem področju nujno potrebne in izjemno koristne.

6. ZAKLJUČKI

1. Nivo mRNA *VCAM1* je možno zanesljivo določiti v plazmi bolnikov s CAD kot tudi zdravih. SKS je močno povezan le z nivojem mRNA *VCAM1*, medtem ko je AKS povezan tudi s koncentracijo proteina VCAM-1.
2. Jemanje statinov je povezano z zvišanim nivojem mRNA *VCAM1* in zvišano koncentracijo proteina VCAM-1 v plazmi.
3. Višji nivo mRNA *VCAM1* je povezan z znižano koncentracijo HDL holesterola. Višja koncentracija proteina VCAM-1 pa je povezana z znižano koncentracijo celotnega holesterola.
4. Povezava med nivojem mRNA *VCAM1* in proteinom VCAM-1 obstaja, vendar je šibka.

7. LITERATURA

1. Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. Medicinska naklada Zagreb, 2006; XI. izdaja, XII.poglavje:848-851.
2. <http://www.pitaj-za-zdravlje.com/clanci/interna-medicina> (januar 2011)
3. Černe D. Lipidi in ateroskleroza. Klinična biokemija-Univerzitetni program farmacija, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010.
4. Černe D. Akutni koronarni sindrom. Klinična biokemija-Univerzitetni program farmacija, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010.
5. Jančar N, Tomšič T, Narat M. Družinska hiperholesterolemija. Seminarska naloga pri predmetu klinična diagnostika. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010.
6. Preiss DJ, Sattar N. Vascular cell adhesion molecule-1: a viable therapeutic target for atherosclerosis?. International Journal of Clinical Practice 2007; 61:697-701.
7. Gregg AJ, Schenkel AR. Cloning and structural analysis of equine platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM, CD31) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1, CD 106). Vet Immunol Immunopathol. 2008; 122(3-4): 295-308.

8. Naito Y, Yoshikawa T. Green tea and hearth health. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2009; 54(5): 385-90.
9. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Kaski JC. Inflammatory systemic biomarkers in setting acute coronary syndromes-effects of the diurnal variation. *Curr Drug Targets*. 2009; 10(10):1001-8.
10. Stefanadi E, Tousoulis D, Androulakis ES, Papageorgiou N, Charakida M, Siasos G, Tsioufis C, Stefanadis C. Inflammatory markers in essential hypertension: potential clinical implications. *Curr Vasc Pharmacol*. 2010; 8(4):509-16.
11. Stefanadi E, Tousoulis D, Papageorgiou N, Briasoulis A, Stefanadis C. Inflammatory biomarkers predicting events in atherosclerosis. *Curr Med Chem*. 2010; 17(16):1690-1707.
12. Zhang J, Pilar A, Liu L, Sun J, He A, Luscinskas FW, Shi GP. Regulation of Endothelial Cell Adhesion Molecule Expression by Mast Cells, Macrophages, and Neutrophils. *PloS ONE*. 2011; 6(1):e14525.
13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> (januar 2011)
14. Cook-Mills JM. VCAM-1 signals during lymphocyte migration: role of reactive oxygen species. *Molecular Immunology*. 2002; (39) 499-508.
15. Akhtar AM, Schneider JE, Chapman SJ, Jefferson A, Digby JE, Mankia K, Chen Y, McAteer MA, Wood KJ, Choudhury RP. *In vivo* Quantification of Vcam-1 Expression in Renal Ischemia Reperfusion Injury Using Non-Invasive Magnetic Resonance Molecular Imaging. *PloS ONE*. 2010; 5(9):e12800.
16. <http://www.genecards.org/cgi-bin> (januar 2011)
17. Fulmer T. Disrupting atherosclerosis. *SciBX* 2009; 2(3).
18. Libby P. Imflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002; 420:868-874.
19. <http://en.wikipedia.org/wiki/VCAM-1> (marec 2011)
20. Li CJ, Sun HW, Zhu FL, Chen L, Rong YY, Zhang Y, Zhang M. Loval adiponectin tratment reduces atherosclerotic plaque size in rabbits. *J Endocrinol*. 2007; 193(1): 137-145.
21. Cybulsky MI, Liyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Liyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connely PW, Milstone DS. A major role of VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2001; 107:1255-1262.

22. Ley K, Huo Y. VCAM-1 is critical in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2001; 107:1209-1210.
23. Prázný M, Kasalová Z, Mazoch J, Kvasnicka J, Skrha J. Microvascular Reactivity and Endothelial Function in Type 2 Diabetic Patients with Hyperlipidemia Treated with Simvastatin 3-year Follow-up. *Prague Med Rep.* 2009; 110(4):290-300.
24. Patti G, Chello M, Pasceri V, Colonna D, Nusca A, Miglionico M, D'Ambrosio A, Covino E, Di Sciascio G. Protection from procedural myocardial injury by atorvastatin is associated with lower levels of adhesion molecules after adhesion percutaneous coronary intervention: results from the AMYDA-CAMs (Atorvastatin for Reduction of Myocardial Damage during Angioplasty-Cell Adhesion Molecules) substudy. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 48(8):1560-1566.
25. Zhang M, Fang WY, Yuan F. Simvastatin downregulates CD40L induced vascular cell adhesion molecule-1 expression and adhesive function in human umbilical vein endothelial cells. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi.* 2007; 35(11):1046-1049.
26. Patti G, Chello M, Gatto L, Alfano G, Miglionico M, Covino E, Di Sciascio G. Short-term atorvastatin preload reduces level of adhesion molecules in patients with acute coronary syndrome undergoing percutaneous coronary intervention. Results from the AMYDA-CAMs (Atorvastatin for Reduction of Myocardial Damage during Angioplasty-Cell Adhesion Molecules) substudy. *J Cardiovasc Med.* 2010; 11(11):795-800.
27. Černe D. Sodobna uporaba analize zunajceličnih nukleinskih kislin v laboratorijski medicini. *Farm vest.* 2010; 61:144-148.
28. Černe D, Štern I, Kranjec I, Marc J. Optimisation of method for quantifying plasma mRNA levels from genes responsible for coronary artery plaque development and destabilisation. *Med Glas Ljek komore Zenicko-doboj kantona.* 2011; 8(1):88-94.
29. Bezenšek S, Pipuš M. Zunajcelične nukleinske kisline danes/jutri. Seminarska naloga pri učnem predmetu klinična diagnostika, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010.
30. Štern I, Marc J, Kranjec I, Zorman D, Černe A, Černe D. Increased plasma levels of CATS mRNA but not CATB mRNA in patients with coronary atherosclerosis. *Clin Biochem.* 2010; 43(18):1427-1430.
31. Vandensompele J, De Peter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe, Speleman F. Accurate normalisation of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology.* 2002; 3.
32. Ashton KJ, Headrick JP. Quantitative (Real-Time) RT-PCR in Cardiovascular Research. *Methods in Molecular Biology.* 2007; 366(1):121-143.

33. Gašper K, Bizjak M, Marinko A. Ugotavljanje vpliva zamrzovanja in temperature na potek PCR reakcije, ter določanje učinkovitosti dekontaminacije pri PCR reakciji. Seminarska naloga pri predmetu biomedicinska analitika, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2009.
34. <http://www.nem.wur.nl/UK/education> (maj 2011)
35. <http://www.qiagen.com> (maj 2011)
36. Navodilo reagenta: Quantikine[®], Human sVCAM-1 Immunoassay for the quantitative determination of human soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (sVCAM-1) concentrations in cell culture supernates, serum, and plasma. R&D Systems, Inc., Mineapolis, ZDA, 2011.
37. Grabnar I. Multivariabilna statistika. Linearna regresija. Predavanja pri predmetu biomedicinska informatika, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010.
38. Ng K, Tsui NBY, Lam YLN, Chiu WKR, Yu CHS, Wong SCC, Lo SFE, Rainer HT, Johndon LP, Jo YMD. Presence of Filterable and Nonfilterable mRNA in the Plasma of Patiens and Healthy Individuals. Clin Chem 2002; 48(8):1212-1217.
39. Ramasubbu K, Mann DL. The Emerging Role of Statins in the Treatment of Hearth Failure. J Am Coll Cardiol. 2006; 47:342-344.
40. Anagnostis P, Athyros VG, Karagiannis A, Mikhailidis DP. Impact of statins on glucose metabolism-a matter of debate. J Am Coll Cardiol. 2011; 107(12):1866.
41. Pappy R, Stavrakis S, Hennebry TA, Abu-Fadel MS. Effect of statin therapy on contrast-induced nephropathy after coronary angiography: A meta-analysis. Int J Cardiol. Jun 2011May [Epub ahead of print].
42. Takahashi Y Satoh M, Tabuchi T, Nakamura M. Prospective, randomized, single-blind comparison of effects of 6 months' treatment with atorvastatin versus pravastatin on leptin and angiogenic factors in patients with coronary artery disease. Heart Vessels. 2011 Jun [Epub ahead of print].
43. Pai M, Evans NS, Shah SJ, Green D, Cook D, Crowther MA, Statins in the prevention of venous thromboembolism: A meta-analysis of observational studies.

1	
---	--

Thromb Res. 2011 Jun [Epub ahead of print].

1	
---	--

8. PRILOGE

PRILOGA I: Rezultati meritev in izračunane standardizirane vrednosti glede na izražanje hišnega gena

Številka vzorca	Ct <i>VCAM1</i>	ΔCt $VCAM1-(ACTB+PPIA)/2$	ΔCt max. - ΔCt
2	37,90	7,080	2,099433367
3	39,18	7,845	1,235418637
6	38,39	6,670	2,789487333
12	34,29	4,385	13,59495999
13	37,67	5,660	5,617779503
14	38,95	6,170	3,944930818
15	NI		
16	38,15	5,690	5,502167273
17	Nmi		
18	38,14	5,695	5,48313122
19	35,36	4,050	17,1483754

20	35,60	3,680	22,16175149
25	37,53	5,305	7,185058983
28	37,03	5,360	6,91629785
29	37,78	6,065	4,242750965
30	39,04	6,760	2,620786808
31	37,97	4,580	11,87618857
32	38,95	6,530	3,073750363
33	39,17	3,215	30,59025016
34	Nmi		
35	Nmi		
37	37,67	7,350	1,741101127
40	37,70	5,730	5,351710219
41	37,77	5,590	5,897076869
44	38,93	4,835	9,952093226
45	36,94	3,895	19,09337189
48	Nmi		
49	37,69	3,805	20,32241572
50	37,53	5,265	7,387058486
51	37,25	4,330	14,12324794
52	38,81	5,460	6,453134074
53	38,11	5,215	7,647562541
54	NI		
55	37,72	4,695	10,96626244
57	36,16	3,120	32,67238802
58	38,23	3,795	20,4637693
60	37,65	4,350	13,92880901
64	37,36	4,945	9,221490774
65	36,15	4,680	11,08087574
66	37,23	4,330	14,12324794
67	37,09	4,160	15,88947993
68	38,48	5,550	6,062866266
69	38,54	4,930	9,317868692
70	38,58	4,060	17,02992292
71	39,18	5,840	4,9588308
72	39,18	4,075	16,85377658
75	38,91	6,620	2,887858391
78	37,58	6,195	3,877159268
79	NI		
82	38,96	6,510	3,116658319
83	38,26	6,710	2,713208655
87	Nmi		
88	NI		
89	36,76	5,975	4,515857619
92	38,70	7,345	1,747145792
93	38,06	5,510	6,233316637

94	36,73	7,215	1,911890635
95	38,93	6,620	2,887858391
96	38,35	5,240	7,516181994
97	38,85	4,165	15,8345065
98	37,33	4,705	10,89051293
99	38,63	4,470	12,81711804
100	37,07	5,870	4,856779538
101	37,55	6,890	2,394957409
103	36,37	4,865	9,747282109
104	38,59	5,980	4,500233939
105	37,72	5,265	7,387058486
106	38,62	5,000	8,876555777
107	NI		
108	NI		
109	39,01	8,150 (Δ Ct max.)	1
110	Nmi		
111	37,66	5,965	4,547267893
112	36,44	4,980	9,000467878
113	37,59	5,925	4,675108994
114	39,32	7,235	1,885569072
115	36,88	4,530	12,29500145
116	37,45	5,090	8,339726087
117	38,54	7,025	2,181015465
118	NI		
119	39,23	5,905	4,740371084
120	38,51	5,700	5,464161027
121	38,73	6,065	4,242750965
122	37,56	4,970	9,063071082
123	Nmi		
124	39,36	6,710	2,713208655

Pojasnitev:

NI= ni merljivo

Nmi= ni mogoče izmeriti

Δ Ct max= najvišja vrednost v stolpcu

PRILOGA II: Serumske koncentracije proteina VCAM-1, CRP, HOL, LDL, HDL in TG

Številka vzorca	Stanje	VCAM-1 (ng/mL)	CRP (mg/L)	HOL (mmol/L)	HDL (mmol/L)	LDL (mmol/L)	TG (mmol/L)
2	2	1231	2,8	4,41	0,78	2,40	2,65
3	2	1850	2,1	3,01	3,01	1,50	2,21
6	2	920	4,1	3,12	0,62	2,00	1,18
12	3	1437	13,5	3,53	0,87	2,10	1,16
13	3	975	5,3	6,50	0,73	5,10	1,42
14	3	1334	1,2	4,20	0,87	2,70	1,34
15	3	1733	1,9	4,46	1,30	2,80	0,69
16	3						
17	3	1086	98,9	2,41	0,33	1,10	2,14
18	2	1225	2,9	3,41	1,03	2,00	0,85
19	2	2648	2,9	3,17	1,10	1,60	1,02
20	2	2949	9,6	2,58	0,74	1,60	0,49
25	3	1411	2,5	3,45	0,58	1,90	2,19
28	3	1138	1,2	5,21	1,31	3,04	1,04

29	2	1730	13,9	4,45	1,14	2,60	1,51
30	2	789	7,3	4,01	1,06	2,10	1,85
31	2	2030	2,3	4,25	1,41	2,50	0,66
32	3	1344	2,2	7,26	0,99	5,80	0,96
33	2	1998	1,6	4,13	0,93	2,60	1,24
34	3	1533	1,9	5,75	0,78	4,70	0,55
35	2	1469	1,2	2,17	0,8	0,80	1,25
37	2	2168	6,2	3,30	0,58	1,90	1,85
40	2	1951	5,4	5,09	1,58	3,30	0,42
41	2	1331	1,8	4,57	0,81	2,60	2,54
44	3	2525	50,7	4,88	0,37	3,60	2,07
45	3	1299	1,5	3,96	0,97	2,00	2,14
48	2	1730	40,5	3,43	0,55	1,90	2,18
49	2	1337	1,1	2,26	0,93	0,80	1,08
50	3	1021	0,7	3,28	1,02	1,80	1,1
51	3	789	0,9	3,39	0,64	2,40	0,84
52	3	1382	33,6	4,01	0,53	2,70	1,62
53	3	878	0,8	3,91	0,95	2,00	2,13
54	3	1292	4,3	4,31	0,82	2,90	1,24
55	3	1577	1,2	4,83	0,41	2,50	4,18
57	3	1609	3,0	4,77	0,69	2,60	3,22
58	3	1170	2,3	2,82	0,58	1,10	2,46
60	3	1910	1,3	3,74	1,19	1,90	1,49
64	2	1370	1,4	4,02	1,22	2,20	1,27
65	3	900	2,9	5,52	0,69	3,90	2,13
66	3	835	12,8	4,34	1,23	2,90	0,47
67	3	747	4,1	4,95	0,97	3,50	0,96
68	3	1257	66,4	3,36	0,93	1,60	1,80
69	3	1115	1,4	5,29	0,95	3,80	1,23
70	3	671	1,4	4,94	0,97	3,60	0,90
71	2	1568	2,9	4,64	2,13	2,30	0,47
72	2	569	1,1	4,28	0,91	2,30	2,44
75	2	1603	3,0	3,84	0,84	2,40	1,33
78	2	1186	2,5	5,34	0,81	3,10	3,08
79	3	1318	0,3	5,42	1,64	3,50	0,64
82	3	1027	2,1	8,59	1,24	6,50	1,96
83	2	858	3,0	4,43	1,62	2,20	1,42
87	3	1577	68,8	4,76	0,49	3,40	1,82
88	2	1060	1,3	3,71	1,22	1,90	1,37
89	2	1163	1,9	2,86	1,28	1,20	0,72
92	3	988	7,9	4,98	1,17	3,00	1,87
93	3	878	26,1	5,68	0,55	3,70	3,20
94	1	878	1,1	5,49	1,30	3,60	1,33
95	1	943	2,8	4,74	1,95	2,50	0,71
96	1	1568	1,0	4,03	1,28	2,20	1,17
97	1	1389	0,5	4,13	1,56	2,00	1,19
98	1	1170	4,6	5,98	1,53	3,75	1,40
99	1	1037	2,1	5,14	2,05	2,90	0,41
100	1	1299	0,9	4,89	1,90	2,50	1,08
101	1	1964	1,4	4,97	1,74	2,70	1,19
103	1	1105	2,4	5,53	1,90	3,20	0,93

104	1	848	0,6	5,69	1,27	3,40	2,30
105	1	799	0,7	6,94	1,75	4,70	1,11
106	1	747	10,1	5,70	1,40	3,70	1,41
107	1	674	10,7	7,23	2,44	4,20	1,37
108	1	815	1,6	5,37	2,37	2,80	0,44
109	1	917	0,9	5,55	2,37	2,50	1,48
110	1	793	1,7	5,51	1,40	3,00	2,45
111	1	1138	4,7	6,48	1,73	4,30	1,01
112	1	743	6,0	6,23	1,22	3,30	3,78
113	1	1086	2,3	4,09	1,64	1,90	1,28
114	1	1073	1,0	4,43	1,43	2,50	1,15
115	1	1427	0,9	4,51	1,64	2,10	1,65
116	1	1331	1,9	3,97	1,77	1,80	0,80
117	1	1212	1,4	5,55	1,31	3,60	1,45
118	1	796	1,7	6,63	1,38	4,20	2,23
119	1	1273	0,8	5,37	1,36	3,70	0,74
120	1	923	1,0	2,96	1,80	0,80	0,83
121	1	1079	0,7	5,57	2,35	2,90	0,64
122	1	825	1,1	5,37	2,17	2,90	0,74
123	1	988	0,6	6,14	2,23	3,70	0,56
124	1	858	0,9	5,35	1,90	3,10	0,69

Pojasnitev:

Stanje: 1= zdravi, 2= stabilni koronarni sindrom, 3= akutni koronarni sindrom

Vzorec št. 16: ni bilo seruma