

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO
MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKA BIOMEDICINA**

MIRJANA KUNAJ

**PROUČEVANJE IZRAŽANJA GENOV *NOS2* IN *NOS3* V
PODGANJIH AORTAH PRI ZDRAVLJENJU S
SUBTERAPEVTSKIMI ODMERKI ATORVASTATINA,
LOSARTANA IN PERINDOPRILA**

***NOS2* AND *NOS3* GENES EXPRESSION IN RAT THORACAL
AORTAS AT THE TREATMENT WITH A SUBTHERAPEUTIC
DOSEAGES OF ATORVASTATIN, LOSARTAN AND PERINDOPRIL**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2014

ZAHVALA

Mentorici, prof. dr. Janji Marc, mag. farm. spec. biokem., iskrena hvala za izkazano zaupanje, razumevanje, za strokovne usmeritve, pripravljenost pomagati in vzpodbudo pri delu.

Iskrena hvala tudi somentorju, viš. znanst. sod. dr. Gorazdu Drevenšku, univ.dipl. biol., za zaupanje, razumevanje, za strokovne usmeritve in pripravljenost pomagati. Hvala tudi njegovim sodelavcem za pomoč pri obdelavi podatkov.

Zahvaljujem se prof. dr. Darku Černetu, mag. farm. spec. biokem., za usmeritve pri laboratorijskem delu in za dragocene nasvete pri izdelavi magistrske naloge.

Velika hvala tudi izrednima profesoricama dr.sc. Jeleni Kotur-Stevuljević in dr.sc. Nataši Bogavac-Stanojević ter mag. farm., Tadeji Lemut, za pomoč in vodenje pri laboratorijskem delu, za nasvete pri statistični obdelavi podatkov in pripravljenost pomagati.

Sam. strok. sodelavkama na katedri, Manji Cedilnik in Petri Ferkov ter vsem ostalim se zahvaljujem za pomoč in nasvete pri reševanju težav, ki so se pojavile tekom laboratorijskega dela.

Iz srca hvala mojim domačim za vso podporo in potrežljivost skozi celoten študij.

IZJAVA

Magistrsko naložbo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za klinično biokemijo, v sodelovanju z Inštitutom za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Izjavljam, da sem magistrsko naložbo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec., med. biokem. in somentorstvom viš. znanst. sod. dr. Gorazda Drevenška, univ.dipl.biol..

Ljubljana, januar 2014

Mirjana Kunaj

Predsednik komisije: izr. prof.dr. Iztok Grabnar

Članica komisije: izr. prof. dr. Anamarija Zega

VSEBINA

ZAHVALA.....	II
IZJAVA.....	II
VSEBINA.....	III
POVZETEK.....	V
ABSTRACT.....	VII
SEZNAM OKRAJŠAV.....	IX
SEZNAM SLIK IN PREGLEDNIC.....	X
1. UVOD	1
1.1. SINTAZE DUŠIKOVEGA OKSIDA	1
1.1.1. NOS2 - inducibilna NO-sintaza	5
1.1.2. NOS3 - endotelijkska NO-sintaza	7
1.2. SRČNOŽILNE BOLEZNI POVEZANE Z DUŠIKOVIM OKSIDOM	9
1.3. ZDRAVLJENJE SRČNOŽILNIH BOLEZNI.....	11
1.3.1. Atorvastatin.....	11
1.3.2. Perindopril	12
1.3.3. Losartan.....	13
1.4. SUBTERAPEVTSKI ODMERKI STATINOV, ACE-INHIBITORJEV IN ANTAGONISTOV TIPA 1 RECEPTORJEV ZA ANGIOTENZIN II	14
NAMEN	16
2. MATERIALI IN METODE.....	17
2.1. OBRAVNAVA POSKUSNIH ŽIVALI TER PRIDOBITEV BIOLOŠKIH VZORCEV ZA MERJENJE IZRAŽANJA <i>NOS2</i> IN <i>NOS3</i>	17

2.1.1.	Razdelitev poskusnih živali in meritve na izoliranih podganjih aortah.....	17
2.1.2.	Pridobitev bioloških vzorcev za merjenje izražanja <i>NOS2</i> in <i>NOS3</i>	19
2.2.	MERJENJE IZRAŽANJA <i>NOS2</i> , <i>NOS3</i> IN <i>HMBS</i>	21
2.2.1.	Princip postopka	21
2.2.2.	Reagenti in priprava raztopin	23
2.2.3.	Aparature in ostala oprema.....	24
2.2.4.	Opis postopka merjenja izražanja <i>NOS2</i> , <i>NOS3</i> in <i>HMBS</i>	24
2.2.5.	Opozorila in ostala priporočila	27
2.3.	STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV	28
3.	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	31
3.1.	OPTIMIZACIJA ANALITSKIH POSTOPKOV	31
3.2.	PREGLED REZULTATOV IN ČASOVNA ANALIZA IZRAŽANJA GENOV	34
3.2.1.	Izražanje <i>NOS2</i> pri različnih vrstah zdravljenja	35
3.2.2.	Izražanje <i>NOS3</i> pri različnih vrstah zdravljenja	38
3.3.	VPLIV VRSTE IN TRAJANJA ZDRAVLJENJA NA IZRAŽANJE GENOV	43
3.4.	FUNKCIJSKE LASTNOSTI TORAKALNE AORTE V ODVISNOSTI OD IZRAŽANJA GENOV	47
3.4.1.	Vpliv izražanja <i>NOS</i> na KONSTR in RELAKS	48
3.4.2.	Ocena povezanosti funkcijskih lastnosti aorte in izražanja <i>NOS</i>	54
4.	SKLEPI	58
5.	LITERATURA.....	60
6.	PRILOGE.....	65

POVZETEK

Statini, antagonisti receptorjev za angiotenzinII in ACE-inhibitorji imajo poleg svojih osnovnih učinkov tudi dodatne pleiotropne učinke, ki prav tako ugodno vplivajo na srčnožilni sistem. Ti učinki so prisotni tudi ob subterapevtskih odmerkih zdravil. Namen našega dela je bil ugotoviti, kako subterapevtski odmerki atorvastatina (ATO), losartana (LOS), perindoprila (PER) in njihovih kombinacij vplivajo na izražanje inducibilne sintaze dušikovega oksida (*NOS2*) in endoteljske sintaze dušikovega oksida (*NOS3*) ter nadalje, povezanost izražanja obeh genov s kontrakcijo in z relaksacijo aorte med zdravljenjem pri podganah. Enainšestdesetim odraslim Wistar podganam, ki so bile 4, 6, 8 ali 10 tednov tretirane z nizkimi odmerki: ATO (2mg/kg) ali LOS(5mg/kg) ali PER (0,6mg/kg) ali s kombinacijama ATO+LOS ter ATO+PER v prej navedenih odmerkih in v kontrolni skupini, kjer so bile živali, ki niso bile zdravljene, smo izražanje *NOS2* in *NOS3* v torakalnih aortah izmerili z metodo kvantitativni PCR v realnem času. Kontraktilnost oz dilatacijo aort smo ovrednotili z merjenjem odstotka največe možne konstrikcije (KONSTR) glede na največjo krčitev, izzvano s KCl. Nato smo obročke sprali, ponovno žile skrčili, tokrat s fenilefrinom in izmerili odstotek relaksacije (RELAKS) po dodajanju od endotelija odvisnega vazodilatatorja acetilholina. Za statistično vrednotenje rezultatov smo združili 4. in 6. teden trajanja zdravljenja (zgodnje obdobje zdravljenja) ter 8. in 10. teden trajanja zdravljenja (pozno obdobje zdravljenja).

Pri zdravljenju z ATO so imeli vzorci z manjšim KONSTR višji nivo izražanja *NOS2* ($p=0,05$). Prav tako je v skupini, ki je prejemala ATO obstajala mejna negativna korelacija med nivojem izražanja *NOS2* in KONSTR ($p=0,074$). Na splošno se izražanje *NOS2* ni razlikovalo niti med različnimi obdobji trajanja zdravljenja niti med različnimi vrstami zdravljenja. Vendar pa smo pri posamični primerjavi skupin opazili razliko v izražanju *NOS2* med kontrolno skupino in skupino, ki je prejemala kombinacijo ATO+PER ($p=0,042$). Skupina živali, ki je prejemala PER je imela v zgodnjem obdobju zdravljenja mejno višje izražanje *NOS3* ($p=0,059$). Opazili smo, da ne glede na vrsto zdravljenja, čas zdravljenja mejno statistično značilno vpliva na izražanje *NOS3* ($p=0,056$) in sicer je bilo izražanje v zgodnjem obdobju zdravljenja više kot v pozmem. Pri kombiniranem zdravljenju z ATO+LOS se je z večanjem izražanja *NOS3* povečeval RELAKS ($p=0,002$) in dokazali smo pozitivno korelacijo med nivojem izražanja *NOS3* in RELAKS ($p=0,016$). Ob enem

smo ne glede na vrsto zdravljenja dokazali pozitivno korelacijo med izražanjem *NOS3* v aorti in RELAKS ($p=0,022$).

Izsledki naše raziskave nakazujejo za žile zaščitne pleiotropne učinke statinov, antagonistov tipa 1 receptorjev za angiotenzin II in ACE-inhibitorjev ter njihovih kombinacij, v subterapevtskih odmerkih, ki so posredovani preko aktivacije *NOS2* in *NOS3*.

ABSTRACT

Statins, antagonists of receptors for angiotensin II and ACE inhibitors also have, besides their basic influence, an additional pleitropical influence, which leaves a stimulative effect on cardiovascular system. These influences are also present at subtherapeutical dosages of the drugs. The main goal of our thesis was to determine how the subtherapeutical dosages (doses) of atorvastatin (ATO), losartan (LSO), perindopril (PER), and their combinations effect the expressing of inducible synthesis of a nitrogen's oxide (*NOS2*), and endothelial synthesis of nitrogen's oxide (*NOS3*), and further connectivity of both genes with contraction, and relaxation of aorta during the treatment of rats. The expression of *NOS2* and *NOS3* in thoracal aortas among the sixtyone of grown up Wistar rats, that were 4, 6, 8 or 10 weeks treated by low dosages of ATO (2 mg/kg) or LOS (5 mg/kg) or PER (0,6 mg/kg) or the combinations of ATO + LOS and ATO + PER of the same dosages within the control groups that were not drugtreated, was measured with the method of quantitative PCR in real time. Contractility or dilatation of the aorta were evaluated by measuring the percentage of the maximum possible constriction (KONSTR) relative to the maximum of constriction induced by KCl. After that we have the rings were washed, shrink vessels again, this time with phenylephrine and measured the percentage of relaxation (relaxation) after the addition of the endothelium-dependent vasodilator acetylcholine. For a better statistical evaluation of results the 4th and 6th week of treatment (the early stage) and the 8th and 10th week of treatment (the latter stage) were combined.

While using ATO treatment, the samples with smaller KONSTR had a higher level of expression of *NOS2* ($p=0.05$). At the same time in that group we have noticed a marginally negative correlation between expressing *NOS2* and KONSTR ($p=0,074$). In general, the expression of *NOS2* did not differ even between different periods of duration of treatment, nor between the different types of treatment. But when we compared the individual groups of treatment, we notice the difference in the expression of *NOS2* between the control group and the group receiving the combination of ATO+PER ($p = 0.042$). The group of animals that was on PER had, in its early stages of treatment, marginally significant higher expressions of *NOS3* ($p=0,059$). We have also noticed that the time of treatment marginally statistically influenced the effect of expression of *NOS3* ($p=0,056$), and was higher in the early stage of

treatment. Different approaches to treatment haven't had a statistically important influence on the expressing of *NOS3*. By increasing RELAKS, the level of expressing *NOS3* ($p=0,002$) increased as well during the ATO+LOS treatment. Therefore we have proven the positive correlation between the level of expressing *NOS3* and RELAKS ($p=0,016$). We have also proven a positive correlation between expressing *NOS3* in aorta and RELAKS ($p=0,022$) regardless of the difference in treatment.

The results of our study indicate pleiotropic and protective vascular effects of statins, angiotensin II receptor antagonists and ACE-inhibitors and their combinations in sub-therapeutic doses, which are expressed as activation of *NOS2* and *NOS3*.

SEZNAM OKRAJŠAV

NOS - sintaza/e dušikovega oksida ali NO-sintaze
NO - dušikov oksid
NADPH - nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfat
 $\text{BH}_4(6R)$ - 5,6,7,8,-tetrahidrobioptierin
FAD - flavinadenindinukleotid
FMN - flavinmononukleotid
Hem - železov protoporfirin IX
tGC - topna gvanilat ciklaza
GTP - gvanozin trifosfat
cGMP - cikličnega gvanidin monofosfata
NOS1 - nevronska NO-sintaza ali nNOS
NOS2 - inducibilna NO-sintaza ali iNOS
NOS3 - endotelijska NO-sintaza ali eNOS
LPS - lipoplisaharidi
GMC - gladke mišične celice
EAH - esencialna arterijska hipertenzija
HMG-CoA reduktaza - 3-hidroksi-3-metilglutaril-koencim A reduktaza
ACE - angiotenzinska konvertaza
ARB - antagonist receptorja tipa 1 za angiotenzin II (ARB, angl.: angiotensin receptor blocker)
AT₁-receptor - receptor za angiotenzin II tipa 1
LDL - lipoproteini nizke gostote (LDL, angl.: low density lipoproteins)
cDNA - komplementarna deoksiribonukleinska kislina DNA
(cDNA, angl.: complementary deoxyribonucleic acid)
RNA - ribonukleinska kislina (RNA, angl.: ribonucleic acid)
qPCR - kvantitativni PCR (qPCR, angl.: quantitative polymerase chain reaction)
KONSTR - odstotek največje možne kontstrikcije
RELAKS - odstotek največje možne relaksacije
ATO - atorvastatin
LOS - losartan
PER - perindopril
ATO+LOS - atorvastatin + losartan
ATO+PER - atorvastatin + perindopril

SEZNAM SLIK IN PREGLEDNIC

Slika 1: Tvorba NO s katalizo NOS in delovanje NO na tGC

Slika 2: Zgradba NOS in njeno delovanje

Slika 3: Lokacija *NOS2* na človeškem kromosomu 17

Slika 4: Podganji kromosom 10 NC_005109.2 z lokacijo *NOS2*

Slika 5: Lokacija *NOS3* na človeškem kromosom 7

Slika 6: Podganji kromosom 4 NC_005103.2 z lokacijo *NOS3*

Slika 7: Strukturna formula atorvastatina

Slika 8: Strukturna formula perindoprila

Slika 9: Strukturna formula losartana

Slika 10: Delovanje hidrolizirajočih »TaqMan« sond

Slika 11: Primer standardne krivulje za *HMBS*

Slika 12: Izražanja *NOS2* po tednih v skupinah z različnimi vrstami zdravljenja in v kontrolni skupini

Slika 13: Izražanja *NOS3* po tednih v skupinah z različnimi vrstami zdravljenja in v kontrolni skupini

Slika 14: Izražanje *NOS3* po časovnih obdobjih pri zdravljenju s perindoprilom

Slika 15: Vpliv izražanja *NOS2* na odstotek največje konstrikcije pri zdravljenju z atorvastatinom

Slika 16: Vpliv izražanja *NOS3* na odstotek največje relaksacije pri kombiniranem zdravljenju z atorvastatinom in losartanom

Slika 17: Korelacija med nivojem izražanja *NOS2* in odstotkom največje možne konstrikcije torakalne aorte pri zdravljenju z atorvastatinom

Slika 18: Korelacija med nivojem izražanja *NOS3* in odstotkom največje relaksacije torakalne aorte ne glede na vrsto zdravljenja

Slika 19: Korelacija med nivojem izražanja *NOS3* in odstotkom največje relaksacije torakalne aorte pri kombiniranem zdravljenju z atorvastatinom in losartanom

Preglednica I: NO - sintaze

Preglednica II: Reagenčni kompleti oligonukleotidnih začetnikov in sond

Preglednica III: Redčitve standardov za pripravo standardnih krivulj za *NOS2* in *HMBS*

Preglednica IV: Redčitve standardov za pripravo standardnih krivulj za *NOS3* in *HMBS*

Preglednica V: Sestava končne reakcijske zmesi za eno reakcijo, za določanje nivoja izražanja *NOS2* in *HMBS*

Preglednica VI: Sestava končne reakcijske zmesi za eno reakcijo, za določanje nivoja izražanja *NOS3* in *HMBS*

Preglednica VII: Pogoji reakcije PCR

Preglednica VIII: Primerjava izražanja *NOS2* po vrstah zdravljenja v odvisnosti od časa trajanja zdravljenja (enofaktorska Anova)

Preglednica IX: Primerjava izražanja *NOS3* po vrstah zdravljenja v odvisnosti od časa trajanja zdravljenja (enofaktorska Anova)

Preglednica X: Rezultati dvofaktorske Anova-e za izražanje *NOS2*

Preglednica XI: Analiza vpliva vrste zdravljenja na izražanje *NOS2* in *NOS3* (dvofaktorska Anova)

Preglednica XII: Analiza vpliva časa trajanja zdravljenja na izražanje *NOS2* in *NOS3* (dvofaktorska Anova)

Preglednica XIII: Povprečja faktoriranih in logaritmiranih vrednosti izražanja *NOS2/HMBS* v podskupinah v zgodnjem in pozrem obdobju zdravljenja ter skupno povprečje

Preglednica XIV: Rezultati dvofaktorske Anova-e za izražanje *NOS3*

Preglednica XV: Povprečja faktoriranih in logaritmiranih vrednosti izražanja *NOS3/HMBS* v podskupinah v zgodnjem in pozrem obdobju zdravljenja ter skupno povprečje

Preglednica XVI: Izražanje *NOS2* v odvisnosti od **KONSTR** pri različnih vrstah zdravljenja (enofaktorska Anova)

Preglednica XVII: Izražanje *NOS2* v odvisnosti od **RELAKS** pri različnih vrstah zdravljenja (enofaktorska Anova)

Preglednica XVIII: Izražanje *NOS3* v odvisnosti od **RELAKS** pri različnih vrstah zdravljenja (enofaktorska Anova)

Preglednica XIX: Izražanje *NOS3* v odvisnosti od **KONSTR** pri različnih vrstah zdravljenja (enofaktorska Anova)

Preglednica XX: Koeficienti korelacije med izražanjem *NOS2* oz. *NOS3* in **KONSTR** oz. **RELAKS** (živali združene ne glede na vrsto zdravljenja)

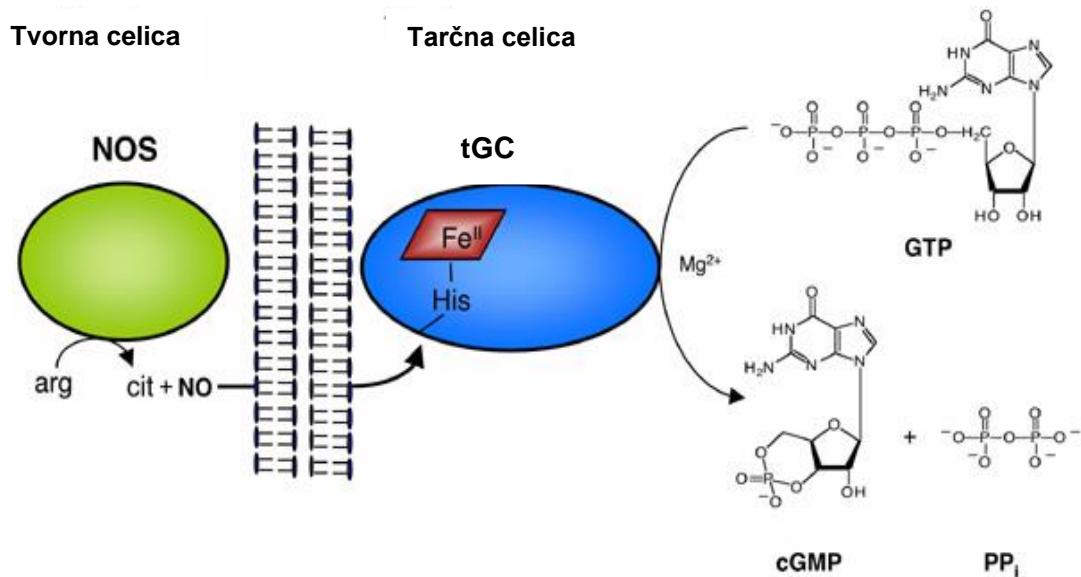
Preglednica XXI: Koeficienti korelacije med izražanjem *NOS2* in **KONSTR** oz. **RELAKS** pri različnih vrstah zdravljenja

Preglednica XXII: Koeficienti korelacije med izražanjem *NOS3* in **KONSTR** oz. **RELAKS** pri različnih vrstah zdravljenja

1. UVOD

1.1. SINTAZE DUŠIKOVEGA OKSIDA

Encimi sintaze dušikovega oksida (NOS ali NO-sintaze), sestavljajo družino flavohemskih encimov, ki so odgovorni za encimatsko tvorbo radikala dušikovega oksida (NO) (1,2). V več stopnjah katalizirajo pretvorbo substrata, aminokisline L-arginin, v dušikov oksid in L-citrulin ob prisotnosti kisika (O_2) in nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfata (NADPH). Pri pretvorbi so udeleženi tudi kofaktorji, in sicer: (6R)-5,6,7,8,-tetrahidrobioptierin (BH_4), flavinadenindinukleotid (FAD), flavinmononukleotid (FMN) in železov protoporfirin IX (hem). Kot intermediat v procesu dvostopenjske oksidacije nastane N₃-hidroksi-L-arginin. Če se nastali NO veže na hemsko železo topne gvanilat ciklaze (tGC), povzroči tako konformacijsko spremembo tega encima, da se, če je prisoten substrat gvanozin trifosfat (GTP) 400-krat poveča hitrost nastajanja znotrajceličnega prenašalca cikličnega gvanidin monofosfata (cGMP). Ob tem nastaja tudi pirofosfat (PP_i) (Slika 1) (1,2,3).



Slika 1: Tvorba NO s katalizo NOS in delovanje NO na tGC (4)

Pri sesalcih so identificirali tri različne izoformne oblike encimov (1). Ti encimi so produkt različnih genov, razporejenih na različnih lokacijah. So različno uravnavani, imajo različne katalitične lastnosti in občutljivosti na inhibitorje. Ko so vse tri tipe NOS izolirali, prečistili in klonirali cDNA vseh treh oblik ter jo sekvenirali, in predstavili kodiranje

funkcionalnih encimov so ugotovili, da so si podobne. Po zgradbi imajo več kot 50% homolognost v primarni sekvenci (1,5). Izoformne oblike NOS so identificirali v različnih vrstah celic. Poimenovali so jih po vrsti celic, v katerih so posamezno izoformno obliko encima najprej odkrili ali po pogojih, v katerih so jo odkrili (2).

Prvo NO-sintazo so našli in identificirali v živčnem tkivu in jo poimenovali **nevronška NO-sintaza (nNOS)** ali **NOS1**. Encim nastaja v nekaterih celicah v perifernem in centralnem živčevju. Pojavlja se v telesih živčnih celic, dendritih in na koncu aksonov. NOS1 so našli tudi v skeletnih mišicah (6). Nastaja kot konstitutiven encim v citoplazmi. Za aktivacijo encima je potreben porast koncentracije Ca^{2+} . NO, ki nastane s katalizo NOS1 deluje kot nevrotransmiter. V perifernem živčevju povzroča relaksacijo gladkih mišic, prav tako v stenah žil, v prebavnih sfinktrih prebavil, v žolčniku in mehurju, v gobastem tkivu in dihalnih poteh. Ima tudi vlogo pri erektilni funkciji. V centralnem živčevju sodeluje pri vedenju, ravnotežju, procesih pomnenja, koordinaciji gibov. V skeletnih mišicah zavira krčljivost (6,7). NOS1 je udeležena tudi v patofizioloških procesih v organizmu (6).

Naslednja izoformna oblika NOS je **inducibilna NO-sintaza (iNOS)** ali **NOS2**. Nastaja v aktiviranih neutrofilcih, astrocitih, hepatocitih, fibroblastih, žilnem gladkem mišičju in endotelijskih celicah, kot odgovor na patološki stimulus (6).

Tretjo izoformno obliko NOS pa so odkrili v endotelijskih celicah žil, poimenovali so jo **endotelijkska NO-sintaza (eNOS)** ali **NOS3**. Nahaja se tudi v srčnih miocitih, ledvičnih mezanglijskih celicah in v manjši količini še v drugih celicah (6).

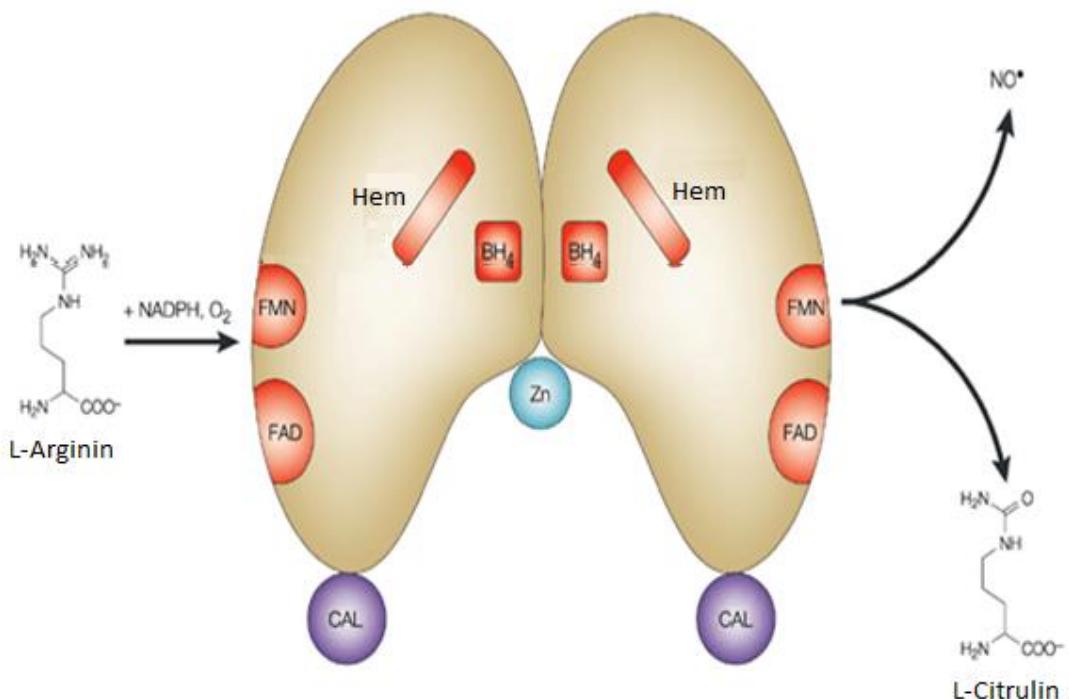
Preglednica I: NO - sintaze

	NOS1 (nNOS)	NOS2 (iNOS)	NOS3 (eNOS)
1.mesto nahajanja (tkivo)	živčno tkivo, skeletne mišice	celice imunskega sistema (makrofagi,...) in tudi nekatere druge celice (srčnožilni sistemi)	endotelijske celice (srčnožilni sistem)
2.koncentracija sproščanja	sprošča sev μM konz.(8)	ob stimulaciji so količine sproščanja in aktivnost 100-1000- krat večje večje kot pri NOS1 in NOS3 (9)	sprošča se v μM konc. (8)
	NO* proizvaja v nM konz.(<100 nM) odvisno od vrste celic** in pogojev mikrookolja*** (10)	proizvaja velike količine NO*(>1 μM) (odvisno od vrste celic** in obsega stimulacije)(10)	NO* proizvaja v nM konz. (< 100 nM) odvisno od vrste celic** in pogojev mikrookolja*** (10)
3.lokacija in oznaka gena (pri človeku)	Kromosom 12 lokacija:12q24.22 NC_000012.11 (117,645,921- 117,799,607 bp) (11)	Kromosom 17 lokacija:17q11.2-q12 NC_000017.10 (26,083,722-26,127,555 bp) (12)	Kromosom 7, Lokacija:7q36 NC_0000017.13 (150,688,083- 150,771,687 bp) (13)
4.primarna funkcija proizvedenega NO	celična komunikacija (nevrotansmitter)	imunska obramba pred mikroorganizmi	vazodilatacija
5.način aktivacije (kalmodulin/konz. Ca^{2+})	aktivacija je odvisna od konc. Ca^{2+} (povečana konc. Ca^{2+} - vezava kalmodulina- aktivacija encima)	aktivacija ni odvisna od konc. Ca^{2+} - kalmodulin ima vezan že pri normalni konc. Ca^{2+}	aktivacija je odvisna od konc. Ca^{2++} (povečana konc. Ca^{2+} - vezava kalmodulina- aktivacija encima)
6.izražanje (vezava kalmodulina)	konstitutivno $(\sim 30 \times 10^{-9} M)$ (14)	po stimulaciji zbakterijskimi LPS in citokini vnetja $(> 30 \times 10^{-9} M)$ (14)	konstitutivno $(\sim 30 \times 10^{-9} M)$ (14)

NO*: gre za konc. NO, ki jo sproščajo encimi (NO, ki nastaja po drugih puteh ni zajet)
vrsta celic**: tkivni izvor celic (kardiomiociti, endotelijske celice žilja, živčne celice,...)
pogoji mikrookolja***: prisotnost inhibitorjev, konc. O_2 , količina L-arginina,...

Vse izoformne oblike NOS so sestavljene iz dveh podenot (monomer). Katalitično aktivne postanejo z dimerizacijo teh dveh podenot (1,2). Pri evkariontih vsaka podenota vsebuje dve glavni regiji: na amino koncu N-terminalno oksigenazno domeno, ki pripada razredu hem-tiolatnih proteinov in na karboksilnem C koncu diflavin reduktazno domeno, ki je homologna za NADPH: citokrom P450 reduktazo (EC1.6.2.4.) in ostale flavoproteine (1). Ob združitvi obeh podenot (Slika 2) se ob hemskem železu tvorita vezavni mesti z visoko afiniteto za L-arginin in nujen kofaktor tetrahidrobioptierin (BH_4). Ko se to zgodi, je omogočen prenos elektronov od flavina v reduktazni domeni do hema v oksigenazni domeni (1,2). Ključno vlogo pri stabilizaciji dimernega kompleksa ima cinkov ion (Zn^{2+}) v

kompleksu s štirimi tiolnimi skupinami. BH₄ poleg predpostavljene redoks funkcije dodatno stabilizira kvartarno strukturo dimera s tvorbo dodatnih vodikovih vezi (1).



Slika 2: Zgradba NOS in njen delovanje (2)

Obe domeni povezuje kompleks Ca²⁺-kalmodulin (7). Oksigenazna domena vsebuje vezavna mesta za hem in BH₄. Reduktazna domena veže Ca-kalmodulin, FMN, FAD in NADPH. Na vezan kalmodulin (CAL) aktiviran encim katalizira oksidacijo L-arginina. Flavini sprejemajo elektrone iz NADPH in jih prenesejo na hemsko železo, ki veže O₂ in postopoma katalizira oksidacijo L-arginina v NO in L-citrulin. V citoplazmi endotelijskih celic je L-arginin navadno prisoten v presežku, zato je hitrost produkcije NO določena z aktivnostjo encima. Nastali NO hitro propade, v nekaj sekundah v krvi ali v nekaj minutah v zdravih tkivih (1,2).

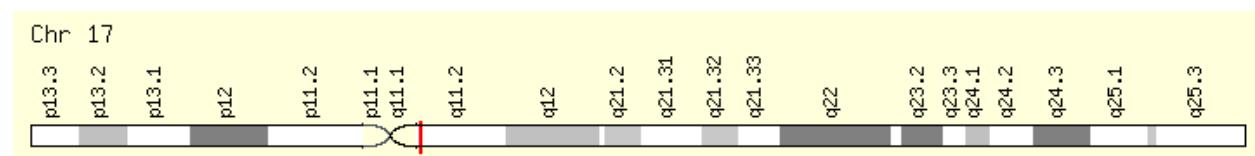
Aktivnost je odvisna tudi od vezave kalmodulina. Vezava kalmodulina poveča hitrost prenosa elektronov iz reduktazne na oksigenazno domeno. Pri NOS2 je kalmodulin tesno vezan, kar domnevno poveča pretok elektronov iz reduktazne v oksigenazno domeno. Pri NOS1 in NOS3 pa je vezava kalmodulina odvisna od koncentracije Ca²⁺, zato je od koncentracije Ca²⁺ odvisna tudi njuna aktivnost (2,3).

Regulacija sinteze NO s kofaktorji in kalcijem, ki aktivirajo NOS se lahko spremeni s post-translacijskimi modifikacijami in z interakcijami protein-protein. Na primer aktivnost NOS3 se poveča s fosforilacijo aminokisline Ser1179 in je inhibirana ob interakciji z membranskim proteinom kaveolinom-1 (1,2). Dodatno je aktivnost regulirana preko negativne povratne zveze z NO, ki encim inhibira (1). NO, ki nastane, se lahko veže na hemsko železo (Fe) v oksigenazni domeni NOS in prepreči vezavo O₂. Za ta mehanizem regulacije sta bolj dovetni NOS1 in NOS3, pri NOS2 ima kompleks Fe-NO manjšo stabilnost. NO in O₂ tekmujeta za isto vezavno mesto na hemu, zaradi tega predstavlja NOS tako senzor kot regulator za O₂ pri uravnavanju pretoka krvi in oskrbi tkiv s kisikom (1).

1.1.1. NOS2 - inducibilna NO-sintaza

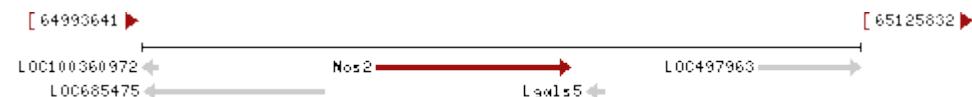
Inducibilna NO-sintaza 2 (NOS2, NOSII ali NOS2A) ima klasifikacijsko številko EC 1.14.13.39. Njeni alternativni imeni sta hepatocitna NOS (HEP-NOS) in inducibilna NOS (iNOS). Encim je peptidil-cistein S-nitrozilaza (15,16).

NOS2 se pri človeku nahaja na 17 kromosому (17q11.2-q12), (17q11.2) (17q11.2-q12) (Slika 3). Trije sorodni psevdogeni so locirani znotraj regije 17 kromosoma, kjer se nahajajo tudi geni za Smith-Magenis sindrom (12,15,16,17). *NOS2* ima velikost 37 kb, sestavljen je z 26 eksonov in 25 intronov (18).



Slika 3: Lokacija *NOS2* na človeškem kromosomu 17 (12)

Pri podganah se *NOS2* nahaja na 10 kromosomu na lokusu 10q25 (Slika 4). Podganji kromosom 10:RGSC3.4 - chr10:65036884..65072453 (35.57 kb) (8,11).



Slika 4: Podganji kromosom 10 NC_005109.2 z lokacijo *NOS2* (17)

NOS2 so najprej izolirali iz aktiviranih makrofagov (19). Praviloma ni izražena v zdravih, počivajočih oziroma normalno aktivnih celicah. Najdemo jo v citoplazmi (19). Nastaja v aktiviranih nevtrofilcih, makrofagih, astrocitih, hepatocitih, fibroblastih, žilnem gladkem mišičju in endotelijskih celicah, kot odgovor na patološki stimulus (19). Encim NOS2 se nahaja v jetrih, retini, kostnih celicah in epitelijskih celicah pljuč. V trombocitih ga ne najdemo (15). Izraža se tudi v celicah, ki niso neposredno udeležene pri obrambi organizma in v odsotnosti mikroorganizmov (6). Encim je induciran z bakterijskimi lipoplisaharidi (LPS) in/ali citokini, ki se sintetizirajo kot odgovor na bakterijske LPS (20). Obstajajo vrstno-, tkivno-, in celično- specifični pogoji za indukcijo izražanja aktivne oblike NOS2. Promotorska regija gena za NOS2 se med vrstami zelo razlikuje. Te razlike so funkcionalno pomembne, ker je veliko težje inducirati izražanje aktivne oblike NOS2 v humanih celicah v *in vitro* pogojih v primerjavi z globalkimi celicami (15). Za indukcijo izražanja NOS2 pri miših in podganah zadošča inkubacija le z enim od naštetih in sicer z: interlevkinom-1 β (IL-1 β) ali interleukinom-6 (IL-6) ali tumor nekrotizirajočim faktorjem α (TNF- α) ali z drugimi, ki se sproščajo kot odgovor na bakterijske LPS. Med tem, ko je pri večini človeških celic za indukcijo izražanja NOS2 potreben kompleks citokinov (18,19,21). Indukcijo inhibirajo glukokortikoidi in več citokinov (npr. TGF β). Poleg tega se preko negativne povratne zanke inhibira tudi sam NO (21).

NOS2 je regulirana s kompleksom kalcij/kalmodulin. Za aktivacijo je potrebna dimerizacija dveh homodimer. Dimera NOS2, ki nastane, je aktivna takoj, ko je inducirana. Kalmodulin ima tesno vezan, že pri normalni koncentraciji Ca $^{2+}$, zato ni odvisna od znotrajcelične koncentracije Ca $^{2+}$. Ko je NOS2 enkrat inducirana, indukcija traja več ur. Sintetizira ogromne količine NO, v nanomolarnih koncentracijah. Njena aktivnost je do 1000-krat večja kot aktivnost NOS1 in NOS3 (20).

NO, ki ga sintetizira NOS2 je pomemben pri odstranjevanju ali obrambi pred protozoji, bakterijami, glicicami, virusi in rakavimi celicami ter pri uravnavanju tvorbe citokinov (6). Hkrati pa je, ker nastaja v velikih količinah, toksičen tudi za lastne celice (2,6). Pri septičnem šoku v velikih količinah povzroči obsežno, na vazokonstriktorje odporno vazodilatacijo in povečano permeabilnost, kar je resna motnja v delovanju organizma. Endotoksini inducirajo NO sintezo v miokardu, endokardu in venah, kar dodatno prispeva k disfunkciji srca in zmanjšanem tonusu žil (6).

Študije na miših z okvarjenim *NOS2* in posledično kompletno izgubo encima *NOS2* ali s premajhno aktivnostjo encima *NOS2* so pokazale še druge fiziološke vloge *NOS2*. Te so: v osteoklastni resorpciji kosti, pri celjenju kožnih ran in črevesne sluznice, prav tako je kot mediator vključena v mehanizme, ki ščitijo srce pred letalno ishemijo. *NOS2* je udeležena pri nastanku vnetja in pri odstranjevanju njegovih posledic (2,6).

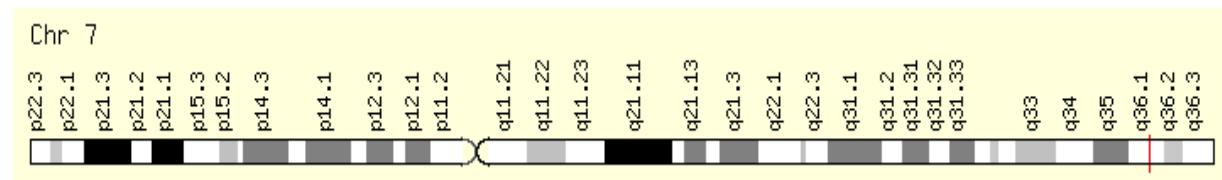
Inducirana sinteza NO, posredovana preko žil, med sepo deluje protektivno v organih, kot so jetra, ledvice in črevesje. Škodljivo pa je lahko tudi povečano izražanje *NOS2* v gladkih mišičnih celicah (GMC) in endotelijskih celicah, saj posledično povečano nastajane NO vodi v intentivno vazodilatacijo in hipotenzijo. Študije na živalih so pokazale, da *NOS2* doprinese k vaskularnemu kolapsu pri septičnem šoku. Veliko živalskih modelov je pokazalo, da ima kronično lokalizirano izražanje *NOS2* škodljive vplive. Naključna izražanja *NOS2* pri nevrodegenerativnih boleznih povezujejo NO s patogenezo multiple skleroze in drugimi demielinizacijami centralnega živčnega sistema (18).

1.1.2. *NOS3* - endotelijska NO-sintaza

Endotelijska dušikov oksid sintaza 3 (*NOS3* ali *NOSIII*) ima klasifikacijsko številko EC 1.14.13.39. Njeno alternativno ime je endotelijska NOS (eNOS) zasledimo tudi poimenovanje konstitutivna NOS (angl.: constitutive NOS - cNOS). Poznana je tudi pod oznako ecNOS. Encim je peptidil-cistein S-nitrozilaza (13,16,18.).

Gen *NOS3* se pri človeku nahaja na 7 kromosomu (7q36), (7q36.1), (7q36) (Slika 5) (19).

Človeški *NOS3* ima velikost 21 kb, sestavljen je iz 26 eksonov in 25 intronov (18).



Slika 5: Lokacija *NOS3* na človeškem kromosom 7 (13)

Pri podganah se gen *NOS3* nahaja na kromosomu 4 na lokusu (4q11) (Slika 6). Podganji kromosom 4: RGSC3.4 – chr4:6158847.6179441 ima 20.59 kb (22).



Slika 6: Podganji kromosom 4 NC_005103 z lokacijo *NOS3* (22)

Encim NOS3 so najprej izolirali iz endotelijskih celic aorte goveda. Najdemo jo v kardiomiocitih, hepatocitih, trombocitih, GMC žil, epitelijskih celicah pljuč, osteoblastih, osteoklastih in drugje. V največji meri nastaja ob celični membrani v žilnih endotelijskih celicah in srčnih miocitih (19).

NOS3 je konstitutivno izražena, njeni aktivacijski uravnava znotrajcelična koncentracija Ca^{2+} , ki se veže na kalmodulin. V nadaljevanju se ta kompleks veže na NOS in povzroči aktivacijo encima. Encim se aktivira ob povišanju koncentracije Ca^{2+} , do katere pride zaradi vezave liganda – acetilholina, bradikinina, histamina ob cirkulatornem stresu (7). NOS3 je vezana na membrano preko miristinske in palmitinske kisline. Membranska “sidra” organizirajo NOS3 v bližini kaveol, kjer se nahajajo proteini kaveolini, ki vplivajo na aktivnost membransko vezanih proteinov. V primeru nizke koncentracije Ca^{2+} se kaveolin-1 veže in inhibira NOS3. V primeru visoke koncentracije Ca^{2+} , kalmodulin veže Ca^{2+} in kaveolin-1 disocira. V kalveolah se nahaja arginin, substrat za sintezo NO (7).

NO, katerega tvorbo katalizira NOS3 v epiteliju srčnožilnega sistema, ima pomembno vlogo, da ohranja gladke mišice v stenah žil sproščene, da zavira adhezijo trombocitov in levkocitov ter zavira razmnoževanje GMC. Stimulira angiogenezo ter proliferacijo in migracijo celic. Inhibira apoptozo ter vpliva na metastaziranje. NO regulira izražanje žilno endotelijskega rastnega dejavnika (2,6). Kratka življenska doba NO je razlog, da NO sproščen iz NOS3 aktivira le sebi bližnje tarčne sisteme (6).

NO difundira iz endotelijskih celic v GMC, ki so pod endotelijem žil. V citosolu aktivira tGC, in katalizira nastanek cGMP, ki aktivira proteinsko kinazo G. Protein kinaza G fosforilira Ca^{2+} kanale in receptorje. V nadaljevanju pride do inhibicije prehoda Ca^{2+} v celico in s tem zmanjšanja koncentracije Ca^{2+} v celici ter relaksacije miozinskih vlaken, nastopi vazodilatacija (2,6). Nekatere od teh učinkov so potrdili tudi na živalskih modelih. Z dodatki inhibitorjev NOS3 so povzročili vazokonstrikcijo in posledično hipertenzijo ter zaradi aktivacije trombocitov tudi pospešeno aterosklerozo (2,6). Z raziskavami na miših s pomanjkanjem NOS3 so ugotovili, da imajo takšne živali hipertenzijo. Njihove GMC se na

žilno poškodbo odzovejo s povečano stopnjo obnavljanja, poleg tega so takšne živali bolj dovzetne za aterosklerozo in razvoj anevrizem (2,6). Aktivnost NOS3 lahko povzroči tudi patofiziološke procese (2).

NO, ki ga proizvaja NOS3 zavira z α -adrenoreceptorji izzvano kontraktilnost preko učinkov na L-tip Ca^{2+} kanale in s tem zmanjšuje aktivnost srca (6,2). NO, ki ga v začetku vnetnega procesa proizvede NOS3, verjetno deluje v smeri zmanjšanja in omejitve vnetja z zaviranjem aktivacije levkocitov in agregacije trombocitov ter z vazodilatacijo (2,6). Izražanje NOS3 je uravnavano s spolnimi hormoni, zato se kompenzacijski mehanizmi med spoloma razlikujejo (2).

1.2. SRČNOŽILNE BOLEZNI POVEZANE Z DUŠIKOVIM OKSIDOM

Srčnožilne bolezni so, kljub dobro razviti preventivi in nenehnemu izboljševanju strategij zdravljenja, eden od glavnih vzrokov za obolenost in umrljivost v razvitih državah. Pri razvoju številnih srčnožilnih bolezni (pri aterosklerozi in trombozi, arterijski hipertenziji, koronarni srčni bolezni,...), igra pomembno vlogo prizadetost nastajanja NO (23,24). Zmanjšano sproščanje NO in njegova oslabljenja bioaktivnost, do katere pride zaradi interakcije s superoksidnim anionom, ima osrednjo vlogo pri patofiziološkem stanju, pri katerem okvarjene endotelijske celice spodbujajo vazokonstrikcijo, vnetje, trombozo, in proliferacijo GMC. To stanje imenujemo endotelijska disfunkcija in povzroči morfološke in funkcionske spremembe žilnega endotelija, ki privedejo do nastanka srčnožilnih bolezni. Endotelijsko disfunkcijo v največji meri neposredno povzroča oksidativni stres (24,25).

Arterijska hipertenzija je v razvitem svetu najpogosteša bolezen obtočil. Najpogosteša je esencialna arterijska hipertenzija (EAH), ki je eden od pomembnejših dejavnikov tveganja za nastanek srčnožilnih bolezni in njihovih posledic (25,26). Etiopatogeneza EAH ni popolnoma pojasnjena. Večina raziskovalcev meni, da je za zmanjšano izločanje NO pri arterijski hipertenziji v največji meri odgovorna prirojena ali pridobljena zmanjšana aktivnosti NO-sintaz. Potrdili so obstoj naravnega zaviralca NO-sintaz, to je asimetrični dimetilarginin, ki je lahko ena od možnih razlag slabšanja endotelijske funkcije pri EAH. Pri ustaljeni EAH je lahko razlog za zmanjšano sposobnost dilatacije: - pomanjkanje substrata za tvorbo NO, - inaktivacija NO zaradi prostih kisikovih radikalov, - oviran prehod NO do GMC, - okvarjen odgovor GMC na vazodilatoren dražljaj in povečana

tvorba vazokonstriktivnih dejavnikov (angiotenzin-II, endotelin-1) (25). EAH pogosto spremljajo tudi motnje v presnovi maščob in sladkorja, motnje hemostaze in viskoznosti krvi ter kronično subklinično vnetje (zvišana koncentracija C-reaktivnega proteina, dejavnika tumorske nekroze α , interlevkina-6) (25). Posledica hipertenzije je prizadetost: - večjih žil (ateroskleroza), - srca (hipertrofija in diastolična disfunkcija levega prekata, zmanjšana koronarna rezerva) in ledvic (nefroskeroza) (25).

Različne študije nakazujejo, da igra NO v pljučnem žilu ključno vlogo pri odgovoru na hipoksijo. Hipoksija zmanjša prepisovanje *NOS3* in produkcijo NO preko transkripcijskih in potranskripcijskih mehanizmov. Dodatno so pri pacientih s portalno hipertenzijo opazili, da imajo manj *NOS3* mRNA in proteinov (5).

Arterijska hipertenzija sodi med najpomembnejše dejavnike tveganja za razvoj ateroskleroze. Ateroskleroza je kronična degenerativna bolezen velikih in srednje velikih arterij elastičnega in mišičnega tipa, za katero je značilno progresivno kopiranje lipidov, veziva, netopnih kalcijevih soli in celičnih ostankov v intimi ter spremljajoče vnetje (26,27). Laminarni tok v arterijski steni spodbuja izražanje nekaterih genov, kot sta npr. gen za superoksid-dismutazo in gen za NO-sintazo (25,28). Aterosklerotične žile sproščajo manj NO kot zdrave oziroma normalne. Endotelijalne celice so na mestih z aterosklerotičnimi plaki vir superoksidnega aniona, ki lahko reagira z NO in tvori peroksinitrit, ki je lahko lokalno toksičen (5). Velik dejavnik tveganja za nastanek ateroskleroze so dislipidemije in motnje metabolizma maščob. Ob tem ima pomemben vpliv oksidativni stres (27,28).

Arterijska hipertenzija in ateroskleroza v veliki meri doprineseta k razvoju bolezni srca. Ateroskleroza je v večini primerov vzrok za ishemično bolezen srca. Ishemično bolezen srca razdelimo na različne klinične oblike: angina pectoris, akutni miokardni infarkt in ishemično miokardiopatijo (29). Pri EAH se prizadetost srca pojavlja zelo pogosto in včasih tudi zelo zgodaj. Neposredna posledica zvišanega krvnega tlaka je hipertenzivna srčna bolezen. Zanjo je značilna sprememba diastolične funkcije levega prekata, hypertrofija levega prekata in zmanjšana koronarna rezerva. Posredna posledica hipertenzije, za katero je značilna aterosklerotična zožitev epikardnih arterij, je koronarna bolezen. Vse navedene spremembe na srcu se med seboj prepletajo in privedejo do miokardnega infarkta in zastojne srčne odpovedi (25).

1.3. ZDRAVLJENJE SRČNOŽILNIH BOLEZNI

Zdravljenje srčnožilnih bolezni je v prvi vrsti usmerjeno v odpravljanje dejavnikov tveganja, predvsem dislipidemije in arterijske hipertenzije. Ker je dejavnikov tveganja več, imamo posledično več prijemališč za zdravljenje oziroma odpravljanje teh dejavnikov. Zdraviti je potrebno hiperholosterolemijo, arterijsko hipertenzijo in srčno mišico. Poleg tega je potrebno zmanjševati oksidativni stres in disfunkcijo endotelija (25).

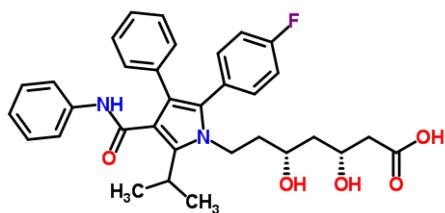
Za zniževanje vrednosti lipidov v krvi je na voljo več vrst antihiperlipemikov. V našem delu smo proučevali vpliv zaviralca3-hidroksi-3-metilglutaril-koencim A reduktaze (HMG-CoA reduktaza) - atorvastatina. Ravno tako obstaja več vrst zdravil za zniževanje krvnega tlaka. V našem delu smo proučevali vplive dveh vrst antihipertenzivov in sicer inhibitorja angiotenzinske konvertaze (ACE-inhibitorja) perindoprilja in antagonista receptorjev tipa 1 za angiotenzin II (ARB, angl.: angiotensin receptor blocker), losartana. Za vse naštete skupine zdravil je značilno, da imajo poleg svojih osnovnih učinkov še dodatne pleiotropne učinke, ki učinkujejo neodvisno od osnovnih učinkov zdravil in ugodno vplivajo na srčnožilni sistem.

V okviru pleiotropnih učinkov statini s pozitivnim uravnavanjem NOS3 v endotelijskih celicah povečajo nastajanje in biološko uporabnost NO. S tem izboljšajo delovanje endotelija (24,30). Delujejo protivnetno in pozitivno vplivajo na hemostazo in trombozo (31). V več raziskavah so pokazali, da znižajo vrednosti visoko občutljivega C-reaktivnega proteina (hsCRP) in C-reaktivnega protein (CRP) (31). Statini v okviru pleiotropnih učinkov povečajo stabilnost ateroskerotičnih leh, delujejo zaščitno na srčno mišico in imajo antioksidativno delovanje. Vnos statinov izboljša krvni obtok, zmanjša velikost ishemičnega področja in izboljša delovanje možganov (31). Tudi ACE inhibitorji in ARB niso učinkoviti le pri zniževanju krvnega tlaka. Imajo podobne pleiotropne učinke kot statini, delujejo protivnetno in antioksidativno. Povečujejo biološko razpoložljivost NO in ugodno vplivajo na hipertrofijo levega prekata (32).

1.3.1. Atorvastatin

Atorvastatin (ATO) uvrščamo v farmakoterapevtsko skupino antihiperlipemičnih zdravil med zaviralce HMG-CoA reduktaz, imenovano statini. Njegovo sistematsko (IUPAC) ime

je: (3R,5R)-7-[2-(4-fluorofenil)-3-fenil-4-(fenilkarbamoil)-5-propan-2-ilpirol-1-il]-3,5-dihidroksiheptanojska kislina (33,34).

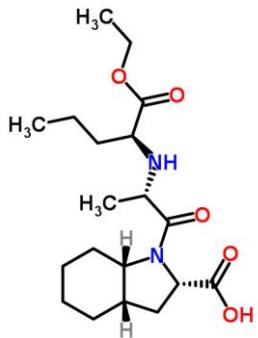


Slika 7: Strukturna formula atorvastatina (34)

Prvenstveno se uporablja za zniževanje serumskih vrednosti holesterola. Poleg osnovnega učinka ima številne, za srčnožilni sistem ugodne, pleiotropne učinke. Zaradi njih se uporablja tudi v sekundarni preventivi kardiovaskularnih bolezni (30). ATO je selektivni kompetitivni inhibitor encima HMG-CoA reduktaze, encima, ki v jetrih zmanjša hitrost pretvorbe 3-hidroksi-3-metil-glutaril-koencima A v mevalonat, ki je predhodnik sterolov, vključno s holesterolom. Zaradi tega se zniža koncentracija holesterola v plazmi in lipoproteinov v serumu. Poleg tega se poveča število jetrnih receptorjev za lipoproteine nizke gostote (LDL, angl.: low density lipoproteins) na površini celic in s tem vstopanje LDL holesterola v celico in njegova razgradnja. Zmanjša se nastajanje LDL in število LDL delcev v obtoku. Obenem pa se močno in dolgotrajno zveča aktivnost LDL-receptorjev (33,35).

1.3.2. Perindopril

Perindopril (PER) spada v farmakoterapevtsko skupino antihipertenzivnih zdravil. Je dolgodelujoči ACE inhibitor (36). Njegovo sistematsko (IUPAC) ime je: (2S,3aS,7aS)-1-[(2S)-2-{[(2S)-1-etoksi-1-oksopentan-2-il]amino}propanoil]-oktahidro-1*H*-indol-2-karboksilna kislina (34).

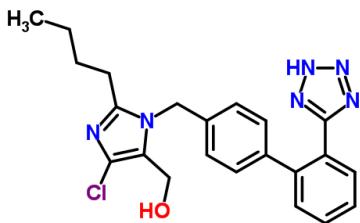


Slika 8: Strukturna formula perindoprila (34)

V največji meri je namenjen zdravljenju blage do srednje hipertenzije in simptomatskega srčnega popuščanja. Učinkovit je pri zaščiti srca po srčnem napadu in pri zmanjševanju tveganja za srčnožilne dogodke pri stabilni koronarni arterijski bolezni ter pri disfunkciji levega prekata, pri ishemični bolezni srca in akutnem miokardnem infarktu. Poleg tega se uporablja za terapijo pri sladkorni bolezni ter pri preprečevanju kroničnih ledvičnih okvar (37,38). Deluje z antiaterogenimi in antiishemičnimi učinki ter zavira preoblikovanje srčne mišice (36). Njegova struktura omogoča, da učinkovito prehaja v žilno steno (36). PER se po oralnem zaužitju v jetrih hitro pretvori v svoj aktivni metabolit perindoprilat (37). Perindoprilat tekmuje z angiotenzinom I za vezavo na ACE in inhibira encimsko proteolizo angiotenzina I v angiotenzin II. Znižan nivo angiotenzia II vodi v znižanje krvnega tlaka z inhibicijo kompresornih učinkov angiotenzina II (37).

1.3.3. Losartan

Losartan (LOS) je antihipertenzivno zdravilo, je nepeptidni antagonist receptorja za angiotenzin II tipa 1 (AT_1 -receptorja) na krvnih žilah in drugem tkivu. Njegovo sistematsko (IUPAC) ime je: (2-butil-4-kloro-1-{[2'-(1*H*-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil}-1*H*-imidazol-5-il)metanol (34).



Slika 9: Strukturna formula losartana (34)

LOS je bil v klinično uporabo za zdravljenje hipertenzije uveden kot prvi predstavnik svoje skupine zdravil. Uporablja se za zdravljenje blage do resne hipertenzije, pri bolnikih, ki so neodzivni na zdravljenje z ACE-inhibitorji in/ali jih ne prenašajo. Namenjen je tudi upočasnjevanju napredovanja diabetične nefropatije ter za zdravljenju srčnega popuščanja (39). LOS je v večih živalskih modelih povzročil zmanjšanje stopnje umrljivosti pri živalih, ki so bile nagnjene h kapi, ter preprečil fibrinoidno nekrozo drugih organov vključno s srcem (40). Bolniki s hipertenzijo, ki so prejemali LOS, so med jemanjem zdravila ohranjali ledvično funkcijo nespremenjeno. LOS je zmanjšal proteinurijo, tudi tisto povezano z ledvičnim popuščanjem ali z od inzulina neodvisnim diabetesom. Med aplikacijo LOS so vrednosti lipidov, lipoproteinov in prostaglandinov ostale nespremenjene (40). LOS inhibira vezavo angiotenzina II tako, da se selektivno, kompetitivno in z visoko afiniteto veže na AT₁-receptorje v mnogih tkivih, vključno z gladkim mišičjem žilja, in adrenalnimi žlezami. Losartanov aktivni metabolit E3174 je nekompetitivni antagonist, ki se na AT₁-receptorje veže z 10-do 40-krat večjo afiniteto kot LOS. Blokada AT₁-receptorjev prepreči naraščanje krvnega tlaka (39,40).

1.4. SUBTERAPEVTSKI ODMERKI STATINOV, ACE-INHIBITORJEV IN ANTAGONISTOV TIPO 1 RECEPTORJEV ZA ANGIOTENZIN II

V večini do sedaj objavljenih študij so proučevali osnovne in pleiotropne učinke terapevtskih odmerkov, statinov, ACE-inhibitorjev in ARB. Najpogosteje pri osebkih s prisotnimi srčnožilnimi obolenji. O učinkovanju subterapevtskih odmerkov omenjenih vrst

zdravil na endoteljsko funkcijo pri bolnikih in na togost arterij, pa ni bilo objavljenih veliko raziskav.

Med drugim so z raziskavami ugotovili, da nizki odmerki statinov (fulvastatina), ARB (valsartana) in njune kombinacije, izboljšajo funkcijске in strukturne lastnosti arterijske stene pri zdravih moških srednjih let (41,42,43). V eni od študij na živalih so prikazali, da imata ATO in LOS, vnešena v nizkih odmerkih, pomembne zaščitne kardiovaskularne učinke (povečanje vazodilatacije torakalne arterije in koronarnega pretoka ter porast koncentracije NO v serumu). Poleg tega se je uporaba kombinacije obeh zdravil izkazala za učinkovitejšo kot vsako zdravilo posebej (32). Pri bolnikih s prisotno aterosklerozo so proučevali vpliv visokega (80mg/dan) in nizkega (20mg/dan) odmerka ATO in ugotovili, da v visok odmerek v večji meri zniža vrednosti lipidov (trigliceridov, celokupnega holesterola in LDL-holesterola) (44).

V večini študij so statini, ACE-inhibitorji in ARB izboljšali funkcijo endotelija in žilno togost. Poznano je, da subterapevtski odmerki imajo učinke, vendar mehanizmi delovanja še niso znani. Za raziskave so v zadnjem času vse bolj zanimivi preventivni učinki subterapevtskih odmerkov omenjenih vrst zdravil, ki bi preprečevali razvoj srčnožilnih bolezni. Poleg tega pa tudi ugodno delovanje kombinirane terapije ARB in statina ali ACE-inhibitorja in statina, saj se je kombinirano zdravljenje v več raziskavah izkazalo za učinkovito.

NAMEN

Znano je, da imajo, statini poleg svojih osnovnih učinkov na znižanje lipidov tudi pleiotropne učinke, ki ugodno vplivajo na srčnožilni sistem. Med njimi je tudi vpliv na izražanje vazoaktivnih genov. Zanimalo nas je ali subterapevtski odmerki atorvastatina vplivajo ugodno tudi na izražanje encimov, ki sodelujejo pri sintezi vazoaktivnih aminov. Ob tem smo želeli oceniti še vpliv losartana in perindoprila. Obe zdravili sodita v skupino antihipertenzivno delujočih učinkovin, ki delujejo na renin-angiotenzin-aldosteronski sistem (RAAS). Obe zdravili sta pogosto uporabljeni in imata poleg osnovnih učinkov številne pleiotropne učinke, ki ugodno vplivajo na izboljšanje funkcijskih in strukturnih sprememb v arterijski steni (32).

V primeru, da poleg statinov v kombinaciji uporabimo tudi antihipertenzive (ACE-inhibitorji ali ARB) se lahko pojavijo dodatni ugodni učinki, kot posledica njihovega sinergičnega delovanja.

Namen našega dela je bil izmeriti izražanje *NOS2* in *NOS3* v tkivu podganjih torakalnih aortah in ugotoviti vpliv zdravljenja na njuno izražanje ter povezanost izražanja *NOS2* in *NOS3* s funkcionalnimi spremembami (kontrakcija in relaksacija) na torakalni aorti.

Preverili bomo naslednje hipoteze:

1. Subterapevtska koncentracija atorvastatina, perindoprila, losartana posamično ali v kombinaciji zniža izražanje *NOS2* v torakalni podganji aorti.
2. Subterapevtska koncentracija atorvastatina, perindoprila losartana posamično ali v kombinaciji zviša izražanje *NOS3* v torakalni podganji aorti.
3. Izražanje *NOS2* je povezano s funkcijskimi spremembami na podganji torakalni aorti (z izmerjenima odstotkoma največje možne konstrikcije in največje možne relaksacijev obročkih torakalne podganje aorte).
4. Izražanje *NOS3* je povezano s funkcijskimi spremembami na podganji torakalni aorti (z izmerjenima odstotkoma največje možne konstrikcije in največje možne relaksacije v obročkih torakalne podganje aorte).

Da bi lahko potrdili ali ovrgli gornje hipoteze, bomo v vzorcih podganjih torakalnih aort izmerili izražanje *NOS2* in *NOS3*. Normalizirane vrednosti izražanja genov bomo primerjali z izmerjenimi odstotki največje možne konstrikcije in največje možne relaksacije v obročkih torakalnih podganjih aort.

2. MATERIALI IN METODE

V okviru magistrske naloge smo v vzorcih tkiva podganjih torakalnih aort poskusnih živali, s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo (qPCR, angl.: quantitative polymerase chain reaction) v realnem času izmerili izražanje *NOS2* in *NOS3* ter za potrebe normalizacije tudi gen *HMB5* ter normalizirane rezultate statistično analizirali.

Izbor, obravnavo oziroma vzgojo poskusnih živali, izolacijo torakalnih aort ter merjenje odstotka največje možne konstrikcije (KONSTR) in odstotka največje možne relaksacije (RELAKS) v obročih torakalnih aort, je izvedla raziskovalna skupina na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Izolacija celokupne RNA iz tkiv torakalnih podganji aort, vrednotenje kvalitete izolirane RNA ter obratno prepisovanje v cDNA so bili predhodno izvedeni na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani.

2.1. OBRAVNAVA POSKUSNIH ŽIVALI TER PRIDOBITEV BIOLOŠKIH VZORCEV ZA MERJENJE IZRAŽANJA *NOS2* IN *NOS3*

2.1.1. Razdelitev poskusnih živali in meritve na izoliranih podganjih aortah

V raziskavo je bilo vključenih 61 zdravih Wistar podgan obeh spolov, brez hipertenzije. Tehtale so med 230 in 280 g. Vzgojene so bile v konstantnih klimatskih pogojih, pri temperaturi okolja od 23 do 25 °C. Hranjene so bile peroralno s standardno prehrano za podgane v obliki briketov (Altromin št. 1320, Lage, Nemčija). Med trajanjem poskusov so jih redno tehtali in jim merili krvni tlak. Po preteku določenih časovnih obdobjij so bile živali žrtvovane. Odvzeli so jim vzorce krvi, izolirali srca ter torakalne aorte. Izoliranim podganjam torakalnim aortam so izmerili KONSTR in od endotelija odvisen RELAKS. Vsi navedeni poskusi na živalih so bili izvedeni v skladu s smernicami, ki jih je določala Veterinarska uprava Republike Slovenije (z dovoljenjem št. 34401-23/2009/3).

Razdelitev poskusnih živali v skupine glede na trajanje in način tretiranja

Pred pričetkom izvajanja poskusov so živali naključno razdelili na skupine, glede na vrsto in čas trajanja zdravljenja ter jih ustrezno označili (Priloga 2). Podgane so v posameznih skupinah 4, 6, 8 ali 10 tednov prejemale ali atorvastatin - ATO ali losartan - LOS ali

perindopril - PER ali kombinacijo ATO+LOS ali kombinacijo ATO+PER. Podgane v kontrolni skupini so namesto zdravil prejemale vodo.

Uporabili so čiste zdravilne učinkovine, pripravke soli, proizvajalca Krka (Novo mesto, Slovenija) in sicer:

- atorvastatin - Atorvastatin calcium (kalcijev atorvastatinat),
- losartan - Losartan potassium (kalijev losartanat) in
- perindopril - Perindopril erbumine (terc-butilaminijev perindoprilat).

Pripravili so jih tako, da so pripravke učinkovin razredčili v destilirani vodi in pripravili osnovne raztopine zdravil. Živali so pripravljene raztopine prejemale, dnevno, *per os*, v sledečih odmerkih:

- atorvastatin (Atorvastatin calcium): 2mg/kg telesne teže /dan,
- losartan (Losartan potassium): 5mg/kg telesne teže /dan,
- perindopril (Perindopril erbumine): 0,6mg/kg telesne teže /dan,
- atorvastatin (Atorvastatin calcium): 2mg/kg telesne teže /dan + losartan (Losartan potassium): 5mg/kg telesne teže /dan in
- atorvastatin (Atorvastatin calcium): 2mg/kg telesne teže /dan + perindopril (Perindopril erbumine): 0,6mg/kg telesne teže /dan.

Meritve KONSTR in RELAKS na izoliranih podganjih torakalnih aortah

Kontraktilenost oz. dilatacijo aort preverjamo s pomočjo merjenja KONSTR oz. RELAKS.

Meritve so izvedli tako, da so torakalno aorto posamezne živali izolirali, sprali, odstranili maščobno in vezivno tkivo ter jo transverzalno narezali na 4 do 6 valjastih obročkov širokih 3 do 4mm, pri tem so endotelij ohranjali nepoškodovan. Potem so obročke takoj namestili v standardno kopel z Krebs-Henseleitovo raztopino (K-H raztopino). Nameščene obročke so uravnotežili na napetost mirovanja 20 mN za 60 minut. Med tem časom se je napetost periodično prilagajala na želen nivo, K-H raztopino so zamenjali vsakih 10 minut. Žilni odgovor so obravnavali, obdelali in posneli preko sistema aparatur po analogno-digitalni pretvorbi na trdi disk osebnega računalnika.

Po periodi uravnoteženja napetosti aortnega obročka so vsak posamezen obroček skrčili 3-krat z dodatkom 60mM KCl, da so dosegli stabilno kontrakcijo. V nadaljevanju so po spiranju obročkov preiskovali vazorelaksacijo predhodno skrčenih obročkov. Obročke so ponovno

skrčili, tokrat s fenilefrinom in izmerili odstotek relaksacije (RELAKS) po dodajanju od endotelija odvisnega vazodilatatorja acetilholina. Rezultate so podali kot odstotek največje možne konstrikcije in odstotek največje možne relaksacije. Po končanih poskusih so tkivo treh torakalnih aortnih obročkov vsake živali (teže približno 200mg), zamrznili v tekočem dušiku (pri -196°C).

2.1.2. Pridobitev bioloških vzorcev za merjenje izražanja *NOS2* in *NOS3*

Izolacijo RNA in prepis v cDNA so pripravili na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Postopek izolacije celokupne RNA

Celokupno RNA so izolirali iz približno 200mg tkiva 3 podganjih torakalnih aortnih obročkov, ene živali, hrانjenega v tekočem dušiku. Uporabili so komercialni kit za izolacijo RNA s kolono, Pure LinkTM RNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, California, ZDA). Pri celotni izvedbi postopka so postopali v skladu z navodili proizvajalca. Izvedli so ga tako, da so v tekočem dušiku zamrznjene vzorce strli v fin prah in dodali ustrezno količino pufra za lizo s Trizolovim reagentom. Tavsebuje fenol in gvanidin-isotiocianat, ki inhibira RNAAze in obori ter denaturira proteine ter optimalno lizira tkivo. Vsebino epruvete so inkubirali. Po končani inkubaciji so dodali kloroform, močno premešali, inkubirali ter s pomočjo centrifugiranja ločili na posamezne plasti: - spodnjo, ki vsebuje fenol-kloroform in proteine, - srednjo z DNA in - zgornjo brezbarvno vodno plast, v kateri so prisotne molekule RNA. Slednjo so prenesli v svežo epruveto in dodali enako količino 70% etanola ter dobro premešali. Etanol obori RNA in omogoči boljšo vezavo le-te na kolono. Alkoholno mešanico z RNA so prenesli v posebno kolono za vezanje RNA z zbiralno epruveto in centrifugirali. Da so odstranili preostale nečistoče, so kolono spirali z različnimi pufri. RNA so eluirali s kolone tako, da so na kolono dodali sterilno destilirano vodo brez RNAAz. Tako pridobljen vzorec izolirane celokupne RNA so ovrednotili z merjenjem koncentracije in čistosti ter z analizo stopnje razgrajenosti-integritete celokupne izolirane RNA. Izolate celokupne RNA so hranili v zamrzovalniku pri -80°C (45).

Merjenje koncentracije in čistosti celokupne RNA

Za merjenje koncentracije in čistosti celokupne RNA so uporabili spektrofotometer NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific). Molekule nukleinskih kislin absorbirajo ultravijolično svetlobo pri valovni dolžini (λ) 260 nm, predvsem zaradi heterocikličnih purinskih in pirimidinskih baz, ki jih sestavlja. Molekule aromatskih aminokislin in proteinov, ki predstavljajo nečistoče v izolatu RNA, absorbirajo ultravijolično svetlobo pri valovni dolžini 280 nm. Meritev poteka istočasno pri valovnih dolžinah 260 nm in 280 nm. Koncentracijo RNA določimo z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 260 nm. Čistost RNA določimo iz razmerja absorbanc, izmerjenih pri obeh valovnih dolžinah 260 nm in 280 nm (A_{260}/A_{280}). Vrednost višja kot 1,8 (1,7-1,9) nakazuje, da je vzorec minimalno kontaminiran s proteini (46).

Preverjanje kakovosti izolirane celokupne RNA

Ocene razgrajenosti izolirane celokupne RNA so v skladu z navodili proizvajalca naredili z analizatorjem Agilent Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, California, ZDA), ki uporablja tehnologijo Lab-on-a-chip (»laboratorij na čipu«, angl. LabChip® System) s pomočjo kita Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Palo Alto, California, ZDA). Gre za tehnologijo mikrofluidov in mikrokapilarne elektroforeze na posebnih čipi. Metoda je hitra in ponovljiva, potrebna količina vzorca je zelo majhna. Ocene razgrajenosti RNA: rezultate o velikosti in kvaliteti RNA poda avtomatsko kot razmerja ribosomskih vrhov (18s in 28s) ter RIN (angl. RNA Integrity Number). Za nadaljne analize so primerni vzorci z vrednostjo števila RIN od 7 do 10. Na elektroferogramu vidimo tudi prisotnost neželene DNA (47). V Prilogi 1 so podane izmerjene koncentracije RNA vzorcev in število RIN.

Reverzna transkripcija – obratno prepisovanje celokupne RNA v cDNA

Obratno prepisovanje je postopek, v katerem se iz tkiva izolirana celokupna enoverižna RNA obratno prepiše v stabilnejšo cDNA, s pomočjo encima reverzna transkriptaza, z naključnimi začetnimi oligonukleotidi (naključni heksameri, angl.: Random Heksamer Primer), deoksinukleotidi (dNTP-ji) in inhibitorji RNAAZ. cDNA, pridobljena s tem postopkom se lahko uporabi v reakcijah PCR (48). Postopek so izvedli z uporabo komercialnega kita Transcription High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Nemčija), na cikličnem termostatu (PCR ThermoCycler, Pequear). Pri izvedbi so postopali v skladu z navodili proizvajalca. Pripravljene vzorce cDNA so hranili v

zamrzovalniku pri -80°C. Po končanem obratnem prepisovanju so ocenili vpliv genomske DNA ozziroma interference mRNA na merjenje vrednosti pražnih ciklov (Ct, angl.: threshold cycle) in izvedbo qPCR v realnem času. Hkrati pa so preverili tudi specifičnost sond ter oligonukleotidnih začetnikov. Za potrebe naloge je bilo potrebno RNA večkrat obratno prepisati v cDNA.

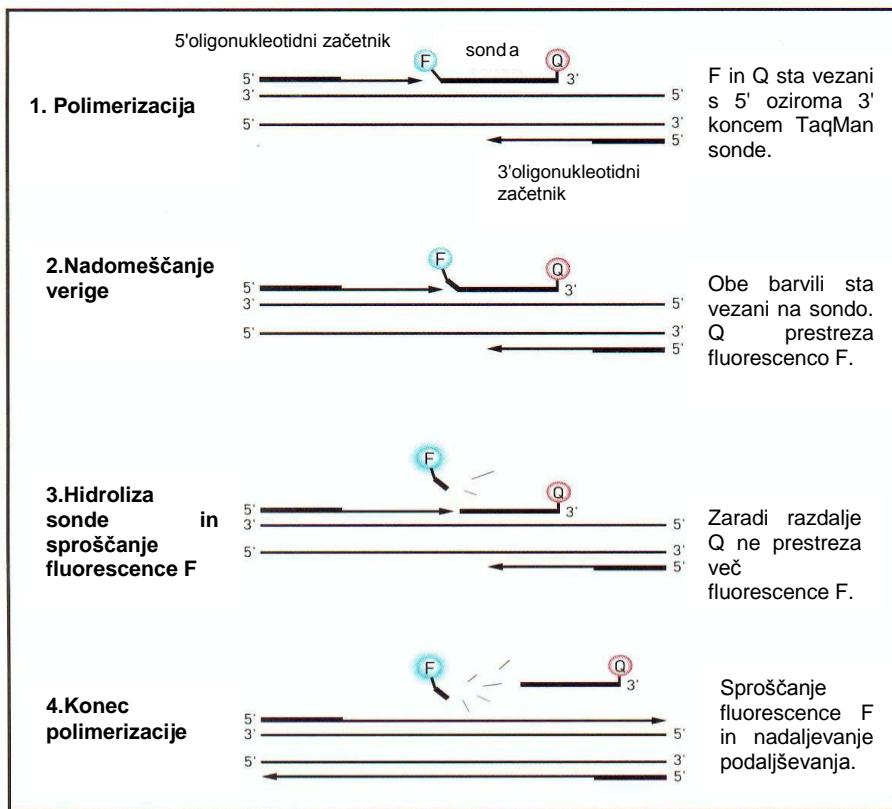
2.2. MERJENJE IZRAŽANJA *NOS2*, *NOS3* IN *HMBS*

V našem delu smo v vzorcih cDNA poskusnih živali, z metodo qPCR v realnem času in s hidrolizirajočimi »TaqMan« sondami, izmerili izražanje *NOS2*, *NOS3* in *HMBS*. Izmerjene vrednosti izražanja *NOS2* in *NOS3* smo normalizirali na hišni gen *HMBS* in z normaliziranimi vrednostmi izvedli statistične analize.

2.2.1. Princip postopka

Metoda qPCR v realnem času, omogoča detekcijo in kvantifikacijo specifičnega zaporedja DNA v vzorcu kontinuirno, v vsakem ciklu na osnovi detekcije fluorescentnega signala, ki nastane v sorazmerju s pomnoževanjem tarčne DNA (49). Količino produkta izmerimo, ko je reakcija še v eksponentni fazi. Po končanem pomnoževanju nam računalnik na osnovi izmerjenih vrednosti izriše ojačitveno krivuljo, ki prikazuje odvisnost intenzitete fluorescence posameznih vzorcev od števila ciklov (50). S primerjavo Ct vzorcev in Ct standardov z znanim številom kopij matrice, lahko določimo absolutno število kopij matrice v vzorcu (50). Uporabili smo specifične komercialno pripravljene hidrolizirajoče »TaqMan« sonde, ki izkoriščajo 5'-eksonukleazno aktivnost DNA polimeraze, ki med potekom PCR sondo razgradi (Slika 10). Uporabljenе sonde so imele na 5' koncu vezano reportersko fluorescentno barvilo FAM (6-karboksi fluorescin), ki seva fluorescenco. Na 3' koncu pa akceptorsko barvilo – dušilec (MGB, angl.: Minor Groove Binder), ki to fluorescenco prestreza, samo pa ne fluorescira. Pri intaktni sondi prihaja do fluorescentnega resonančnega prenosa energije iz reporterja na dušilec, neposredna bližina dušilca zmanjša fluorescenco reporterja. Med potekom PCR, ko polimeraza podvaja tarčno sekvenco, na katero je vezana sonda, povzroči 5'-eksonukleazna aktivnost DNA polimeraze hidrolizo sonde. Razcep sonde povzroči, da se razdalja med reporterskim barvilm in dušilcem poveča in onemogoča prestrezanje

fluorescence. Fluorescenza reporterskega barvila zato poraste in je sorazmerna količini PCR produkta (50,51).



Slika 10: Delovanje hidrolizirajočih »TaqMan« sond (41)

F=reporter, Q=dušilec

Tehnika qPCR v realnem času je idealna za merjenje izražanja genov, ker omogoča zbiranje podatkov med eksponentno fazo poteka PCR. Kadar merimo izražanje genov podatke, pridobljene s qPCR v realnem času analiziramo s pomočjo absolutne ali relativne kvantifikacije (51).

V nalogi smo uporabili metodo relativne kvantifikacije z uporabo standardne krivulje, pri kateri podatke qPCR v realnem času kvantificiramo z normalizacijo na hišni gen (52). Metoda temelji na normalizaciji izražanja tarčnega gena, glede na izražanje skrbno izbranega stabilnega, referenčnega (hišnega) gena, ki služi kot interni standard in na primerjavi izražanja tega normaliziranega genskega izražanja z vzorci kalibratorjev oziroma standardov. Da bi s tem načinom kvantifikacije pridobili točne rezultate, moramo vključiti enega ali več stabilnih hišnih oziroma referenčnih genov, za katere pod izbranimi eksperimentalnimi pogoji ne pričakujemo sprememb v izražanju (52,53). Pri našem delu smo uporabili hišni gen *HMBS*.

Slednji je bil predhodno izbran med 9 kandidatnimi geni, na osnovi podatkov v literaturi. Izbor najprimernejšega je bil narejen na podlagi najmanjšega geometričnega povprečja Ct med vzorci, na katerih so merili izražanje vsakega kandidatnega gena posebej in s pomočjo rezultatov pridobljenih z algoritmom geNorm®.

2.2.2. Reagenti in priprava raztopin

Reagenti:

- komercialni reagenčni kompleti 20-krat koncentriranih oligonukleotidnih začetnikov in sond (TaqMan® Gene Expression Assay, proizvajalca AB Applied Biosystem, ZDA) za vse tri gene (Preglednica II),
- komercialna pripravljena 2-krat koncentrirana reakcijska mešanica ustreznega reakcijskega pufra, encima FastStart Taq DNA polimeraze, nukleotidov (dATP, dCTP, dGTP, dUTP) in referenčnega barvila (ROX) (FastStart Universal Probe Master (Rox), proizvajalca Roche Diagnostic GmbH Germany,
- avtoklavirana ultračista voda,
- vzorci cDNA poskusnih živali,
- pripravljene redčitve »stock cDNA« (standardi), za pripravo umeritvenih krivulj za določanje izražanja *NOS2*, *NOS3* in *HMBS* (Preglednici III in IV),
- negativna kontrola (NK) (avtoklavirana ultračista voda),
- 3% hipoklorit za čiščenje delovne površine in opreme v delovni komori,
- 10% etanol za čiščenje delovne površine in opreme v delovni komori.

Preglednica II: Reagenčni kompleti oligonukleotidnih začetnikov in sond

Gen (sonda)	Reagenčni komplet
<i>NOS 2</i>	TaqMan® Gene Expression Assay (TaqMan sonde za merjenje izražanja genov <i>NOS2</i>) : Rn 00561646_m1, 20 x Mix*
<i>NOS 3</i>	TaqMan® Gene Expression Assay (TaqMan sonde za merjenje izražanja genov <i>NOS3</i>) : Rn 02132634_s1, 20 x Mix*
<i>HMBS</i>	TaqMan® Gene Expression Assay (TaqMan sonde za merjenje izražanja genov <i>HMBS</i>): Rn 00565886_m1, 20 x Mix*

* 20-krat konc. Oligonukleotidnih začetnikov in sond, proizvajalca AB Applied Biosystem

Priprava raztopin:

1. *Delovna reakcijska mešanica »MasterMix« (MM)*
 - Najprej smo preračunali potrebne količine posameznih sestavin z upoštevanjem prebitka, zaradi izgub pri pipetiranju, za vsak gen posebej;
 - nato smo v označene epruvete (za vsak gen posebej) napipetirali ustrezne količine premešanih »TaqMan« sond;
 - dodali ustrezno količino premešane komercialno pripravljene reakcijske mešanice (Roche Diagnostic);
 - ter na koncu dodali še ustrezno količino ultračiste vode in dobro premešali na vibracijskem stresalniku.

2.2.3. Aparature in ostala oprema

- delovna komora DNA/RNA, UV-cleaner, UVC/T-M-AR (BIOSAN, Riga, Latvija),
- ciklični termostat ABI PRISM 7000 Sequence Detection Biosystem, (AB Applied Biosystem, Forster City, CA, ZDA),
- centrifuga za mikrotiterske plošče CENTRIC 322A, (Tehnica),
- kombinirana centrifuga/vibracijski stresalnik, Combi-Spin, (BIOSAN, Riga, Latvija),
- mikrotiterske plošče z 96 luknjicami, 96-Well Optical Reaction Plate with Barcode 128 ABI PRISM™ (AB Applied Biosystem, Forster City, CA, ZDA),
- polavtomatske nastavljive pipete 0,2-2,5µL, 2-20 µL, 20-200µL, 100-1000µL (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- avtoklavirani pipetni nastavki (10µL, 100µL, 1000µL),
- avtoklavirane epruvete (0,5mL, 1,5mL)

2.2.4. Opis postopka merjenja izražanja *NOS2*, *NOS3* in *HMBS*

V vsakemu vzorcu cDNA smo izmerili izražanje *NOS2*, *NOS3* in *HMBS*. Na mikrotiterskih ploščah smo za vsak gen, hkrati z merjenjem izražanja gena v vzorcih, merili tudi izražanje tega gena v postopnih redčitvah (standardih) osnovnega standarda (pool-a cDNA oziroma »stock-a« cDNA) in v NK. Reakcije smo z vzorci izvedli v trojnikih, v standardih in NK pa v štirikratnikih. Pred pričetkom dela smo pripravili delovno tabelo z vpisanimi pozicijami pipetiranja ter preračunali količine vseh potrebnih sestavin. Najprej smo iz osnovnega

standarda najvišje koncentracije pripravili ustrezne stopenjske redčitve standardov (Preglednici III in IV). Koncentracija cDNA analiziranih vzorcev je bila enaka koncentraciji drugega standarda. Za pripravo standardnih krivulj tarčnih *NOS2* in *NOS3* smo morali, zaradi različnih nivojev izražanja obravnavanih genov, pripraviti različne redčitve standardov, za vsak gen drugačne (Preglednici III in IV). Posledično smo morali zaradi potrebne normalizacije izražanja tarčnega gena na hišni gen tudi izražanje *HMBS* meriti dvakrat. V obeh pripravljenih redčitvah standardov, za *NOS2* in *NOS3*, in v za vsak gen posebej koncentracijsko uravnanih vzorcih.

Preglednica III: Redčitve standardov za pripravo standardnih krivulj za *NOS2* in *HMBS*

Gen	Zaporedni standard in koncentracija (ng/µL)				
	St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5
<i>NOS2</i>	112	56	28	14	7
<i>HMBS</i>	112	56	28	14	7

Za pripravo standardov smo uporabili osnovni standard s koncentracijo 112ng/µL.

Za določanje izražanja tarčnega *NOS2* in hišnega *HMBS* smo koncentracijo cDNA vseh vzorcev uravnali na 56ng/µL.

Preglednica IV: Redčitve standardov za pripravo standardnih krivulj za *NOS3* in *HMBS*

Gen	Zaporedni standard in koncentracija (ng/µL)				
	St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5
<i>NOS3</i>	14	7	3,5	1,75	0,88
<i>HMBS</i>	14	7	3,5	1,75	0,88

Za pripravo standardov smo uporabili osnovni standard cDNA s koncentracijo 14ng/µL.

Za določanje izražanja tarčnega *NOS3* in hišnega *HMBS* smo koncentracijo cDNA vseh vzorcev uravnali na 7ng/µL.

Zatem smo pripravili MM delovno reakcijsko mešanico, kot je opisano v podpoglavlju 3.2.2.. Najprej smo na mikrotitersko ploščo v luknjice ob steni napisali ustrezeno količino MM, sledilo je pipetiranje standardov, NK in vzorcev (količine za eno reakcijo so navedene v Preglednicah V in VI).

Preglednica V: Sestava končne reakcijske zmesi za eno reakcijo, za določanje nivoja izražanja *NOS2* in *HMBS*

Sestavina	Volumen (μ L)
Ultra čista H ₂ O	4
Sonda (<i>NOS2</i> ali <i>HMBS</i>)	1
Reakcijska mešanica FastStart Universal Probe Master(Rox) (Roche Diagnostic)	10
Vzorec cDNA (konc. 56ng/ μ L) ali redčitev standarda ali NK	5
Končni volumen:	20

Preglednica VI: Sestava končne reakcijske zmesi za eno reakcijo, za določanje nivoja izražanja *NOS3* in *HMBS*

Sestavina	Volumen (μ L)
Ultra čista H ₂ O	1,9
Sonda (<i>NOS3</i> ali <i>HMBS</i>)	0,6
Reakcijska mešanica FastStart Universal Probe Master(Rox) (Roche Diagnostic)	7,5
Vzorec cDNA (konc. 7ng/ μ L) ali redčitev standarda ali NK	5
Končni volumen:	15

Po načrtu zapolnjeno mikrotitersko ploščo smo dobro prelepili z lepljivo folijo, vsebino premešali s stresanjem plošče na stresalniku. Da smo odstranili morebitne zračne mehurčke, smo ploščo 2 minuti centrifugirali na 1900 obratih. V nadaljevanju smo ploščo prekrili s svetlobi neprepustnim pokrivalom in vstavili v ciklični termostat ABI PRISM 7000, vnesli vse podatke o analiziranih vzorcih na plošči v računalnik, jo sprogramirali in pričeli z analizo. Pogoji, ki smo jih nastavili na analizatorju, so nam omogočili optimalen postopek za oceno genskega izražanja z uporabo qPCR v realnem času. Navedeni so v Preglednici VII.

Preglednica VII: Pogoji reakcije PCR

Korak	T (°C)	Čas	Št. ciklov
Aktivacija z Uracil-n-glikozilazo	50	2 minuti	
Preinkubacija	95	10 minut	
Denaturacija	95	15 s	40
Naleganje oligonukleotidnih začetnikov in pomnoževanje	60	1 min	

Med procesom pomnoževanja je računalnik zbiral podatke o fluorescenci in jih po končani analizi s pomočjo programa prikazal v obliki tabele in v grafični obliki z ojačitveno krivuljo (angl.: amplification plot), ki prikazuje podatke o kinetiki pomnoževanja tarčne sekvence (54). Na zavihku »Standard curve« smo pregledali potek standardne krivulje, ki je podana kot logaritem začetne količine vzorca v odvisnosti od Ct. Podana sta naklon krivulje in determinacijski koeficient (korelačijski koeficient R^2). Naklon premice nakazuje na učinkovitost pomnoževanja. Iz naklona krivulje se izračuna učinkovitost E (E, angl.: Efficiency), po enačbi: $E=10^{(-1/\text{naklon})}-1$. Determinacijski koeficient R^2 je mera prileganja. Pove nam, kako dobro se meritve prilegajo idealni krivulji (55).

Nivoje izražanja genov smo prenesli v program Excell Microsoft. Meritvam v trojniku oziroma četvorniku smo izračunali srednje vrednosti in tako dobili koncentracijo mRNA v vzorcih za oba tarčna gena in hišni gen. Normalizacijo smo izvedli tako, da smo koncentracijo mRNA tarčnega gena delili s koncentracijo mRNA hišnega gena v istem vzorcu. Normalizirane vrednosti smo uporabili za statistične analize.

2.2.5. Opozorila in ostala priporočila

- V vzorcih cDNA je bilo potrebno preveriti vpliv genomske DNA ali interferenc RNA. Obenem smo preverili tudi specifičnost sond ter oligonukleotidnih začetnikov.
- Pri delu smo reagente ves čas hranili na ledu in v temi ter jih takoj po uporabi zamrznili.
- Uporabljene vzorce, standarde in NK smo preduporabo dobro premešali s stresanjem na stresalniku. Ravno tako smo pred in tudi večkrat med uporabo premešali »MasterMix«.
- Po koncu pipetiranja smo vsebino reakcijskih luknjic na mikrotiterskih ploščah dobro premešali s stresanjem in s centrifugiranjem odstranili zračne mehurčke.
- Standardna krivulja je bila ustrezna, če je E med 90-110%. To ustreza naklonu krivulje med -3,1 in -3,6.
- Determinacijski koeficient R^2 je moral biti čim bliže 0,999 do 1. Idealen je 1, krivulja je v tem primeru premica. Če je $R^2=0,98$ kaže na stabilno in zanesljivo analizo.

- Da smo nastandardni krivulji pridobili najboljša možna naklon in R^2 , smorezultate meritev standardov, ki so preveč izstopali (ubežnike), izločili.
- Standardna deviacija med meritvami Ct v trojniku ali četvorniku za posamezen vzorec/standard/NK ni smela biti večja od 0,2. Pri standardih za umeritveno krivuljo in pri vzorcih so večja odstopanja standardne deviacije pomenila nepravilnosti pri pipetiranju in posledično potrebo po ponavljanju.
- Pri NK nismo smeli zaznati nobenega izražanja, kakršno koli zaznavanje izražanja v NK je pomenilo kontaminacijo med izvajanjem postopka.
- Vzorcev pod pragom fluorescence nismo kvantificirali. Predvidevali smo, da je bilo v vzorcu premalo začetne cDNA, ali je bila ta uničena ali so se geni v teh vzorcih izražali v nižji meri.

2.3. STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV

Najprej smo v skupinah glede na vrsto zdravljenja opazovali vpliv časa trajanja zdravljenja na izražanje *NOS2* in *NOS3*. Oceno smo izvedli s pomočjo enofaktorske Anova-e. V primeru statistične značilnosti ($p<0,05$) smo naredili Post Hoc test Tukey. V primeru, da smo kršili predpostavko Anova-e o homogenosti varianc, smo naredili neparametrična testa najprej Kruskal Wallis-ov test in Mann-Whitney-ev test za opredelitev statistične značilnosti. Homogenost varianc med vzorci smo preverjali z Levene-ovim testom homogenosti varianc. Vrednost p je morala biti večja od 0,05. V nasprotnem primeru variance niso bile homogene. Zaradi premajhnega števila vzorcev v podskupinah, smo združili po dve podskupini in sicer 4. in 6. teden (zgodnje obdobje zdravljenja) ter 8. in 10. teden (pozno obdobje zdravljenja).

Pri izvedbi enofaktorske Anova-e smo vzorce najprej razdelili na skupine glede na vrsto in trajanje zdravljenja.

Razdelitev v podskupine in pomen kratic:

atorvavr - zdravljenjez ATO : 0 – kontrolna skupina (brez zdravljenja); 1 –zgodnje obdobje zdravljenja (4+6 tednov) in 2 – pozno obdobje zdravljenja (8+10 tednov);
losartvr - zdravljenje z LOS: 0 – kontrolna skupina (brez zdravljenja); 1 - zgodnje obdobje zdravljenja (4+6 tednov) in 2 – pozno obdobje zdravljenja (8+10 tednov);

perindvr - zdravljenje s PER: 0 – kontrolna skupina (brez zdravljenja); 1 - zgodnje obdobje zdravljenja (4+6 tednov) in 2 – pozno obdobje zdravljenja (8+10 tednov);

ALvr - zdravljenje s kombinacijo ATO + LOS: 0 – kontrolna skupina (brezzdravljenja); 1 – zgodnje obdobje zdravljenja (4+6 tednov) in 2 – pozno obdobje zdravljenja (8+10 tednov);

APvr - zdravljenje s kombinacijo ATO + PER: 0 – kontrolna skupina (brez zdravljenja); 1 - zgodnje obdobje zdravljenja (4+6 tednov) in 2 – pozno obdobje zdravljenja (8+10 tednov).

V naslednjem koraku smo z dvofaktorsko Anova-o preučevali vpliv časa trajanja zdravljenja (skupina je označena s timeskrač) in vrste zdravljenja (skupina je označena s th), na izražanje *NOS2* in *NOS3*. Zanimala nas je tudi interakcija med vrsto in časom trajanja zdravljenja. Za natančnejšo analizo naredili še Post Hoc test Tukey. Da ne bi kršili predpostavko Anova-e o homogenosti varianc smo podatke pomnožili s faktorjem 1000, jih logaritmirali in izvedli dvofaktorsko Anova-o.

Razdelitev v skupine in pomen kratic

Faktor timeskrac: 1- zgodnje obdobje zdravljenja (4.+6 .teden),

2 - pozno obdobje zdravljenja (8.+10. teden).

Faktor th: 0 - brez zdravljenje (kontrolna skupina),

- 1 - zdravljenje z ATO,
- 2 - zdravljenje z LOS,
- 3 - zdravljenje s PER,
- 4 - kombinirano zdravljenje z ATO+LOS,
- 5 - kombinirano zdravljenje z ATO+PER.

V nadaljevanju nas je zanimalo, ali je izražanje proučevanih genov povezano s funkcijskim sposobnostmi podganje torakalne aorte. Opazovali smo, kako se izražanje proučevanih genov spreminja po tercilih KONSTR in RELAKS pri zdravljenju z vsakim zdravilom posebej in s kombinacijama zdravil. Mejne vrednosti sta predstavljali 33. in 67. tercil vseh vrednosti. V ta namen smo vrednosti KONSTR in RELAKS razdelili v tri skupine:

- 1. skupina z najmanjšimi vrednostmi KONSTR in RELAKS,
- 2. skupina s srednje velikimi vrednostmi KONSTR in RELAKS,
- 3. skupina z največjimi vrednostmi KONSTR in RELAKS.

Izvedli smo enofaktorsko Anova-o in za natančnejšo analizo statistične značilnosti še Post Hoc test Tukey. Če smo kršili predpostavko Anova-e o homogenosti varianc, smo naredili neparametrična testa Kruskal Wallis-ov in Mann-Whitney-ev test.

V zadnjem koraku smo s korelacijo ugotavljali povezavo med izražanjem preučevanih genov infunkcijskim sposobnostmi podganje torakalne aorte (KONSTR in RELAKS), pri posamezni vrsti zdravljenja. Ravno tako smo želeli ugotoviti, ali izražanja genov pri zdravljenju s posameznim zdravilom ali kombinacijo zdravil korelirajo med seboj. Odnos med dvema spremenljivkama smo ocenjevali, ker se podatki niso porazdeljevali normalno, s Spearmanovim korelačijskim koeficientom. Vrednosti tega koeficiente znašajo med -1 in +1. Porazdeljenost spremenljivke smo preverjali s Kolmogorov-Smirnov-im testom.

Pri vseh testih smo kot statistično značilno opredelili vrednost $p \leq 0,05$. Za izvedbo statističnih analiz smo uporabili računalniški program »SPSS Statistics«.

3. REZULTATI IN RAZPRAVA

S pomočjo živalskega modela smo žeeli ugotoviti, kakšen vpliv imata trajanje (4 ,6 ,8 ali 10 tednov) in vrsta zdravljenja z nizkimi odmerki ATO ali LOS ali PER ali kombinacije ATO+LOS ali kombinacije ATO+PER na izražanje *NOS2* in *NOS3* v endoteliju žilne stene podganje torakalne aorte.

V torakalnih podganjih aortah smo s qPCR v realnem času izmerili izražanje *NOS2* in *NOS3* ter hišnega *HMBS*. V Prilogi 2 je podana razdelitev živali. Podatki o koncentraciji in kvaliteti izolirane RNA so navedeni v Prilogi 1.

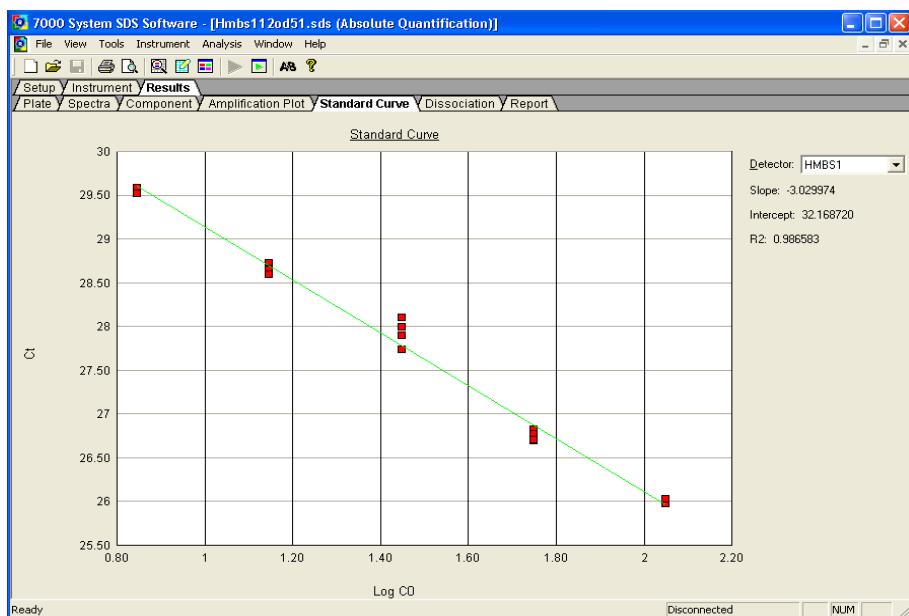
Pred pričetkom merjenja izražanja genov so v vzorcih cDNA preverili specifičnost sond ter vpliv genomske DNA oziroma interference mRNA v postopku. To so napravili tako, da so obratno prepisovanje mRNA v cDNA izvedli tudi brez uporabe encima reverzne transkriptaze. V nadaljevanju so z vzorci cDNA, prepisanimi z in brez reverzne transkriptaze, izvedli qPCR v realnem času. Pri *HMBS* in *NOS2* v vzorcih cDNA, prepisanih brez reverzne transkriptaze, niso zaznali pomnoževanja PCR produkta. Pri *NOS3* pa so zaznali pomnoževanja PCR produkta tudi v vzorcih cDNA, prepisanih brez reverzne transkriptaze. To je nakazovalo na prisotnost genomske DNA oziroma interference mRNA. Ker pa so bile vrednosti Ct visoke, smo ocenili, da zaznana količina DNA zanemarljivo vpliva na kvantifikacijo mRNA *NOS3*.

3.1. OPTIMIZACIJA ANALITSKIH POSTOPKOV

Pogoji pomnoževanja qPCR v realnem času so bili predhodno optimizirani, zato jih nismo spremajali. Pri delu smo upoštevali splošna navodila proizvajalca Roche Diagnostic GmbH Germany FastStart Universal Probe Master (Rox), AB Applied Biosystem TaqMan® Gene Expression Assay in aparata ABI Prism 7000 SDS. Da smo lahko uspešno kvantificirali izražanje genov, smo morali določiti optimalne standardne krivulje za vsak gen posebej in koncentracijo cDNA. Iskali smo količino cDNA in koncentracije raztopin standardov, s katerimi bi dobili čim bolj optimalno standardno krivuljo in hkrati prihranili pri porabi reagentov.

Priprava standardnih krivuljza *NOS2*, *NOS3* in *HMBS*

Za kvantitativno analizo nivoja izražanja genov smo morali ob vsaki analizi, na vsaki mikrotitrski plošči pripraviti standardno krivuljo, za vsak gen posebej. Primer standardne krivulje za *HMBS* je prikazan na Sliki 11. Za pripravo smo uporabili stopenjske redčitve osnovnega standarda. Osnovni standard je priporočljivo pripraviti iz cDNA čim več preiskovanih vzorcev. Zaradi majhnih količin vzorcev in nizkih koncentracij mRNA, smo izbrali vzorce z višjimi koncentracijami mRNA, ki jih je bilo tudi količinsko dovolj in poskušali zajeti vzorce iz vseh skupin. Osnovni standard smo stopenjsko redčili in pridobili mešanice (standarde) petih različnih koncentracij. Območje koncentracij standardov za pripravo standardne krivulje je moralo biti takšno, da smo z njim zajeli pričakovane, neznane vrednosti izražanja genov v vseh preiskovanih vzorcih. Iskali smo redčenja standardov, s katerimi bi dosegli čim boljša naklon in R^2 .



Slika 11: Primer standardne krivulje za *HMBS*

Najprej smo za vse tri *NOS2*, *NOS3* in *HMBS* naredili standardne krivulje s koncentracijami standardov: St.1=28ng/ μ L, St.2=14ng/ μ L, St.3=7ng/ μ L, St.4=3,5ng/ μ L in St.5=1,75ng/ μ L. Uporabili smo osnovni standard s koncentracijo cDNA 28 ng/ μ L.

Ugotovili smo naslednje:

- Pri **NOS2** smo po izključitvi odstopajočih meritev standardov dobili naklon -3,458, kar je bilo znotraj dovoljenih meja učinkovitosti in $R^2=0,972$, ki je bil nekoliko prenizek, kar je nakazovalo na nekoliko slabše prileganje meritev krivulji. Izražanje *NOS2* se v organizmu aktivira ob vnetnih procesih oziroma ob imunskem odgovoru. Ker so bile poskusne živali v dobrem zdravstvenem stanju, zaradi protivnetnih učinkov zdravil pa vnetnih procesov niti niso mogle razviti, visokega izražanja *NOS2* nismo pričakovali. Zato smo se odločili, da bomo povečali koncentracijo cDNA za standardno krivuljo. Pripravili smo redčenja standardov višjih koncentracij in sicer: St.1=112ng/µL, St.2=56ng/µL, St.3=28ng/µL, St.4=14ng/µL in St.5=7ng/µL iz osnovnega standarda koncentracije cDNA 112 ng/µL. Po izključitvi izstopajočih meritev smo dobili naklon -5,006, kar je višje kot z nižjimi standardi in $R^2=0,987$. Na podlagi podatkov smo sklenili, da bomo kljub naklonu, ki presega spodnjo vrednost -3,6 v analizah uporabili redčenja standardov koncentracij (112; 56; 28; 14 in 7)ng/µL. Osnovni standard smo pripravili iz cDNA kontrolnih živali, da bi se izognili vplivu antihipertenzivov in statinov, za katere smo predpostavliali, da zmanjšajo izražanje *NOS2*. Uporabljene količine posameznih sestavin v končni reakcijski zmesi za qPCR v realnem času so navedene v Preglednici V. Končnega volumna reakcijske mešanice in količin vseh sestavin za eno reakcijo, med iskanjem najbolj optimalne standardne krivulje nismo spremenjali.

-Pri **NOS3** smo po izključitvi odstopajočih meritev standardov dobili naklon -3,954, in $R^2=0,997$. Odločili smo se, da bomo za merjenje nivoja izražanja *NOS3* uporabili standarde nižjih koncentracij (14; 7; 3,5; 1,75 in 0,88) ng/µL. Zaradi tega smo qPCR v realnem času z vzorci izvedli z manjšimi količinami posameznih sestavin v reakcijski zmesi in končnem volumnu 15µL (Preglednica VI).

-Pri **HMBS** smo pri prvih redčitvah standardov, po izločitvi odstopajočih meritev dveh standardov dobili naklon -3,635 in $R^2=0,994$. Za normalizacijo izražanja *NOS2* smo morali v vzorcih izmeriti tudi izražanje hišnega *HMBS*. Za to smo uporabili iste standarde kot za *NOS2* (112; 56; 28; 14 in 7)ng/µL in enake količine posameznih sestavin za eno reakcijo kot za *NOS2* (Preglednica V). Za normalizacijo izražanja *NOS3* smo morali v vzorcih izmeriti tudi izražanje hišnega *HMBS*. Uporabili smo iste standarde kot za *NOS3* (14; 7; 3,5; 1,75 in 0,88)ng/µL. Za reakcijsko zmes smo uporabili enake količine posameznih sestavin kot za *NOS3* (Preglednica VI).

Pred začetkom merjenja nivoja izražanja genov smo RNA vseh vzorcev ponovno prepisali v cDNA v koncentraciji 56 ng/ μ L. Zaradi nizkih koncentracij RNA in nizkega nivoja izražanja *NOS2* v vzorcih 21 in 50 nismo izmerili izražanja *HMBS* in *NOS2*, v vzorcih 17, 23 in 51 pa izražanja *NOS2*. Za vzorec 16 pa nismo dobili podatkov o KONSTR in RELAKS.

Standardna deviacija med meritvami Ct v trojniku oziroma četvorniku je bila pri vseh vzorcih nižja od 0,2.

3.2. PREGLED REZULTATOV IN ČASOVNA ANALIZA IZRAŽANJA GENOV

Najprej smo ocenjevali vpliv ATO na izražanje *NOS2*. Zdravilo smo proučevali zaradi njegove pogoste uporabe, tako pri posameznikih z visokim tveganjem za razvoj srčnožilnih bolezni kot pri posameznikih po posrčnožilnem dogodku. Znano je, da imajo statini poleg svojih osnovnih učinkov na znižanje lipidov tudi pleiotropne učinke, ki ugodno vplivajo na srčnožilni sistem. Med njimi je tudi vpliv na izražanje vazoaktivnih genov. Zanimalo nas je ali subterapevtski odmerki ATO vplivajo ugodno tudi na izražanje vazoaktivnih aminov. V nadaljevanju smo ocenjevali vpliv LOS in PER. Obe zdravili sodita v skupino antihipertenzivov, ki delujejo na renin-angiotenzin-aldosteronski sistem (RAAS). Obe zdravili sta v široki uporabi in imata poleg osnovnih učinkov številne pleiotropne učinke, ki ugodno vplivajo na izboljšanje funkcijskih in struktturnih sprememb v arterijski steni (32).

Na koncu smo ocenjevali še vpliv kombiniranega zdravljenja, ki je do sedaj tudi v literaturi veljal za najbolj učinkovitega. V primeru, da poleg statinov uporabimo antihipertenzive (ACE-inhibitorji ali ARB), se pojavi dodatni ugodni učinki ali sinergično delovanje kombinacije statina in antihipertenziva (32).

V prvem delu smo preko merjenja izražanja *NOS2* in *NOS3* v vsaki posamezni podskupini žeeli ugotoviti, kako čas trajanja zdravljenja vpliva na izražanje genov v torakalni aorti. Za vsak gen posebej smo v vsaki podskupini rezultate izražanja gena v posameznih časovnih obdobjih primerjali z nivojem izražanja gena v kontrolni skupini. Za vse primerjave v nalogi smo uporabili isto kontrolno skupino zdravih živali, ki niso prejemale nobenih zdravil. Rezultate smo podali v preglednicah in jih prikazali s stolpčnim diagramom. Na hišni gen normalizirane vrednosti izražanja *NOS2* in *NOS3* so podane v Prilogi 3, v Prilogah od 4 do 7 pa so podane razdelitev vzorcev za posamezne statistične analize.

Premajhno število vzorcev v posameznih podskupinah je onemogočilo izvedbo nekaterih statističnih analiz, zato smo, da bi nekatere statistične analize lahko izvedli, združili 4. in 6. tenen zdravljenja (zgodnje obdobje zdravljenja) ter 8. in 10. tenen terapije (pozno obdobje zdravljenja). Le tako smo lahko ocenili statistično značilnost naših rezultatov. Kontrolna skupina je pomenila obdobje 0 (brez zdravljenja).

3.2.1. Izražanje NOS2 pri različnih vrstah zdravljenja

Povprečne vrednosti izražanja NOS2 v posameznih podskupinah glede na vrsto in trajanje zdravljenja so skupaj z vrednostmi p podane v Preglednici VIII. Podatki so nazorneje prikazani z vrstičnim diagramom (Slika 12).

Preglednica VIII: Primerjava izražanja NOS2 po vrstah zdravljenja v odvisnosti od časa trajanja zdravljenja (enofaktorska Anova)

Povprečne vrednosti in standardni odkloni (\pm) izražanja NOS2/HMBS po vrstah, po tednih in obdobjih zdravljenja

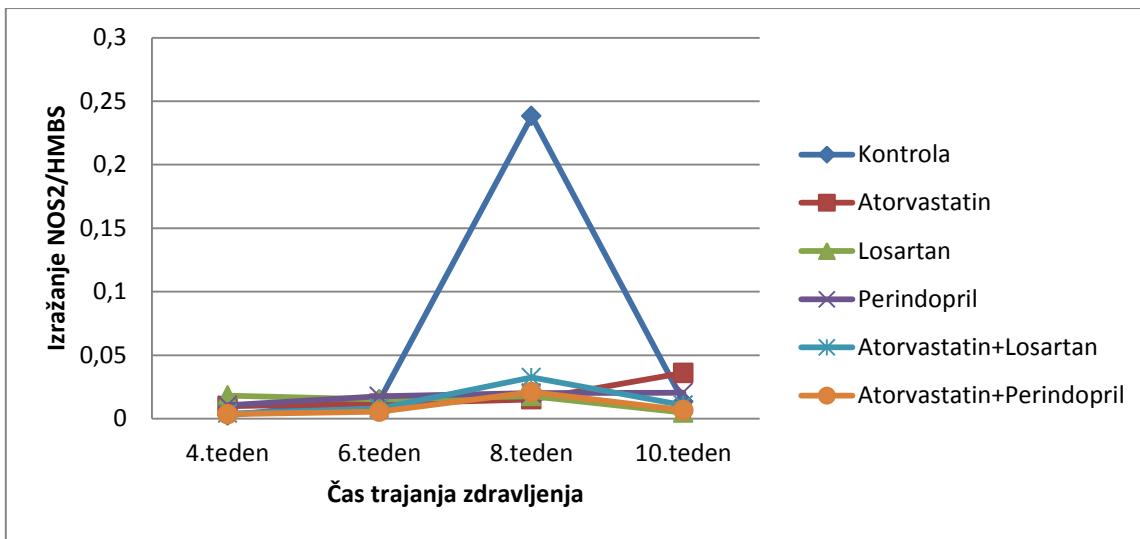
vrsta zdrav.	4.teden	6.teden	1. o.z.	8.teden	10.teden	2. o.z.	F	p*	p **
KONTR. / b	0,0225	0,0149		0,2383	0,0134	0,0964^K		/	/
	$\pm 0,0102$	$\pm 0,0102$	/	$\pm 0,4391$	$\pm 0,0116$	$\pm 0,2656$			
ATO $\pm 0,0059$	0,0099	0,0118	0,0111	0,0152	0,0360	0,0235			
	$\pm 0,0084$	$\pm 0,0084$	$\pm 0,0067$	$\pm 0,0097$	$\pm 0,0430$	$\pm 0,0267$	0,421	0,662	/
LOS $\pm 0,0153$	0,0183	0,0152	0,0173	0,0177	0,0049	0,0126			
	$\pm 0,0153$	/ b	$\pm 0,0110$	$\pm 0,0137$	$\pm 0,0025$	$\pm 0,0120$	0,354	0,707	/
PER $\pm 0,0055$	0,0106	0,0176	0,0141	0,0201	0,0205	0,0203			
	$\pm 0,0188$	$\pm 0,0188$	$\pm 0,0120$	$\pm 0,0006$	$\pm 0,0029$	$\pm 0,0017$	0,330	0,724	/
ATO+LOS / b	0,0041	0,0082	0,0074	0,0325	0,0107	0,0238			
	$\pm 0,0035$	$\pm 0,0035$	$\pm 0,0035$	$\pm 0,3254$	$\pm 0,0052$	$\pm 0,0217$	0,444	0,648	/
ATO+PER $\pm 0,0012$	0,0035	0,0056	0,0045	0,0209	0,0068	0,0152			
	$\pm 0,0000$	$\pm 0,0000$	$\pm 0,00183$	$\pm 0,0107$	$\pm 0,0057$	$\pm 0,0124$	0,443	0,649	/

Obdobja zdravljenja (o.z): 1.-zgodnje obdobje zdravljenja (4.+6. tenen), 2.-pozno obdobje zdravljenja (8.+10. tenen) in 0-kontrolna skupina

p* predstavlja razliko v izražanju NOS2 med obdobji 1, 2 ali 0

p ** predstavlja točno določeno razliko v izražanju NOS2 in sicer med 0 in 1 ali 2, ali med 1 in 2, če je bila p * statistično značilna

^Knavedna je povprečna vrednost izražanja NOS2 vseh štirih časovnih obdobij v kontrolni skupini (gre za 0-kontrolno skupino), b- 1 meritev



Slika 12: Izražanje *NOS2* po tednih v skupinah z različnimi vrstami zdravljenja in v kontrolni skupini

Izražanje *NOS2* pri zdravljenju z ATO

Izražanje *NOS2* v skupini živali, ki so prejemale ATO, se je v času od 4. do 10. tedna povečalo za 3,64-krat (Preglednica VIII). Tedenska nihanja izražanja *NOS2* v vseh podskupinah in primerjava s kontrolno skupino so prikazani na Sliki 12. Izmerjena izražanja so bila nizka. Razlike med skupino, ki je prejemala ATO in kontrolno skupino so bile majhne. Tudi Huang K. C. in sodelavci navajajo, da lahko različni statini, med njimi ATO, v koncentracijah 0,1 do 30 μ M inhibirajo izražanje *NOS2* v glodalskih celicah (56). V raziskavah navajajo tudi, da zdravljenje z ATO v visokih odmerkih (10mg/kg/dan) v aortah podgan s sepso inhibira izražanje *NOS2* (57).

Izražanje *NOS2* pri zdravljenju z LOS

Izražanje *NOS2* v skupini živali, ki so prejemale LOS, se je od 4. do 6. tedna zmanjšalo, od 6. do 8. tedna povečalo in od 8. do 10. tedna spet zmanjšalo (Preglednica VIII). Izražanje se je od 4. do 10. tedna zmanjšalo za 3,78-krat. Tedenska nihanja nivoja izražanja *NOS2* v podskupinah, ki so prejemale LOS in primerjava s kontrolno ter ostalimi podskupinami, so vidni na Sliki 12.

Izražanje *NOS2* pri zdravljenju s PER

Izražanje *NOS2* v podskupinah živali, ki so prejemale PER se je od 4. do 10. tedna ves čas rahlo povečevalo (Preglednica VIII). Izražanje se je od 4. do 10. tedna povečalo za 1,95-krat.

Na Sliki 12 vidimo nihanja nivoja izražanja *NOS2* v vseh podskupinah po tednih in primerjavo s kontrolno skupino.

Izražanje *NOS2* pri zdravljenju s kombinacijo ATO+LOS

Izražanje *NOS2* v skupini živali, ki so prejemale kombinirano terapijo ATO+LOS se je od 4. do 8. tedna povečalo za 7,9-krat, v 8. tednu doseglo najvišjo vrednost in se v 10. tednu spet znižalo (Preglednica VIII). Na Sliki 12 vidimo tedenska nihanja nivoja izražanja *NOS2* pri kombiniranem zdravljenju ATO+LOS in pri vseh ostalih podskupinah.

Izražanje *NOS2* pri zdravljenju s kombinacijo ATO+PER

Izražanje *NOS2* v skupini živali, ki so prejemale kombinirano zdravljenje ATO+PER se je od 4. do 8. tedna povečalo za 5,95-krat, v 8. tednu je doseglo najvišjo vrednost in se v 10. tednu spet znižalo (Preglednica VIII). Nihanja nivoja izražanja *NOS2* po času pri vseh podskupinah in primerjava s kontrolno skupino, so prikazani na Sliki 12. V skupini, ki je prejemala kombinacijo ATO+PER, smo v vseh štirih časovnih obdobjih izmerili nižje izražanje *NOS2* kot v kontrolni skupini.

Če povzamemo, pri nobeni od terapevtskih skupin nismo med zgodnjim in poznim obdobjem zdravljenja ugotovili statistično značilnih razlik v nivoju izražanja *NOS2*. Pri večini terapevtskih skupin smo po 4-, 6-, 8- in 10-ih tednih zdravljenja izmerili nižje izražanje *NOS2* kot v kontrolni skupini (Preglednici VIII). V primeru, da so bila ta izražanja višja, so bile razlike majhne. Tudi pri izvedbi statistične analize smo opazili le trend nižjega nivoja izražanja *NOS2* v skupinah s terapijo. Izražanje *NOS2* je povezano z imunskim odgovorom organizma, zato nismo pričakovali povečanega izražanja *NOS2*. Vsa proučevana zdravila imajo pleiotropni protivnetni učinek, v kontrolno skupino pa so bile vključene samo zdrave živali. Zato nas je presenetilo nepojasnjeno povečano izražanje *NOS2* po 8-ih tednih v kontrolni skupini. Zelo povečano nepojasnjeno izražanje smo izmerili pri kontrolni živali K7 - 55. Ker so z živaljo postopali popolnoma enako kot z ostalimi v njeni skupini in ker ni kazala nobenih znakov bolezni, smo rezultate vključili v analizo. Ker smo imeli pri našem delu opravka z majhnimi skupinami (od 1 do 4 vzorci v podskupinah (Priloga 2)) je možno, da med preiskovanimi skupinami vseeno obstaja statistično značilna razlika, čeprav je mi nismo dokazali in bi bilo študijo smiselno ponoviti na večjem številu vzorcev. Podobnih raziskav

vpliva subterapevtskih odmerkov statinov, ACE-inhibitorjev in ARB ali kombinacije na izražanje *NOS2*, razen že omenjenih pri statinih, v literaturi nismo zasledili.

3.2.2. Izražanje *NOS3* pri različnih vrstah zdravljenja

Povprečne vrednosti izražanja *NOS3* v kontrolni skupini in posameznih podskupinah glede na vrsto in trajanje zdravljenja so skupaj z vrednostmi p podane v Preglednici IX. Podatki so nazorneje prikazani z vrstičnim diagramom (Slika 13).

Preglednica IX: Primerjava izražanja *NOS3* po vrstah zdravljenja v odvisnosti od časa trajanja zdravljenja (enofaktorska Anova)

Povprečne vrednosti in standardni odkloni (\pm) izražanja *NOS3/HMBS* po vrstah, po tednih in obdobjih zdravljenja

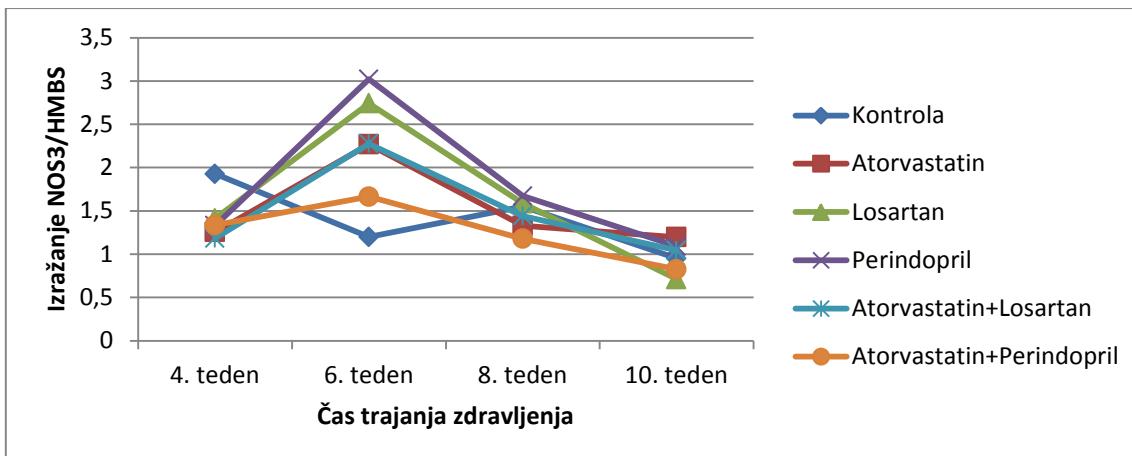
vrsta zdrav.	4.teden	6.teden	1. o.z.	8.teden	10.teden	2. o.z.	F	p *	p **
KONTR.	1,9263 $\pm 0,2987$	1,1992 $\pm 1,1042$	/	1,5493 $\pm 0,5571$	0,9502 $\pm 0,2662$	1,41722^K $\pm 0,66672$	/	/	/
ATO	1,2559 $\pm 0,6442$	2,2681 $\pm 1,1671$	1,8632 $\pm 1,0451$	1,3284 $\pm 0,0821$	1,1975 $\pm 0,9740$	1,2761 $\pm 0,495$	0,930	0,411	/
LOS	1,4120 $\pm 0,1802$	2,7411 $\pm 0,3516$	2,0765 $\pm 1,4806$	1,5860 $\pm 0,4004$	0,7105 $\pm 0,0532$	1,2359 $\pm 0,5575$	1,276	0,302	/
PER	1,3311 $\pm 0,2885$	3,0197 $\pm 0,4753$	2,3443 $\pm 0,9685$	1,6716 $\pm 0,0620$	1,0916 $\pm 0,5528$	1,3816 $\pm 0,4640$			0-1,p=0,059 0-2,p=0,996 1-2,p=0,138
ATO+	11846	2,2751	2,0570	1,4412	1,0429	1,2819	2,532	0,105	/
LOS	/ b	$\pm 0,4753$	$\pm 0,6382$	$\pm 0,2192$	$\pm 0,3197$	$\pm 0,3117$			
ATO+	1,3358	1,6645	1,5330	1,1783	0,8249	1,0369	0,988	0,390	
PER	$\pm 0,2863$	$\pm 0,8734$	$\pm 0,6590$	$\pm 0,0549$	$\pm 0,0084$	$\pm 0,1974$			

Obdobja zdravljenja (o.z): 1.-zgodnje obdobje zdravljenja (4.+6. tenen), 2.- pozno obdobje zdravljenja (8.+10. tenen) in 0-kontrolna skupina

p * predstavlja razliko v izražanju *NOS3* med obdobji 1, 2 ali 0

p ** predstavlja točno določeno razliko v izražanju *NOS3* in sicer med 0 in 1 ali 2, ali med 1 in 2, če je bila p * statistično značilna

^Knavedna je povprečna vrednost izražanja *NOS3* vseh štirih časovnih obdobij v kontrolni skupini (gre za 0-kontrolno skupino), b - 1 meritev



Slika 13: Izražanje *NOS3* po tednih v skupinah z različnimi vrstami zdravljenja in v kontrolni skupini s stolpičnim diagramom

Izražanje *NOS3* pri zdravljenju z ATO

Izražanje *NOS3* se je v skupini živali, ki so prejemale ATO od 4. do 6. tedna povečalo za 1,8-krat, v 6. tednu doseglo najvišjo vrednost in se od 8. do 10. tedna postopno znižalo (Preglednica IX). Na Sliki 13 vidimo nihanja nivoja izražanja *NOS3* po tednih trajanja zdravljenja v podskupinah, ki je prejemala ATO, v ostalih podskupinah in v kontrolni skupini. Pri analizi rezultatov smo opazili le trend povečanega nivoja izražanja *NOS3* v zgodnjem obdobju zdravljenja (Preglednica IX), kar je sovpadalo z najvišjim nivojem izražanja *NOS3* po šestih tednih zdravljenja (Slika13). Povečano izražanje *NOS3* pri inkubaciji humanih žilnih endotelijskih celic z nizkimi odmerki fulvastatina ter povečano produkcijo encima *NOS3* in nitritov navajajo v raziskovalni skupini Ozaki K. in sod. (58). V eni od raziskovalnih skupin so ugotovili, da ATO v visokih odmerkih v aortah podgan s sepsom inducira izražanje *NOS3* (57). ATO v koncentraciji ($0,1 \mu\text{M}$) poveča izražanje *NOS3* v humanih mikrovaskularnih endotelijskih celicah (HMEC-1) in prepreči znižanje *NOS3*, povzročeno s hipoksijo (59). V literaturi navajajo, da pitastatin v nižjih odmerkih poveča nastajanje NO v endotelijskih celicah, ne poveča pa izražanje *NOS3* (60). Ugotovili so tudi, da zdravljenje s subterapevtskimi odmerki fulvastatina izboljša in obnovi s staranjem povezane spremembe v arterijski steni. Funkcionalne spremembe so ocenjevali z merjenjem vazodilatacije arterij ob povečanem strižnem naporu, kasnejši učinek je sproščanje NO, ki ga tvorijo *NOS3*. Morfološke spremembe pa so ocenjevali s pomočjo parametrov za oceno rigidnosti arterijske

stene. Funkcionalne spremembe postopoma privedejo do morfoloških sprememb arterijske stene. Vsi parametri so se izboljšali že po 14 dneh, po 30 dneh je bilo izboljšanje statistično značilno. Po ukinitvi zdravljenja so se koristni učinki postopno zmanjšali, vendar je bil njihov vpliv zaznaven še 5 mesecev. Ker se vrednosti lipidov med trajanjem zdravljenja niso znižale, so koristne učinke pripisali pleiotropnim učinkom statinov (41). Med drugim so ugotovili, da zdravljenje z ATO v visokih odmerkah (10mg/kg/dan) v aortah podgan s sepso inducira izražanje *NOS3* (57).

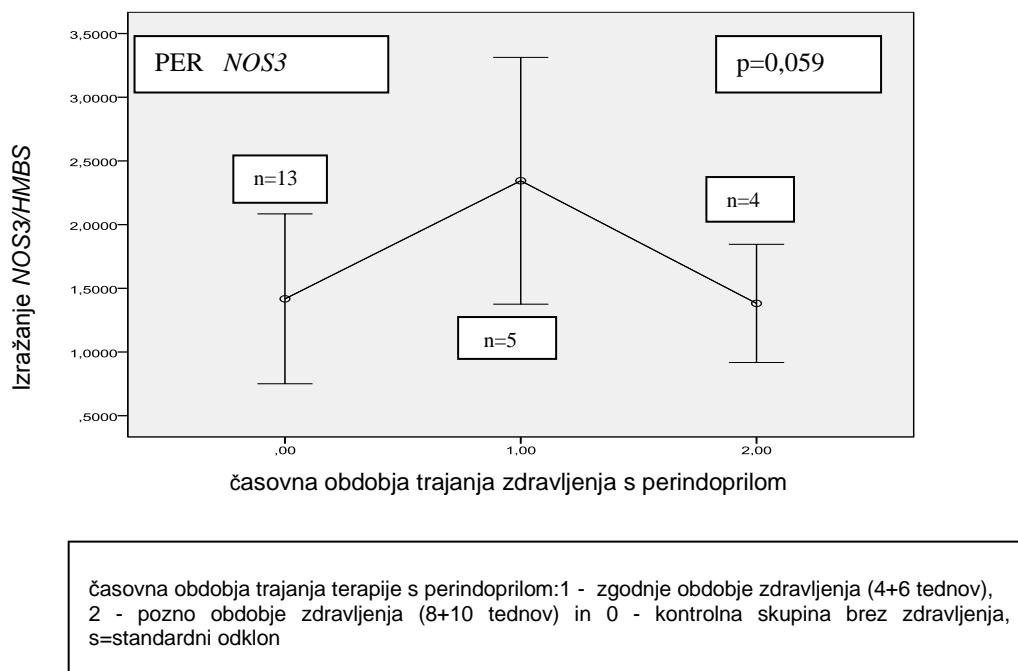
Izražanje *NOS3* pri zdravljenju z LOS

Izražanje *NOS3* se je v skupini živali, ki so prejemale LOS od 4. do 6. tedna povečalo za 1,94-krat, v 6. tednu doseglo najvišjo vrednost in se od 8. do 10. tedna postopno znižalo (Preglednica IX). Na Sliki 13 vidimo nihanja nivoja izražanja *NOS3* po tednih trajanja zdravljenja v vseh podskupinah in v kontrolni skupini. S statistično analizo smo opazili trend povečanega nivoja izražanja *NOS3* v zgodnjem obdobju zdravljenja (Preglednica IX), kar je sovpadalo z najvišjim nivojem izražanja *NOS3* po šestih tednih terapije (Slika 13). V literaturi podobnih raziskav vpliva nizkih odmerkov LOS ali drugih ARB na izražanje *NOS3* nismo zasledili. V dvojno slepi randomizirani raziskavi navajajo izboljšanje funkcijskih sprememb na arterijski steni na osnovi izmerjene vazodilatacije arterij ob povečanem strižnem naporu ter izboljšanje morfoloških sprememb, ugotovljeno z merjenjem rigidnosti arterijske stene. Do opisanih ugotovitev so prišli po 30-dnevnom zdravljenju z nizkimi odmerki valsartana pri zdravih moških srednjih let. Po prekinitti zdravljenja so se koristni učinki na arterijsko funkcijo postopno zmanjševali do 8. meseca, po tem času so postali zanemarljivi. Zaključili so, da so z leti povezane arterijske spremembe pri moških srednjih let reverzibilne in se lahko zmanjšajo s kratkotrajnim zdravljenjem z nizkimi odmerki valsartana (42).

Izražanje *NOS3* pri zdravljenju s PER

Izražanje *NOS3* v skupini živali, ki so prejemale PER se je od 4. do 6.tedna povečalo za 2,27-kra, v 6. tednu doseglo najvišjo vrednost in se potem od 8. do 10. tedna postopno znižalo (Preglednica IX). Tedenska nihanja nivoja izražanja *NOS3* v vseh podskupinah in v kontrolni skupini so prikazana na Sliki 13. V primerjavi s kontrolno skupino smo v skupini, ki je prejemala PER po 4-ih tednih izmerili nižje, po 6-, 8- in 10-ih tednih pa višje izražanje *NOS3* (Slika 13). Z enofaktorsko Anova-o smo ugotovili mejno statistično značilno razliko v izražjanju *NOS3* med zgodnjim in poznim obdobjem zdravljenja s PER ter med obdobjema in

kontrolno skupino ($p=0,059$). Mejna značilnost je obstajala med kontrolno skupino in zgodnjim obdobjem zdravljenja ($p=0,059$), standardna napaka (SE) je bila 0,3766, 95% interval zaupanja je bil med -1,8838 in 0,0297. Rezultate analize smo ponazorili tudi z grafom (Slika 14), na katerem opazimo povečano izražanje *NOS3* v zgodnjem obdobju zdravljenja. Slednje sovpada z najvišjim izmerjenim nivojem izražanja *NOS3* po šestih tednih terapije s PER (Preglednica IX), (Slika 13).



Slika 14: Izražanje *NOS3* po časovnih obdobjih pri zdravljenju s perindoprilom

Rezultati so podani kot povprečne vrednosti normaliziranih meritev izražanja *NOS3* v posameznih skupinah.

V literaturi nismo zasledili raziskave, v kateri bi ugotavljali vpliv zdravljenja z ACE-inhibitorji na izražanje *NOS3*. V eni od raziskav so ugotovili, da je dolgotrajno zdravljenje podgan, nagnjenih k možganski kapi (SHRSP), z nizkimi odmerki PER, izboljšalo srčno funkcijo (61).

Izražanje *NOS3* pri zdravljenju s kombinacijo ATO+LOS

Kot lahko vidimo v Preglednici IX, se je izražanje *NOS3* v skupini živali, ki so prejemale kombinacijo ATO+LOS od 4. do 6. tedna povečalo za 1,92-krat, v 6. tednu doseglo najvišjo vrednost in se od 8. do 10. tedna postopno znižalo. Tedenska nihanja nivoja izražanja *NOS3*

pri kombiniranem zdravljenju z ATO+LOS, v ostalih podskupinah ter v kontrolni skupini so prikazana na Sliki 13. Z enofaktorsko Anova-o smo opazili le statistično neznačilen trend povečanega izražanja *NOS3* v zgodnjem obdobju zdravljenja. V predhodni povezani študiji navajajo povečano koncentracijo NO in povečano protivnetno aktivnost, pri kombiniranem zdravljenju z ATO in LOS, vendar niso merili nivo izražanja *NOS3* (32). Z raziskavami so ugotovili izjemne aditivne/sinergijske učinke pri kombiniranem zdravljenju z nizkimi odmerki ATO in LOS, ki imajo za posledico pomembno kardiovaskularno zaščito. Sam ATO in sam LOS v istih nizkih odmerkih nista imela učinkov na izolirano aorto (62). V dvojno slepi randomizirani raziskavi so pri zdravih moških srednjih let, po 30-dnevnom zdravljenju s kombinacijo nizkih odmerkov fulvastatina (10mg) in valsartana (20mg) dnevno, ugotovili ugodne učinke na s staranjem povezano arterijsko funkcijo. Opazili so izboljšanje vazodilatacije arterij ob povečanem strižnem naporu (kasnejši učinek je nastajanje NO, ki ga tvorijo *NOS3*) ter izboljšanje parametrov za oceno rigidnosti arterijske stene. Ugoden učinek kombiniranega zdravljenja je spremljalo znižanje vrednosti visoko občutljivega C reaktivnega proteina. Vrednosti lipidov in krvnega tlaka so ostale nespremenjene. Koristni učinki zdravljenja so bili po ukinitvi zdravljenja občutno prisotni še po sedmih mesecih in so večinoma izzveneli po desetih mesecih (43).

Izražanje *NOS3* pri zdravljenju s kombinacijo ATO+PER

Izražanje *NOS3* se je v skupini živali, ki so prejemale kombinacijo ATO+PER od 4. do 6. tedna povečalo za 1,25-krat, v 6. tednu doseglo najvišjo vrednost in se od 8. do 10. tedna postopno znižalo (Preglednica IX). Na Sliki 13 so prikazana tedenska nihanja nivoja izražanja *NOS3* v vseh podskupinah in v kontrolni skupini. Z enofaktorsko Anova-o smo opazili le statistično neznačilen trend nekoliko večjega izražanja *NOS3* v zgodnjem obdobju zdravljenja (Preglednica IX). V literaturi nismo zasledili raziskav o vplivu kombiniranega zdravljenja z ACE-inhibitorjem in statinom na izražanje *NOS3* ali drugih vazoaktivnih genov.

Če povzamemo, tudi za *NOS3* pri nobeni od skupin nismo ugotovili statistično značilnih razlik v nivoju izražanja *NOS3* med zgodnjim in poznim obdobjem zdravljenja ter med obdobjema in kontrolno skupino. Mejno povišanje v zgodnjem obdobju zdravljenja glede na kontrolno skupino smo opazili le pri zdravljenju s PER. Pri vseh skupinah smo opazili najvišji nivo izražanja *NOS3* po 6-ih tednih zdravljenja, kar je sovpadalo s trendom povišanega nivoja

izražanja *NOS3* v zgodnjem obdobju zdravljenja (4.+6. teden), ki smo ga opazili pri statistični analizi (Preglednica IX). Vendar ga zaradi premajhnega števila vzorcev v posameznih podskupinah nismo uspeli statistično potrditi. Iz omenjenega smo lahko le predvidevali, da so bili morda učinki zdravljenja po 6-ih tednih največji, potem pa so se postopno zmanjševali, vendar tega kot smo že omenili statistično nismo dokazali.

Zaradi majhnih skupin (od 1 do 4 vzorci v podskupinah (Priloga 2)), je možno, da med preiskovanimi skupinami vseeno obstaja statistično značilna razlika, čeprav je nismo dokazali. Zaradi tega bi bilo smiselno tudi v primeru *NOS3* raziskavo ponoviti na večjem števili vzorcev. Podobnih raziskav vpliva subterapevtskih odmerkov statinov, ACE-inhibitorjev in ARB ali kombinacije na izražanje *NOS3*, razen že omenjenih pri statinah, v literaturi nismo zasledili.

3.3. VPLIV VRSTE IN TRAJANJA ZDRAVLJENJA NA IZRAŽANJE GENOV

V drugem delu smo s pomočjo dvofaktorske Anova-e ocenjevali vpliv vrste in časa trajanja zdravljenja na izražanje *NOS2* in *NOS3*. Zanimala nas je tudi interakcija med vrsto in časom trajanja zdravljenja. Pri analizi vpliva časa trajanja zdravljenja na izražanje genov smo med seboj primerjali zgodnje (4.+6. teden) in pozno (8.+10. teden) obdobje zdravljenja. Pri izvedbi dvofaktorske Anova-e smo vse normalizirane vrednosti najprej pomnožili s 1000 jih logaritmirali in izvedli analizo.

Izražanje *NOS2*

Z dvofaktorsko Anova-o smo ugotovili, da čas trajanja in vrsta zdravljenja nimata vpliva, na izražanje *NOS2* (Preglednica X). Prav tako ni statistično značilne interakcije med njima.

Preglednica X: Rezultati dvofaktorske Anova-e za izražanje *NOS2*

Faktor	F	p*
Čas trajanja zdravljenja (timeskrač)	3,080	0,086
Vrsta zdravljenja (th)	0,982	0,439
Interakcija med vrsto in časom zdravljenja (timeskrač * th)	0,686	0,637

p* statistična razlika v izražanju genov med zgodnjim in poznim obdobjem zdravljenja

R² = 0,222 (R²_{Adjust.} = 0,027)

S celotnega vidika se torej izražanje *NOS2* med različnimi vrstami zdravljenja ni razlikovalo. Pri posamezni primerjavi izražanja *NOS2* med skupinami pa smo ugotovili značilno razliko

med kontrolno skupino in kombiniranim zdravljenjem z ATO+PER ($p=0,042$) (Preglednica XI).

Preglednica XI: Analiza vpliva vrste zdravljenja na izražanje *NOS2* in *NOS3* (dvofaktorska Anova)

Primerjava izražanja med skupinami			
Vrsta zdr.(I) th	Vrsta zdr. (J) th	p* (<i>NOS2</i>)	p* (<i>NOS3</i>)
0 –KONTR	1 – ATO	0,288	0,399
	2 – LOS	0,294	0,361
	3 - PER	0,660	0,132
	4 – ATO+LOS	0,251	0,192
	5 – ATO+PER	0,042	0,770
1 - ATO	0 - KONTR.	0,288	0,399
	2 – LOS	0,946	0,926
	3 - PER	0,573	0,506
	4 – ATO+LOS	0,930	0,659
	5 – ATO+PER	0,302	0,602
2- LOS	0 - KONTR	0,294	0,361
	1 - LOS	0,946	0,926
	3 - PER	0,555	0,578
	4 – ATO+LOS	0,989	0,737
	5 – ATO+PER	0,371	0,550
3- PER	0 - KONTR	0,660	0,132
	1 – ATO	0,573	0,506
	2 – PER	0,555	0,578
	4 – ATO+LOS	0,519	0,812
	5 – ATO+PER	0,131	0,244
4-ATO+LOS	0 – KONTR.	0,251	0,192
	1 – ATO	0,930	0,659
	2 – PER	0,989	,737
	3 – LOS	0,519	0,812
	5 – ATO+LOS	0,343	0,338
5-ATO+PER	0 – KONTR.	0,042	0,770
	1 – ATO	0,302	0,602
	2 – LOS	0,371	0,550
	3 - PER	0,131	0,244
	4 – ATO+LOS	0,343	0,338

p* statistična razlika v izražanju genov med skupinami z različnimi vrstami zdravljenja

V Preglednici XII je prikazana analiza vpliva časa trajanja zdravljenja na izražanje *NOS2* in *NOS3*.

Preglednica XII : Analiza vpliva časa trajanja zdravljenja na izražanje *NOS2* in *NOS3* (dvofaktorska Anova)

NOS2

o.z. (I) timeskrač	o.z. (J) timeskrač	razlika (I-J)	SE	p*
1. - zgodnje	2.- pozno	-0,207	0,118	0,086
2. - pozno	1. - zgodnje	0,207	0,118	0,086

NOS3

o.z. (I) timeskrač	o.z. (J) timeskrač	razlik (I-J)	SE	p*
1 - zgodnje	2- pozno	0,136	0,070	0,056
2 - pozno	1 - zgodnje	-0,136	0,070	0,056

Obdobje zdravljenja (o.z.): 1.-zgodnje obdobje zdravljenja (4.+6. teden), 2.-pozno obdobje zdravljenja (8.+10.teden)

p* statistična razlika v izražanju *NOS2* oz. *NOS3* med zgodnjim in poznim obdobjem zdravljenja

SE: standardna napaka

V Preglednici XIII so podana povprečja faktoriranih in logaritmiranih vrednosti izražanja *NOS2* pri različnih vrstah zdravljenja v zgodnjem in pozнем obdobju.

Preglednica XIII: Povprečja faktoriranih in logaritmiranih vrednosti izražanja *NOS2/HMBS* v podskupinah v zgodnjem in poznem obdobju zdravljenja ter skupno povprečje

o. z.	Vrsta zdr.	n	Sr.v. <i>NOS2/</i> <i>HMBS</i>	s	o.z.	Vrsta zdr.	n	Sr.v. <i>NOS2/</i> <i>HMBS</i>	s	Vr. zdr.	n	Sr.v. <i>NOS2/</i> <i>HMBS</i>	s
1.	0-KONTR.	4	1,1395	0,3653	2.	0-KONTR.	7	1,3780	0,7517	0	11	1,2913	0,6273
1.	1-ATO	5	0,9644	0,3120	2.	1-ATO	5	1,1383	0,5182	1	10	1,0513	0,4135
1.	2-LOS	3	1,1736	0,2945	2.	2-LOS	5	0,9007	0,4819	2	8	1,0031	0,4212
1.	3-PER	4	1,0286	0,3753	2.	3-PER	4	1,3074	0,0366	3	8	1,1680	0,2884
1.	4-ATO+LOS	5	0,8353	0,1858	2.	4-ATO+LOS	5	1,2332	0,3918	4	10	1,0343	0,3572
1.	5-ATO+PER	4	0,6291	0,1760	2.	5-ATO+PER	5	1,0568	0,3972	5	8	0,8667	0,3759
1.	SKUPAJ	25	0,9483	0,3171	2.	SKUPAJ	31	1,1781	0,4990	SK.	56	1,0755	0,4393

Obdobje zdravljenja (o.z.): 1.-zgodnje obdobje zdravljenja (4.+6. teden), 2.-pozno obdobje zdravljenja (8.+10.teden)

n –št. vzorcev v posamezni skupini, sr.v.-povprečja izražanja v posameznih skupinah, s- standardni odklon,

Vr.zdr.:0-KONTR, 1-ATO, 2-LOS, 3-PER, 4-ATO+LOS, 5-ATO+PER, SK= skupno(združen zgodnje in pozno obdobje)

V študijah, kot smo že omenili, navajajo inhibitorne učinke statinov na izražanje *NOS2* v različnih glodalskih celicah (56,57). Vpliva nizkih odmerkov ACE-inhibitorjev in ARB na

izražanje *NOS2* v literaturi nismo zasledili. Nenadno povečano izražanje *NOS2* pri kontrolni skupini v pozнем časovnem obdobju je nepojasnjeno in obravnavano že v podpoglavlju 3.2.1..

Izražanje *NOS3*

Z dvofaktorsko Anova-o smo opazili mejno statistično značilno razliko v izražanju *NOS3* glede na čas trajanja zdravljenja in sicer znižanje izražanja *NOS3* iz zgodnjega na pozno obdobje zdravljenja ($F(1, 49)=3,824, p=0,056$) (Preglednici XIV in XII). Medtem pa se izražanje *NOS3* med različnimi terapevtskimi skupinami ni statistično značilno razlikovalo.

Preglednica XIV: Rezultati dvofaktorske Anova-e za izražanje *NOS3*

Faktor	F	p*
Čas trajanja zdravljenja (timeskrač)	3,824	0,056
Vrsta zdravljenja (th)	0,682	0,639
Interakcija med vrsto in časom zdravljenja (timeskrač * th)	0,483	0,787
$R^2 = 0,158$ ($R^2_{\text{Adj}} = -0,031$)		

p* statistična razlika v izražanju genov med zgodnjim in poznim obdobjem zdravljenja

Če gledamo s celotnega vidika, lahko vidimo, da se je izražanje *NOS3* iz zgodnjega v pozno obdobje zdravljenja znižalo pri vseh skupinah, najbolj pri zdravljenju s PER (Preglednica XV). Vendar pa je potrebno poudariti, da nobena od omenjenih posamičnih razlik ni bila statistično značilna (Preglednica XI). Ravno tako ni bilo interakcije med časom trajanja in vrsto zdravljenja.

Preglednica XV: Povprečja faktoriranih in logaritmiranih vrednosti izražanja *NOS3/HMBS* v podskupinah v zgodnjem in pozнем obdobju zdravljenja ter skupno povprečje

o. z.	Vrsta zdr. z.	n	Sr.v. <i>NOS3/ HMBS</i>	s	o. z.	Vrsta zdr. z.	n	Sr.v. <i>NOS3/ HMBS</i>	s	Vr. zdr.	n SK	SK Sr.v. <i>NOS3/ HMBS</i>	s
1.	0-KONTR.	6	3,0071	0,6295	2.	0-KONTR.	7	3,0830	0,1668	0.	13	3,0479	0,4249
1.	1-ATO	5	3,2134	0,2520	2.	1-ATO	5	3,0701	0,2146	1	10	3,1418	0,2332
1.	2-LOS	4	3,2514	0,2580	2.	2-LOS	5	3,0553	0,2016	2	9	3,1425	0,2365
1.	3-PER	5	3,3344	0,2054	2.	3-PER	4	3,1156	0,1820	3	9	3,2372	0,2164
	4-					4-							
1.	ATO+LOS	5	3,2942	0,1484	2.	ATO+LOS	5	3,0964	0,1151	4	10	3,1953	0,1629
	5-					5-							
1.	ATO+PER	5	3,1478	0,2116	2.	ATO+PER	5	3,0091	0,0859	5	10	3,0785	0,1689
1.	SKUPAJ	30	3,1999	0,3350	2.	SKUPAJ	31	3,0709	0,1558	SK.	61	3,1343	0,2657

(o.z.)-obdobje zdravljenja: 1.-zgodnje obdobje zdravljenja (4.+6. teden), 2.-pozno obdobje zdravljenja (8.+10.teden)

n –št. vzorcev v posamezni skupini, sr.v.-povprečja izražanja v posameznih skupinah, s- standardni odklon

Vr.zdr.:0-KONTR, 1-ATO, 2-LOS, 3-PER, 4-ATO+LOS, 5-ATO+PER, SK= skupno (zdržen zgodnje in pozno obdobje)

Na Preglednici XIV lahko vidimo, da je bilo v zgodnjem obdobju zdravljenja pri vseh podskupinah, izražanje *NOS3*, višje kot v kontrolni skupini. V pozнем obdobju zdravljenja pa je pri vseh skupinah nivo izražanja gena znižal, na vrednost, podobno kontrolni skupini.

Opaženi trendi sprememb sovpadajo z izmerjenim najvišjim nivojem izražanja *NOS3* po 6-ih tednih pri vseh vrstah zdravljenja kot smo že omenili v poglavju 3.2.2. (Slika 13) (Preglednica IX). V literaturi podobnih raziskav vpliva subterapevtskih odmerkov statinov, ACE-inhibitorjev in ARB ali kombinacije na izražanje *NOS3*, razen že omenjenih pri statinah nismo zasledili. Navajajo pa, kot smo ravno tako že omenili, izboljšanje funkcijskih in morfoloških sprememb v arterijski steni po 30-dnevni terapiji z nizkimi odmerki valsartana pri zdravih moških srednjih let (42). Ter ugodne učinke na s staranjem povezano arterijsko funkcijo pri zdravih moških srednjih let, po 30-dnevni terapiji s kombinacijo nizkih odmerkov fulvastatina in valsartana dnevno (43).

3.4. FUNKCIJSKE LASTNOSTI TORAKALNE AORTE V ODVISNOSTI OD IZRAŽANJA GENOV

Funkcijske lastnosti torakalne aorte smo ovrednotili z izmerjenima odstotkoma največje možne konstrikcije (KONSTR) in največje možne relaksacije (RELAKS) v obročkih torakalnih podganjih aort.

V prvem delu tega poglavja smo žeeli ugotoviti, kako se pri posameznih vrstah zdravljenja izražanje proučevanih genov spreminja po tercilih KONSTR in RELAKS. Mejne vrednosti sta predstavljali 33. in 67. tercil vseh vrednosti največje možne konstrikcije oziroma relaksacije. V okviru teh meja, smo vrednosti razdelili v skupine z najmanjšim, srednjim in največjim KONSTR oz. RELAKS ter izvedli statistične analize. Razdelitev vzorcev po tercilih KONSTR oz. RELAKS je podana v Prilogah 5 in 6.

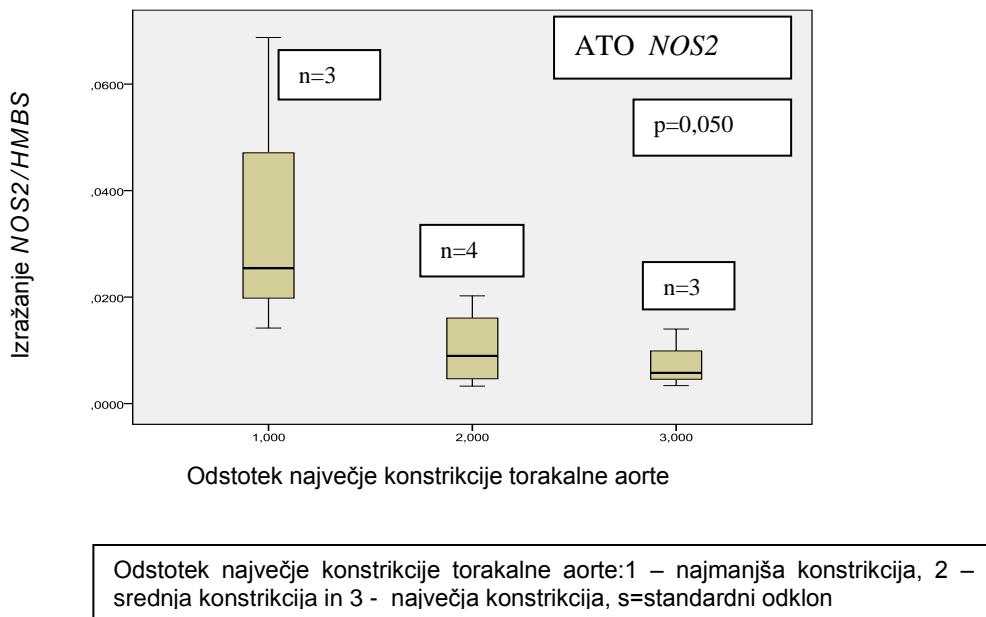
V nadaljevanju smo s korelacijo ugotavljali povezavo med izražanjem proučevanih genov in funkcijskimi sposobnostmi podganje torakalne aorte (KONSTR in RELAKS) najprej ne glede na vrsto zdravljenja nato pa pri posameznih vrstah zdravljenja. Ravno tako smo žeeli ugotoviti ali izražanja genov pri posamezni vrsti zdravljenja korelirajo med seboj. Ker se

podatki niso porazdeljevali normalno, smo rezultate vrednotili s pomočjo Spearman-ovega korelacijskega koeficienta (r_s).

3.4.1. Vpliv izražanja *NOS* na KONSTR in RELAKS

Analiza izražanja pri *NOS2*

Pri zdravljenju z ATO smo z neparametričnim Mann-Whitney testom pokazali, da so bile razlike med vrednostmi zražanja *NOS2*, razporejenimi v skupino z najmanjšim in skupino z največjim KONSTR ($U=0,000$; $p=0,050$). Z manjšanjem KONSTR (glede na razdelitev po tercilih) se je povečeval nivo izražanja *NOS2*. Na Sliki 15 in v Preglednici XVI, lahko vidimo, da so bili vzorci z višjim izražanjem *NOS2* razporejeni v skupino z najmanjšim KONSTR. Z neparametričnim Kruskall-Wallis-ovim testom je bila statistična razlika blizu značilnosti, vendar neznačilna ($\text{Chi-Sq}=4,818$; $p=0,090$).



Slika 15: Vpliv izražanja *NOS2* na odstotek največje konstrikcije pri zdravljenju z atorvastatinom

Preglednica XVI: Izražanje *NOS2* v odvisnosti od **KONSTR** pri različnih vrstah zdravljenja (enofaktorska Anova)

vrsta zdr.	Povprečna izražanja <i>NOS2/HMBS</i> in standardni odkloni (\pm) pri posameznih tercilih KONSTR			Enofaktorska Anova			Neparametrična testa	
	1. tercil	2. tercil	3. tercil	F	p *	p **	p Kruskal Wallis p(K-W) p Mann-Whitney p(M-W)	
ATO	0,03612 $\pm 0,0288$	0,0104 $\pm 0,0075$	0,0077 $\pm 0,0056$	2,833	0,126	/	p(K-W):(Chi-Sq=4,818; p=0,090) p(M-W): (U=0,000; Z= - 1,964; p=0,050 ; med1. in 3.ter.)	
LOS	0,0113 $\pm 0,0054$	0,0204 $\pm 0,0150$	0,0102 $\pm 0,0100$	0,659	0,557	/	/	
PER	0,0132 $\pm 0,0060$	0,0211 $\pm 0,0021$	0,0186 $\pm 0,0134$	0,490	0,639	/	/	
ATO+LOS	0,0144 $\pm 0,0142$	0,0264 $\pm 0,0282$	0,0088 $\pm 0,0051$	0,706	0,530	/	p(K-W): (Chi-Sq=1,067; p=0,587)	
ATO+PER	0,0112 $\pm 0,0037$	0,0134 $\pm 0,1544$	0,0035 $\pm 0,0012$	0,540	0,609	/	/	

Tercili (ter.): 1. - najmanjše vrednosti KONSTR, 2. - srednje velike vrednosti KONSTR, 3. - največje vrednosti KONSTR
 p* predstavlja razliko v izražanju *NOS2* med različnimi tercili KONSTR
 p** pove med katerimi tercili KONSTR so bile razlike v izražanju *NOS2* in sicer med 1. in 2. Ali med 1. in 3. ali med 2. in 3. tercilom, če je p* bila statistično značilna, uporabili smo Tukey-ev test
 p vrednosti p enofaktorske Anova-e ne moremo upoštevati zaradi kršenja predpostavke o homogenosti varianc, ki mora veljati za Anova-o (Leveneov test: p<0,05)

Nismo pa pri zdravljenju z ATO dokazali statistično značilnih razlik v izražanju *NOS2* med vrednostmi izražanja razporejenimi v skupine z najmanjšim, srednjim in največjim RELAKS (Preglednica XVII).

Preglednica XVII: Izražanje *NOS2* v odvisnosti od **RELAKS** pri različnih vrstah zdravljenja (enofaktorska Anova)

vrsta zdr.	1. tercil	2. tercil	3. tercil	F	p*	p**	Neparametrična testa
							pKruskal Wallis
ATO	0,0325 ±0,0333	0,0115 ±0,0038	0,0098 ±0,0091	1,433	0,301	/	p(K-W): (Chi-Sq=0,891; p=0,641)
LOS	0,0107 ±0,0096	0,0169 ±0,0113	0,0158 ±0,0111	0,203	0,823	/	/
PER	0,0132 ±0,0060	0,0237 ±0,0062	0,0135 ±0,0129	1,603	0,290	/	/
ATO+LOS	0,0267 ±0,0280	0,0143 ±0,0144	0,0086 ±0,0041	0,760	0,508	/	p(K-W): (Chi-Sq=1,867, p=0,393)
ATO+PER	0,0143 ±0,0188	0,0088 ±0,0531	0,0083 ±0,0050	0,247	0,788	/	p(K-W): (Chi-Sq=0,089; p=0,957)

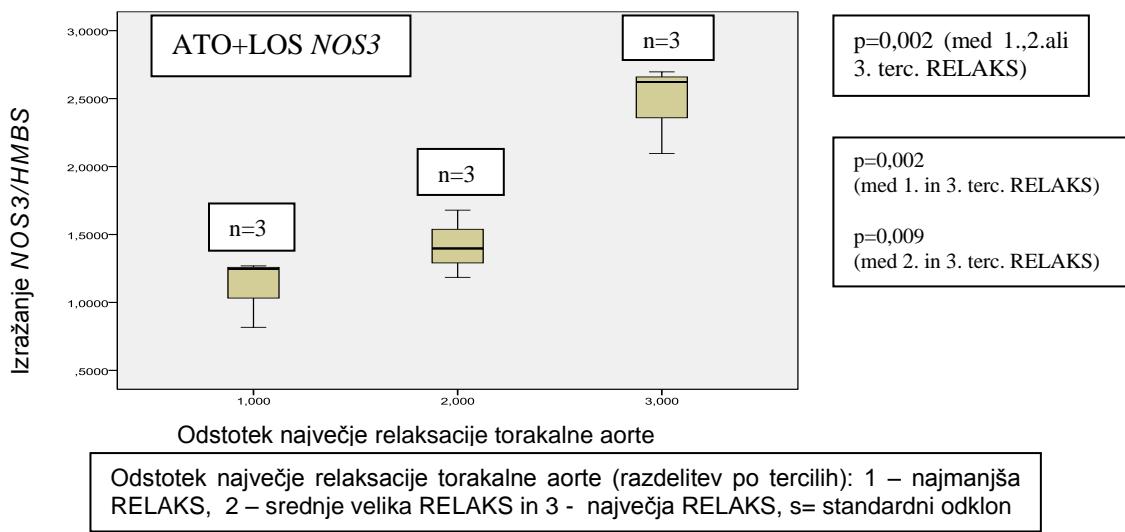
Tercili (ter.): 1. - najmanjše vrednosti RELAKS, 2. - srednje velike vrednosti RELAKS
 p* predstavlja razliko v izražanju *NOS2* med različnimi tercili RELAKS
 p** pove med katerimi tercili RELAKS so bile razlike v izražanju *NOS2* in sicer med 1. in 2. ali med 1. in 3. ali med 2. in 3. tercilom, če je p* bila statistično značilna, uporabili smo Tukey-ev test
 p vrednosti p enofaktorske Anova-e ne moremo upoštevati zaradi kršenja predpostavke o homogenosti varianc, ki mora veljati za Anova-o (Leveneov test: p<0,05)

Podobnih raziskav funkcijskih lastnosti arterijske stene v povezavi z izražanjem *NOS2* v literaturi nismo zasledili.

Pri zdravljenju z ostalimi zdravili oziroma kombinacijami zdravil (LOS, PER, ATO+LOS in ATO+PER) nismo potrdili statistično značilnih razlik, v izražanju *NOS2* med skupinami z najmanjšim, srednjim in največjim KONSTR in tudi med skupinami z najmanjšim, srednjim in največjim RELAKS (Preglednici XVI in XVII).

Analiza izražanja pri NOS3

Le pri zdravljenju s kombinacijo ATO+LOS smo z enofaktorsko Anova-o ugotovili razliko med izražanjem *NOS3* med skupinami z najmanjšim, srednjim in največjim RELAKS ($p=0,002$) (Slika 16) (Preglednica XVIII). Razlika je obstajala med skupinama z najmanjšim in največjim ($p=0,002$), ($SE=0,2279$, 95% interval zaupanja je bil med -2,0599 in -0,6612) ter med skupinama s srednjim in največjim ($p=0,009$), ($SE=0,2279$, 95% interval zaupanja je bil med -1,7507 in -0,3519) tercilogom RELAKS. Če povzamemo se je pri zdravljenju s kombinacijo ATO+LOS z večanjem RELAKS (glede na razdelitev po tercilih) povečeval nivo izražanja *NOS3* (Slika 16).



Slika 16: Vpliv izražanja *NOS3* na odstotek največje relaksacije pri kombinirani terapiji atorvastatina in losartana

Preglednica XVIII: Izražanje *NOS3* v odvisnosti od **RELAKS** pri različnih vrstah zdravljenja (enofaktorska Anova)

Povprečna izražanja <i>NOS3/HMBS</i> in standardni odkloni (\pm) pri posameznih tercilih RELAKS						Enofaktorska Anova	Neparametrična testa
vrsta zdr.	1.-tercil	2.-tercil	3.-tercil	F	p *	p **	p Kruskal Wallis p(K-W) p Mann-Whitney p(M-W)
ATO	1,2482 $\pm 0,6943$	1,4368 $\pm 0,6352$	2,0683 $\pm 1,2068$	0,775	0,496	/	/
LOS	1,0770 $\pm 0,3500$	3,1606 $\pm 1,8740$	1,5908 $\pm 0,4232$	0,693	0,536	/	p(K-W): (Chi-Sq=1,689, p=0,430)
PER	1,3816 $\pm 0,2219$	2,1267 $\pm 0,7895$	2,2410 $\pm 1,3794$	0,761	0,507	/	/
ATO+LOS	1,1110 $\pm 0,2550$	1,4203 $\pm 0,2480$	2,4716 $\pm 0,3275$	19,581	0,002	1-2 p=0,418 1-3 p=0,002 2-3 p=0,009	/
ATO+PER	1,2967 $\pm 0,2134$	1,3019 $\pm 0,7255$	1,2507 $\pm 0,6453$	0,007	0,993	/	/

Tercili 8ter.): 1. - najmanjše vrednosti RELAKS, 2. - srednje velike vrednosti RELAKS, 3. - največje vrednosti RELAKS

*p predstavlja razliko v izražanju *NOS3* med različnimi RELAKS

p** pove med katerimi tercili RELAKS so bile razlike v izražanju *NOS3/HMBS* in sicer med 1. in 2. ali med 1. in 3. ali med 2. in 3. tercilm, če je p* bila statistično značilna, uporabili smo Tukey-ev test

p vrednosti p enofaktorske Anova-e ne moremo upoštevati zaradi kršenja predpostavke o homogenosti varianc, ki mora veljati za Anova-o (Leveneov test: p<0,05)

Raziskav funkcijskih lastnosti arterijske stene v povezavi z izražanjem *NOS3* v literaturi nismo zasledili. Navajajo pa, da je kombinacija nizkih odmerkov fulvastatina in valsartana izboljšala vazodilatacijo ob povečanem strižnem naporu in spremenljivke za oceno rigidnosti arterijske stene (43). Na podganjem modelu so tudi ugotovili, da je kombinirano zdravljenje z nizkimi odmerkov ATO in LOS povečalo od endotelija odvisno relaksacijo. Sočasno so zaznali tudi povečano protivnetno aktivnost in porast NO (32).

Pri podskupinah, ki so prejemale ostale vrste zdravil oz. kombinacijo zdravil (ATO, LOS, PER in kombinacijo ATO+PER) ni bilo razlik med vrednostmi izražanja *NOS3*, razporejenimi med skupinami z najmanjšim, srednjim in največjim KONSTR (Preglednica XIX) in tudi med skupinami z najmanjšim, srednjim in največjim RELAKS (Preglednica XVIII).

Preglednica XIX: Izražanje *NOS3* v odvisnosti od **KONSTR** pri različnih vrstah zdravljenja (enofaktorska Anova)

Povprečna izražanja <i>NOS3/HMBS</i> in standardni odkloni (\pm) pri posameznih tercilih KONSTR				Enofaktorska Anova			Neparametrična testa
vrsta zdr.	1. tercil	2. tercil	3. tercil	F	p *	p **	p Kruskal Wallis-ov p(K-W) pMann-Whitney p(M-W)
ATO	1,4912 $\pm 0,3466$	1,3245 $\pm 0,7536$	1,9750 $\pm 1,3263$	0,482	0,637	/	/
LOS	2,2556 $\pm 1,7595$	1,2198 $\pm 0,4758$	1,3531 $\pm 0,6483$	0,764	0,506	/	p(K-W): (Chi-Sq=0,267 p=0,875)
PER	1,3815 $\pm 0,2219$	1,9262 $\pm 1,3433$	2,4415 $\pm 0,7295$	1,060	0,404	/	/
ATO+LOS	2,0384 $\pm 0,6145$	1,5870 $\pm 0,9849$	1,3775 $\pm 0,2645$	0,724	0,523	/	/
ATO+PER	1,4229 $\pm 0,4607$	0,8879 $\pm 0,2304$	1,6763 $\pm 0,6235$	2,948	0,118	/	/

Tercili (ter.): 1. - najmanjše vrednosti KONSTR, 2. - srednje velike vrednosti KONSTR, 3. - največje vrednosti KONSTR

p* predstavlja razliko v izražanju *NOS3/HMBS* med različnimi tercili KONSTR

p** pove med katerimi tercili KONSTR so bile razlike v izražanju *NOS3/HMBS* in sicer med 1. in 2. ali med 1. in 3. ali med 2. in 3. tercilm, če je p* bila statistično značilna, uporabili smo Tukey-ev test

p vrednosti p enofaktorske Anova-e ne moremo upoštevati zaradi kršenja predpostavke o homogenosti varianc, ki mora veljati za Anova-o (Leveneov test: p<0,05)

V literaturi navajajo izboljšanje funkcijskih in morfoloških lastnosti arterijske stene ob različnih vrstah zdravljenja, vendar sočasnega merjenja izražanja *NOS3* nismo zasledili. Zdravljenje s subterapevtskimi odmerki fulvastatina je pri domnevno zdravih osebkih srednjih let izboljšala vazodilatacijo arterij ob povečanem strižnem naporu (kasnejši učinek je sproščanje NO, ki ga tvorijo *NOS3*). Hkrati so se izboljšali parametri za oceno rigidnosti arterijske stene, ki služijo oceni morfoloških sprememb arterijske stene (41). Nizki odmerki valsartana so pri zdravih moških srednjih let po 30-ih dneh izboljšali funkcijске lastnosti arterijske stene s povečano vazodilatacijo arterij ob povečanem strižnem naporu. Obenem so se znižale vrednosti spremenljivk za oceno rigidnosti arterijske stene, kar je nakazovalo na izboljšanje morfoloških sprememb (42).

3.4.2. Ocena povezanosti funkcijskih lastnosti aorte in izražanja NOS

Korelacijska analiza pri NOS2

Korelacijska analiza pri NOS2 ne glede na vrsto zdravljenja

Pri izvedbi korelacijske analize ne glede na vrsto zdravljenja nismo našli nobenih značilnih povezav med nivojem izražanja NOS2 in KONSTR. Prav tako nismo našli nobenih značilnih povezav med nivojem izražanja NOS2 in RELAKS (Preglednica XX).

Preglednica XX: Koeficienti korelacije med izražanjem NOS2 oz. NOS3 in KONSTR oz. RELAKS (živali združene ne glede na vrsto zdravljenja)

	Korelacija po Spearmanu	
	r _s	p*
NOS2/KONSTR	-0,053	0,703
NOS2/RELAKS	-0,074	0,591
NOS3/KONSTR	0,093	0,479
NOS3/RELAKS	0,294	0,022

p *pove ali izražanja genov statistično značilno korelirajo s KONSTR oz. z RELAKS ne glede na vrsto zdravljenja

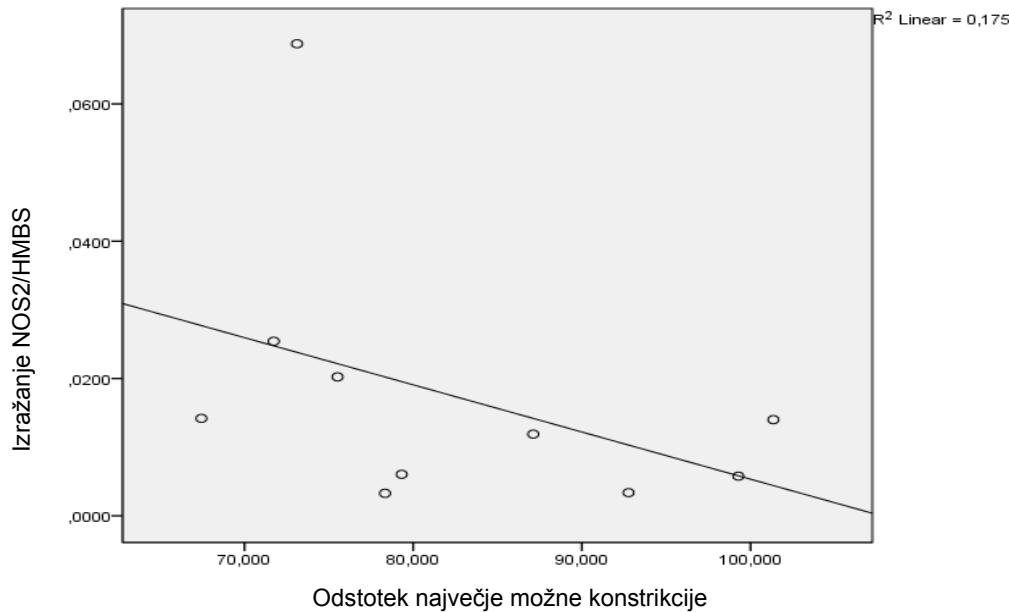
Korelacijska analiza pri NOS2 pri posameznih vrstah zdravljenja

Pri izvedbi korelacijske analize pri posameznih vrstah zdravljenja smo ugotovili, da je v skupini, ki je prejemala ATO, obstajala mejna negativna korelacija po Spearmanu med nivojem izražanja NOS2 in KONSTR ($r_s=-0,588$, $p=0,074$) (Preglednica XXI). Z naraščanjem KONSTR se je nivo izražanja NOS2 v torakalni podganji aorti zmanjševal. (Slika 17). Obenem pa v skupini, ki je prejemala ATO nismo ugotovili nobene korelacije med izražanjem NOS2 in RELAKS.

Preglednica XXI: Koeficienti korelacije med izražanjem *NOS2* in KONSTR oz. RELAKS pri različnih vrstah zdravljenja

Vrsta zdr.		Korelacija po Spearmanu	
		r_s	p^*
ATO	<i>NOS2/KONSTR</i>	-0,588	0,074
	<i>NOS2/RELAKS</i>	0,333	0,347
LOS	<i>NOS2/KONSTR</i>	-0,310	0,456
	<i>NOS2/RELAKS</i>	0,143	0,736
PER	<i>NOS2/KONSTR</i>	0,476	0,233
	<i>NOS2/RELAKS</i>	0,333	0,420
ATO+LOS	<i>NOS2/KONSTR</i>	0,100	0,789
	<i>NOS2/RELAKS</i>	-0,533	0,139
ATO+PER	<i>NOS2/KONSTR</i>	-0,517	0,154
	<i>NOS2/RELAKS</i>	0,083	0,831

p *pove ali izražanje *NOS2* statistično značilno korelira s KONSTR oz. z RELAKS pri različnih vrstah zdravljenja



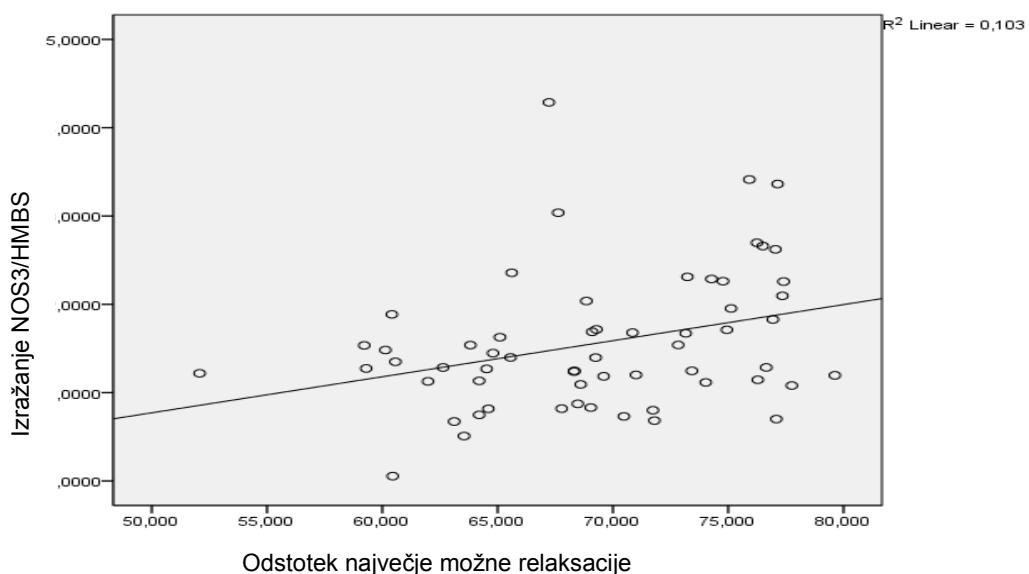
Slika 17: Korelacija med nivojem izražanja *NOS2* in odstotkom največje možne konstrikcije torakalne aorte pri zdravljenju z atorvastatinom

Ravno tako v vseh ostalih skupinah, ki so prejemale LOS, PER in kombinaciji ATO+LOS in ATO-PER med nivojem izražanja *NOS2* in KONSTR oziroma RELAKS nismo našli nobenih statistično značilnih povezav (Preglednica XXI).

Koreacijska analiza pri NOS3

Koreacijska analiza pri NOS3 ne glede na vrsto zdravljenja

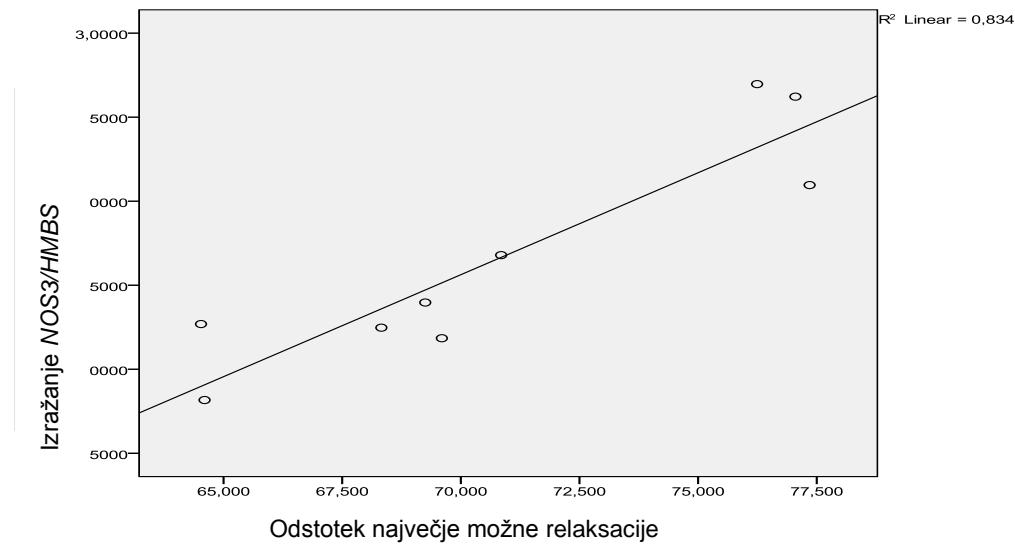
Z izvedbo koreacijske analize, če smo živali združili ne glede na vrsto zdravljenja, smo ugotovili, da nivo izražanja *NOS3* značilno pozitivno korelira z RELAKS, s koreacijskima koeficientoma po Spearmanu ($r_s=0,294$, $p=0,022$) (Slika 18), (Preglednica XX). Z večanjem odstotka največje relaksacije se je večal nivo izražanja *NOS3*.



Slika 18: Korelacija med nivojem izražanja *NOS3* in odstotkom največje relaksacije torakalne aorte ne glede na vrsto zdravljenja

Korelacija izražanja NOS3 z relaksacijo aorte glede na vrsto zdravljenja

Pri izvedbi koreacijske analize pri posameznih vrstah zdravljenja smo ugotovili, da je v skupini, ki je prejemala kombinacijo ATO+LOS obstajala statistično značilna pozitivna povezava med nivojem izražanja *NOS3* in RELAKS po Spearmanu ($r_s=0,767$, $p=0,016$) (Slika 18) (Preglednica XXII). Z naraščanjem odstotka največje možne relaksacije je naraščal tudi nivo izražanja *NOS3* (Slika 19). Med tem pa pri tej vrsti zdravljenja nismo našli nobene statistično značilne povezave med izražanjem *NOS3* in KONSTR.



Slika 19: Korelacija izražanja *NOS3* z odstotkom največje možne relaksacije torakalne aorte pri kombiniranem zdravljenju z atorvastatinom in losartanom

Preglednica XXII: Koeficienti korelacije med izražanjem *NOS3* in KONSTR oz. RELAKS pri različnih vrstah zdravljenja

Vrsta. zdr.		Korelacija po Spermanu	
		r_s	p
ATO	<i>NOS3/KONSTR</i>	0,176	0,627
	<i>NOS3/RELAKS</i>	0,164	0,651
LOS	<i>NOS3/KONSTR</i>	-0,167	0,668
	<i>NOS3/RELAKS</i>	0,383	0,308
PER	<i>NOS3/KONSTR</i>	0,550	0,125
	<i>NOS3/RELAKS</i>	0,417	0,265
ATO+LOS	<i>NOS3/KONSTR</i>	-0,283	0,460
	<i>NOS3/RELAKS</i>	0,767	0,016
ATO+PER	<i>NOS3/KONSTR</i>	0,297	0,405
	<i>NOS3/RELAKS</i>	-0,248	0,489

p *pove ali izražanje *NOS3* statistično značilno korelira s KONSTR oz. z RELAKS pri različnih vrstah zdravljenja

Ravno tako v vseh ostalih skupinah, ki so prejemale ATO, LOS, PER in kombinacijo ATO+PER med nivojem izražanja *NOS3* in KONSTR oziroma RELAKS nismo našli nobenih statistično značilnih korelacijs (Preglednica XXII).

4. SKLEPI

Sklepi naše raziskave so naslednji:

NOS2:

- Pri zdravljenju z ATO so imeli vzorci aort z visokim izražanjem *NOS2* manjšo konstrikcijo ($p=0,05$) in obstajala je mejna negativna korelacija med izražanjem *NOS2* in kontraktilenostjo torakalne aorte ($r_s = -0,588$, $p=0,074$).
- Na splošno, čas trajanja in vrsta zdravljenja nista imela vpliva na izražanje *NOS2*. Pri posamični primerjavi skupin pa je obstajala razlika v izražanju *NOS2*, med kontrolno skupino in kombiniranim zdravljenjem z ATO+PER ($p=0,042$).

NOS3:

- Pri *NOS3* smo ugotovili, da je imela skupina živali, ki je prejemala PER mejno značilno višje izražanje *NOS3* ($p=0,059$), v tkivu torakalne aorte v zgodnjem obdobju zdravljenja kot kontrolna skupina.
- Ugotovili smo, da je čas, ne glede na vrsto zdravljenja, mejno značilno vplival na izražanje *NOS3* ($p=0,056$). Izražanje *NOS3* se je iz zgodnjega (4.+6. teden) na pozno (8.+10.teden) obdobje zdravljenja zmanjšalo. Glede na vrsto zdravljenja pa statistično značilnih razlik v nivoju izražanja *NOS3* nismo ugotovili.
- Pri kombiniranem zdravljenju z ATO+LOS so imeli vzorci aort z visokim izražanjem *NOS3* večjo relaksacijo ($p=0,002$) in obstajala je pozitivna korelacija med nivojem izražanja *NOS3* v aorti in odstotkom največje možne relaksacije v žili ($r_s = 0,767$, $p=0,016$).
- Ugotovili pa smo tudi, da je ne glede na vrsto zdravljenja nivo izražanja *NOS3* v torakalni aorti pozitivno koreliral z odstotkom največje možne relaksacije ($r_s=0,29$, $p=0,022$).

Na podlagi naših rezultatov lahko sklepamo, da nizki odmerki kombinacije ATO+PER vplivajo na izražanje *NOS2*, nizki odmerki PER pa na izražanje *NOS3*. Vpliv na klinične

učinke zdravljenja smo dokazali pri *NOS2*, le pri zdravljenju z ATO, s kontrakcijo aorte, pri *NOS3* pa z relaksacijo aorte, ne glede na vrsto zdravljenja.

Glavno težavo naše raziskave je predstavljalo, da smo v večih analizah lahko ugotovili le mejne statistične značilnosti rezultatov ali statistično nepotrjene tende, ki so nakazovali na vpliv proučevanih zdravil na izražanje *NOS2* in *NOS3*. To mejno statistično značilnost rezultatov pripisujemo premajhnemu številu vzorcev, kar predstavlja jasna navodila za kasnejše klinične študije, ki pa morajo biti opravljene na zadostnem številu preiskovancev. Prav tako v naših statističnih analizah nismo ocenjevali napake 1. vrste in zato smo morda spregledali lažne statistično-značilne povezave, kar ponovno nakazuje na nujnost vključevanja dovolj velikega števila preiskovancev v poznejših kliničnih študijah.

V prihodnosti bi lahko raziskave usmerili tudi v raziskovanje proteinov, NO-sintaz. Smiselno bi bilo raziskati, koliko izraženega gena se dejansko prevede v protein in oceniti različne učinke postranslacijskih modifikacij ter ostalih dejavnikov, ki vplivajo na tvorbo proteinov.

Poleg tega bi lahko proučevali protektivne učinke nizkih odmerkov statinov, ACE-inhibitorjev in ARB ter njihovih kombinacij, pri živalih hranih z nezdravo hrano, ki povečuje tveganje za razvoj srčnožilnih bolezni.

Zaključimo lahko, da izsledki naše raziskave kažejo na protektivne pleiotropne vaskularne učinke statinov, antagonistov receptorjev za angiotenzinII in ACE-inhibitorjev in njihovih kombinacij v subterapevtskih odmerkih, ki so posredovani preko aktivacije *NOS2* in *NOS3*.

5. LITERATURA

1. Byrne Habič B., Mravljak J., Pečar S.: Dušikov oksid I: Lastnosti, kemična reaktivnost in nastajanje NO v organizmu. Farmacevtski vestnik 2004; 55:469-478.
2. Vallance P., Leiper J.: Blocking NO synthesis: How, where, and why?.(Nature Publishing Group) Nature Rewievs/Drug discovery, 2002; 939-950. www.nature.com/reviews/drugdisc (2.6.2012)
3. Hoit D.B.: Two Faces of Nitric Oxide. Lessons, Learned From the NOS2 Knockout. MD, Division of Cardiology, Case Western Reserve University, Cleveland. <http://circres.ahajournals.org/content/89/4/289.full> (10.12.2011)
4. <http://www.motifolio.com/5111368.html> (20.6.2012)
5. Ignarro L.J.: Nitric Oxide: Biology and Pathobiology, Ilustrated Edition, Chapter 32, Academic Press, 2000: 503-524.
6. Mravljak J., Byrne Habič B., Pečar S.: Dušikov oksid II: Biološki učinki in učinkovine, ki sproščajo NO. Farmacevtski vestnik, 2005; 56:11-16.
7. Wikipedia the Free Encyclopedia, http://en.wikipedia.org/wiki/Nitricoxide_syntase. (17.10.2011)
8. Kejing C., Popel S. A.: Vascular and Perivascular NO Release transport: biochemical Pathways of NOS1 and NOS3. Free Radical Biol. Med., 2007; 42:811-822.
9. Stark T. J., Schaeffer J.D., Gross R. D.: Response to: endomyocardial nitric oxide synthase and the hemodynamic phenotypes of human dilated cardiomyopathy and of athlete's heart. Cardiovascular Research, 2002; 55:225-228.
10. Schulz R., Kelm M., Heusch G.: Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury. Cardiovascular Research, 2004; 61:402-413.
11. Gene Card, Weizmann Institute of science z Life Map Science, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NOS1>. (20.1.2014)
12. Gene Card, Weizmann Institute of science z Life Map Science, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NOS2>. (2.6.2012)
13. Gene Card, Weizmann Institute of science z Life Map Science, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NOS3>. (5.6.2012)

14. Ignarro L.J.: Nitric Oxide: Biology and Pathobiology, Illustrated Edition, Chapter 6, Academic Press, 2000: 91-104.
15. T1D/Base, http://www.t1dbase.org/page/Overview/display/gene_id/4843 (2.6.2012)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=4843>. (2.6.2012)
16. Uni Prot KB, <http://www.uniprot.org/uniprot/Q06518>. (2.6.2012)
17. Ignarro L.J.: Nitric Oxide: Biology and Pathobiology, Illustrated Edition, Chapter 8, Academic Press, 2000: 129-156.
18. Kopincova J., Puzserova A., Bernatova I.: Biochemical aspect of nitric oxide synthase feedback regulation by nitric oxide. Interdisciplinary toxicology, 2011; 4: 63-68.
19. Uni Prot KB, <http://www.uniprot.org/uniprot/P35288>. (3.6.2012)
20. Ignarro L.J.: Nitric Oxide: Biology and Pathobiology, Illustrated Edition, Chapter 7, Academic Press, 2000: 105-128.
21. T1D/Base, http://t1dbase.org/page/Overview/display/gene_id/4846. (5.6.2012)
22. Ignarro L.J.: Nitric Oxide: Biology and Pathobiology, Illustrated Edition, Chapter 33, Academic Press, 2000: 525-545.
23. Šabović M.: Zmanjšanje oksidativnega stresa v arterijski steni: (Nova) možnost preprečevanja in zdravljenja ateroskleroze. 6. Fajdigovi dnevi, Kranjska Gora, 8-9.10.2004.
24. Žižek B.: Esencialna arterijska hipertenzija – okvare tarčnih organov in pomen zgodnjega odkrivanja. Medicinski razgledi 2007;46:133-14.
25. Sketelj J.: Arterijska hipertenzija, Temelji patološke fiziologije, Univerza v Ljubljani, MF, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2009: 169-174.
26. Bajrović F. Fajko, Šuput D.: Ateroskleroz, Temelji patološke fiziologije, Univerza v Ljubljani, MF, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2009: 175-184.
27. Bresjanc M., Rupnik M.: Patofiziologija s temelji fiziologije, (Bunc M., Šuput D.: Ateroskleroz), 3. izd., MF, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2002: 29-32.
28. Košnik M., Mrevlje F., Štajer D., Černelč P., Koželj M.: Interna medicina, 3. Kardiologija, 4.izd., Littera Picta d.o.o., Slovensko medicinsko društvo, Ljubljana,1998: 113-351.

29. Lunder M., Kuhar P., Drevenšek G.: Preprečevanje in zdravljenje ateroskleroze. Medicinski mesečnik, 9/2007; 293-299.
30. Lunder M., Žiberna L., Drevenšek G., Šabovič M.: Zaščitni pleiotropni učinki statinov. Zdravstveni vestnik 2011; 80: 39-49.
31. Lunder M., Žiberna L., Janič M., Jerin A., Skitek M., Šabovič M., Drevenšek G.: Low-dose atorvastatin, losartan and particularly their combination, provide cardiovascular protection in isolated rat heart and aorta. Heart Vessels, 5/2012, [published online May 21, 2012].
32. Rx List, the internet drug index, <http://www.rxlist.com/lipitor-drug/consumer-side-effects-precautions.htm>. (31.7.2012)
33. Chem spider, Royal society of Chemistry, <http://www.chemspider.com/>. (24.1.2014)
34. Drug Bank, <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01076>. (24.7.2012)
35. Efficacy of prindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease.A radomised double-blind, placebo-controlled, multicenter trial (the EUROPA study). Lancet 2003; 362:782-7.
36. Drug Bank, <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00790>. (8.5.2013)
37. <http://www.patient.so.uk/medicine /Perindopril.htm> (8.5.2013)
38. Drug Bank, <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00678>. (8.5.2013)
39. Goa L. K., Wagstaff J. A.: Losartan Potassium. Drugs 1996; 5: 820-845.
40. Lunder M., Janič M., Habjan S., Šabovič M.: Subtherapeutic, low-dose fulvastatin improves functional and morphological arterial wall properties in apparently, middle-age males – a pilot study. Atherosclerosis 2011; 215: 446-451.
41. Lunder M., Janič M. in Sabovič M.: Reduction of age-associated arterial wall changes by of low-dose valsartan.eEur. J. of Preventive cardiology 2012; 19:1243-1249. [published on-line September 20, 2011]
42. Lunder M., Janič M., Jug B. in Sabovič M.: The effects of low-dose fulvastatin and valsartan combination on arterial function: a randomized clinical trial. Eur J. Intern. Med. 2012; 23:261-266.
43. Karter Y., Curgunlu A., Erturk N., Vehid S., Mihmanli Ayan F.: Effects of low and high doses of atorvastatin on arterial compliance. Jpn Heart J 2003; 44: 953-61.

44. User's manual Pure Link™ RNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, California, ZDA),
http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/purelink_rna_mini_kit_man.pdf
(15.1.2013)
45. Burtis C., Ashwood, E., Bruns D.: Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, Fourth Edition, Chapter 36, USA, Philadelphia, 2006: 1393-1616(1401).
46. Agilent RNA 6000 Nano Kit Quick Start Guide,
http://www.chem.agilent.com/library/usermanuals/Public/G2938-0093_SmallRNAKitGuide_ebook.pdf (15.1.2013)
47. Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Nemčija). Protocol, www.roche-applied-science.com (15.1.2013)
48. Arko B: Tehnologija PCR v realnem času in možnost uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. Farm Vestn 2004; 55:.215-220.
49. Life technologies, <http://www.lifetechnologies.com/si/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/>. (6.2.2013)
50. Taq Man Gene Expression Assays, <http://www3.appliedbiosystems.com> (20.1.2013)
51. Bolha L., Dušanić D., Narat M., Oven I.: Comparison of methods for relative quantification of gene expression using Real-time PCR. Acta agriculturae Slovenica, Ljubljana 2012; 100: 97-106.
52. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A. Speleman F.: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology 2002; 3(7): 0034.1-0034.11.
<http://genomebiology.com/2002/3/7/research/0034> (6.2.2013)
53. Quick Reference Card, Applied Biosystems,
<http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/4352143.pdf>. (8.2.2013)
54. Real time PCR, Applied Biosystems,
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_053906.pdf. (8.2.2013)
55. Huang K.C., Chen C.W., Chen J.C., Lin W.W.: HMG-Co-A reductase inhibitors inhibit inducible nitric oxide synthase gene expression in macrophages. J biomed Sci. 2003; 10: 396-405.

56. Subramani J., Kathirvel K., Marcus Leo M.D., Kuntamllappanavar G., Uttam Singh T., Mishra S.K.: Atorvastatin restores the impaired vascular endothelium-dependent relaxations mediated by nitric oxide and endothelium-driven hyperpolarizing factors but not hypotension in sepsis. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009; 54: 526-534.
57. Ozaki K., Yamamoto 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 :147-154.
58. Loboda A., Jazwa A., Jozkowicz A., Dorosz J., Balla J., Molema G., Dulak J.: Atorvastatin prevents hypoxia-induced inhibition of endothelial nitric oxide synthase expression but does not affect heme oxygenase-1 in human microvascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 2006; 187:26-30.
59. Wang J., Tokoro T., Matsui K., Higa S., Kitajima I.: Pitavastatin at low dose activates endothelial nitric oxide synthase through PI3K-AKT pathway in endothelial cells. *Life Sciences* 2005; 76:2257-2268.
60. Gohlke P., Kuwer I., Bartenbach S., Schnell A., Unger T.: Effect of low-dose treatment with perindopril on cardiac function in stroke-prone spontaneously hypertensive rats: Role of bradykinin. *Journal of cardiovascular pharmacology* 1994; 24:462-469.
61. Lunder M., Janič M., Žiberna L., Drevenšek G.: A low-dose atorvastatin and losartan, combination directly improves aortic ring relaxation and diminishes ischaemic-reperfusion injury in isolated rat hearts. *Med Sci Monit*. 2012; 18(9): 366-374.

6. PRILOGE

Priloga 1: Seznam vseh vzorcev z izmerjenimi koncentracijami RNA in vrednostmi števila RIN

Seznam vseh vzorcev s koncentracijo RNA in število RIN					
Zap.št.	Oznaka vzorca	Konc. 1 (ng/µL)	Konc. 2 (ng/µL)	Povp.konc. (ng/µL)	RIN
1.	4A10	798,6	801,6	800,1	8,7
2.	4A11	444,7	438,7	441,7	9,6
3.	4AL11	699,7	719,7	709,7	8
4.	4AP10	686,7	713,2	699,95	9
5.	4AP11	734,5	736,5	735,5	7,9
6.	4L10	794,2	829,3	811,75	9,2
7.	4L11	682,5	686,7	684,6	7,7
8.	4P10	286,2	297,8	292	8,8
9.	4P11	709	710,1	709,55	N/A
10.	6A5	171,9	/	171,9	7,8
11.	6A7	283,9	/	283,9	8,5
12.	6A8	175,3	/	175,3	8,8
13.	6AL1	226,4	215,1	220,75	7,4
14.	6AL8	383,7	/	383,7	8,5
15.	6AL9	208,8	/	208,8	7,6
16.	6AL10	285	/	285	7,4
17.	6AP5	195,6	/	195,6	8,5
18.	6AP6	172	178	175	7,6
19.	6AP9	240,4	/	240,4	9
20.	6L2	289,6	/	289,6	8,2
21.	6L3	62,8	/	62,8	8
22.	6P1	245	252	248,5	6,6
23.	6P7	148,8	/	148,8	8,2
24.	6P8	254,3	/	254,3	8,1
25.	8A2	261,7	/	261,7	9,4
26.	8A4	382,9	/	382,9	8,5
27.	8A6	305,8	/	305,8	8,3
28.	8AL2	260	/	260	8,4
29.	8AL5	195,1	/	195,1	7,5
30.	8AL9	194,8	/	194,8	8,5
31.	8AP2	324,4	321,5	322,95	9,9
32.	8AP3	277,6	/	277,6	7,8
33.	8AP4	129,1	/	129,1	9,2
34.	8L1	148	/	148	8,1
35.	8L6	276,9	/	276,9	8,1
36.	8L7	267,1	267,7	267,4	8,4
37.	8P3	412,4	/	412,4	8,4
38.	8P5	226	/	226	8,6
39.	10A0	630,4	/	630,4	9,5
40.	10A1	776,6	/	776,6	9,2
41.	10AL3	208	/	208	9,4
42.	10AL6	140	/	140	8,7
43.	10AP1	406,5	374,2	390,35	8,2
44.	10AP7	619,9	/	619,9	8,6
45.	10L4	199,1	/	199,1	9
46.	10L5	648,9	/	648,9	9,1
47.	10P2	170,9	/	170,9	9,1
48.	10P6	631,9	662,1	647	8,9
49.	K1	179,8	186	182,9	8
50.	K2	70,8	72,6	71,7	8
51.	K3	124,8	128,1	126,45	8,3
52.	K4	173,1	175,8	174,45	8
53.	K5	266,3	262,3	264,3	7,9
54.	K6	390,7	385	387,85	8,4
55.	K7	695,7	696,9	696,3	8,6

56.	K8	272,5	273,8	273,15	8,1
57.	K	285,5	290,3	287,9	8
58.	K9	265,9	268,5	267,2	8,6
59.	K10	420,7	/	420,7	8,8
60.	K11	244,9	247,7	246,3	8,1
61.	K12	294,4	288,6	291,5	8,3

Priloga 2: Razdelitev vzorcev (oznaka in zaporedna številka vzorca) po vrsti in času trajanja zdravljenja

Zdravilo/ Trajanje	atorvastatin	losartan	perindopril	atorvastatin + losartan	atorvastatin + perindopril	Kontrola - brez terapije
4 tedni	4A10 (1) 4A11 (2)	4L10 (6) 4L11 (7)	4P10 (8) 4P11 (9)	4AL11 (3)	4AP10 (4) 4AP11 (5)	K1(49) K2(50) K3 (51)
Skupaj vz.	2	2	2	1	2	3
6 tednov	6A5 (10) 6A7 (11) 6A8 (12)	6L2 (20) <u>6L3 (21)</u>	6P1 (22) <u>6P7 (23)</u> 6P8 (24)	6AL1 (13) 6AL8 (14) 6AL9 (15) <u>6AL10 (16)</u>	<u>6AP5 (17)</u> 6AP6 (18) 6AP9 (19)	K4(52) K5(53) K6 (54)
Skupaj vz.	3	2	3	4	3	3
8 tednov	8A2 (25) 8A4 (26) 8A6 (27)	8L1 (34) 8L6 (35) 8L7 (36)	8P3 (37) 8P5 (38)	8AL2 (28) 8AL5 (29) 8AL9 (30)	8AP2 (31) 8AP3 (32) 8AP4 (33)	K7 (55) K8 (56) K (57)
Skupaj vz.	3	3	2	3	3	3
10 tednov	10A0 (39) 10A1 (40)	10L4 (45) 10L5 (46)	10P2 (47) 10P6 (48)	10AL3 (41) 10AL6 (42)	10AP1 (43) 10AP7 (44)	K9(58) K10(59) K11(60) K12 (61)
Skupaj vz.	2	2	2	2	2	4
Skupaj	10	9	9	10	10	13
podčrtano: (vseh meritev nismo uspeli pridobiti)						

Priloga 3: Povprečne vrednosti izražanja za *NOS3* in hišni gen *HMBS* (Standardi: 14; 7; 3,5; 1,75 in 0,88) ter za *NOS2* in hišni gen *HMBS* (Standardi: 112; 56; 28; 14 in 7)

številka	vzorci	gen	povprečje	gen	povprečje	gen112	povprečje	gen	povprečje
1	4A10	HMBS1	5.71	NOS3	4.57	HMBS1	142.8	nos2_A	2.000
2	4A11	HMBS1	4.99	NOS3	8.54	HMBS1	126.51	nos2_A	0.731
3	4AL11	HMBS1	8.83	NOS3	10.46	HMBS1	207.81	nos2_A	0.858
4	4AP10	HMBS1	7.05	NOS3	7.99	HMBS1	119.99	nos2_A	0.317
5	4AP11	HMBS1	8.25	NOS3	12.69	HMBS1	292.94	nos2_A	1.280
6	4L10	HMBS1	5.84	NOS3	8.99	HMBS1	56.68	nos2_A	1.650
7	4L11	HMBS1	6.08	NOS3	7.81	HMBS1	112.04	nos2_A	0.838
8	4P10	HMBS1	9.12	NOS3	14	HMBS1	221.09	nos2_A	1.470
9	4P11	HMBS1	5.82	NOS3	6.56	HMBS1	136.23	nos2_A	1.970
10	6A5	HMBS1	5.66	NOS3	13.08	HMBS1	71.63	nos2_A	0.852
11	6A7	HMBS1	6.17	NOS3	21.06	HMBS1	148.16	nos2_A	0.500
12	6A8	HMBS1	8.23	NOS3	8.89	HMBS1	171.99	nos2_A	3.480
13	6AL1	HMBS1	5.98	NOS3	15.68	HMBS1	196.09	nos2_A	1.260
14	6AL8	HMBS1	3.76	NOS3	10.14	HMBS1	103.77	nos2_A	1.390
15	6AL9	HMBS1	6.67	NOS3	13.98	HMBS1	270.84	nos2_A	1.650
16	6AL10	HMBS1	6.68	NOS3	11.26	HMBS1	101.32	nos2_A	0.714
17	6AP5	HMBS1	6.27	NOS3	14.78	HMBS1	40.89	/	/
18	6AP6	HMBS1	7.83	NOS3	15.29	HMBS1	277.56	nos2_A	1.940
19	6AP9	HMBS1	10.77	NOS3	7.36	HMBS1	239.39	nos2_A	0.989
20	6L2	HMBS1	3.28	NOS3	14.06	HMBS1	57.69	nos2_A	0.876
21	6L3	HMBS1	14.06	NOS3	16.81	/	/	/	/
22	6P1	HMBS1	2.17	NOS3	6.59	HMBS1	45.65	nos2_A	1.410
23	6P7	HMBS1	4.58	NOS3	15.4	HMBS1	43.45	nos2_A	/
24	6P8	HMBS1	5.94	NOS3	15.8	HMBS1	107.18	nos2_A	0.467
25	8A2	HMBS1	6.95	NOS3	9.38	HMBS1	165.2	nos2_A	4.200
26	8A4	HMBS1	7.99	NOS3	9.89	HMBS1	144.49	nos2_A	2.050
27	8A6	HMBS1	8.67	NOS3	12.12	HMBS1	146.66	nos2_A	0.8860
28	8AL2	HMBS1	5.59	NOS3	7.81	HMBS1	57.12	nos2_A	1.76
29	8AL5	HMBS1	6.45	NOS3	10.83	HMBS1	215.95	nos2_A	1.75
30	8AL9	HMBS1	5.7	NOS3	7.11	HMBS1	48.03	nos2_A	2.82
31	8AP2	HMBS1	6.54	NOS3	7.85	HMBS1	177.61	nos2_A	2.28
32	8AP3	HMBS1	6.82	NOS3	7.61	HMBS1	123.73	nos2_A	1.71
33	8AP4	HMBS1	7.27	NOS3	8.86	HMBS1	36.96	nos2_A	1.33
34	8L1	HMBS1	8.88	NOS3	12.85	HMBS1	139.78	nos2_A	4.06
35	8L6	HMBS1	5.35	NOS3	10.9	HMBS1	189.91	nos2_A	0.4830
36	8L7	HMBS1	9.1	NOS3	11.59	HMBS1	251.6	nos2_A	5.42
37	8P3	HMBS1	6.34	NOS3	10.32	HMBS1	94.82	nos2_A	1.95

38	8P5	HMBS1	7.66	NOS3	13.14	HMBS1	401.3	nos2_A	7.9
39	10A0	HMBS1	5.71	NOS3	10.77	HMBS1	145.59	nos2_A	10.01
40	10A1	HMBS1	13.13	NOS3	6.68	HMBS1	500.12	nos2_A	1.64
41	10AL3	HMBS1	8.68	NOS3	7.09	HMBS1	551.17	nos2_A	3.87
42	10AL6	HMBS1	8.44	NOS3	10.71	HMBS1	94.98	nos2_A	1.36
43	10AP1	HMBS1	10.94	NOS3	8.96	HMBS1	342.46	nos2_A	0.9560
44	10AP7	HMBS1	7.33	NOS3	6.09	HMBS1	171.84	nos2_A	1.86
45	10L4	HMBS1	8.1	NOS3	6.06	HMBS1	328.58	nos2_A	2.17
46	10L5	HMBS1	9.6	NOS3	6.46	HMBS1	221.44	nos2_A	0.6830
47	10P2	HMBS1	8.25	NOS3	12.23	HMBS1	248.95	nos2_A	4.6
48	10P6	HMBS1	7.15	NOS3	5.01	HMBS1	218.95	nos2_A	4.95
49	K1	HMBS1	4.2	NOS3	7.68	HMBS1	74.24	nos2_A	1.67
50	K2	HMBS1	10.95	NOS3	18.49	/	/	/	/
51	K3	HMBS1	4.09	NOS3	9.25	HMBS1	38.23	/	/
52	K4	HMBS1	17.68	NOS3	0.962	HMBS1	132.86	nos2_A	2.21
53	K5	HMBS1	4.15	NOS3	9.37	HMBS1	85.61	nos2_A	2.07
54	K6	HMBS1	6.03	NOS3	7.75	HMBS1	138.69	nos2_A	0.557
55	K7	HMBS1	5.64	NOS3	6.46	HMBS1	167.33	nos2_A	150.06
56	K8	HMBS1	6.09	NOS3	13.93	HMBS1	186.34	nos2_A	1.83
57	K	HMBS1	6.33	NOS3	7.89	HMBS1	173.88	nos2_A	1.57
58	K9	HMBS1	7.64	NOS3	12.77	HMBS1	242.4	nos2_A	3.43
59	K10	HMBS1	6.34	NOS3	6.93	HMBS1	69.59	nos2_A	2.25
60	K11	HMBS1	10.63	NOS3	7.77	HMBS1	195.29	nos2_A	5.18
61	K12	HMBS1	6.78	NOS3	5.92	HMBS1	156.84	nos2_A	0.724

Priloga 4: Razdelitev vzorcev za statistično analizo in normalizirane vrednosti izražanja NOS2 in NOS3

vzorci	time	th	številka	grupavr	grupa	grupathvr	grupath	nos3/hmbs	nos2/hmbs
K1	0	0	49	0	0	0	0	1.828571	0.022495
K2	0	0	50	0	0	0	0	1.688584	/
K3	0	0	51	0	0	0	0	2.261614	/
K4	0	0	52	0	0	0	0	0.054412	0.016634
K5	0	0	53	0	0	0	0	2.257831	0.024179
K6	0	0	54	0	0	0	0	1.28524	0.004016
K7	0	0	55	0	0	0	0	1.14539	0.896791
K8	0	0	56	0	0	0	0	2.287356	0.009821
K	0	0	57	0	0	0	0	1.246445	0.009029
K9	0	0	58	0	0	0	0	1.671466	0.01415
K10	0	0	59	0	0	0	0	1.09306	0.032332

K11	0	0	60	0	0	0	0	0.73095	0.026525
K12	0	0	61	0	0	0	0	0.873156	0.004616
4A10	4	1	1	1	1	1	1	0.80035	0.014006
4A11	4	1	2	1	1	1	1	1.711423	0.005778
6A5	6	1	10	1	6	4	1	2.310954	0.011894
6A7	6	1	11	1	6	4	1	3.41329	0.003375
6A8	6	1	12	1	6	4	1	1.080194	0.020234
4L10	4	2	6	2	4	3	3	1.539384	0.029111
4L11	4	2	7	2	4	3	3	1.284539	0.007479
6L2	6	2	20	2	9	6	3	4.286585	0.015185
6L3	6	2	21	2	9	6	3	1.19559	/
4P10	4	3	8	3	5	3	3	1.535088	0.006649
4P11	4	3	9	3	5	3	3	1.127148	0.014461
6P1	6	3	22	3	10	6	3	3.036866	0.030887
6P7	6	3	23	3	10	6	3	3.362445	/
6P8	6	3	24	3	10	6	3	2.659933	0.004357
4AL11	4	4	3	4	2	2	2	1.184598	0.004129
6AL1	6	4	13	4	7	5	2	2.622074	0.006426
6AL8	6	4	14	4	7	5	2	2.696809	0.013395
6AL9	6	4	15	4	7	5	2	2.095952	0.006092
6AL10	6	4	16	4	7	5	2	1.685629	0.007047
4AP10	4	5	4	5	3	2	2	1.133333	0.002642
4AP11	4	5	5	5	3	2	2	1.538182	0.004369
6AP5	6	5	17	5	8	5	2	2.357257	/
6AP6	6	5	18	5	8	5	2	1.952746	0.006989
6AP9	6	5	19	5	8	5	2	0.68338	0.004131
8A2	8	1	25	6	11	7	1	1.34964	0.025424
8A4	8	1	26	6	11	7	1	1.237797	0.014188
8A6	8	1	27	6	12	7	1	1.397924	0.006041
10A0	10	1	39	6	16	10	1	1.886165	0.068755
10A1	10	1	40	6	16	10	1	0.508759	0.003279
8L1	8	2	34	7	14	9	3	1.447072	0.029046
8L6	8	2	35	7	14	9	3	2.037383	0.002543
8L7	8	2	36	7	14	9	3	1.273626	0.021542
10L4	10	2	45	7	19	12	3	0.748148	0.006604
10L5	10	2	46	7	19	12	3	0.672917	0.003084
8P3	8	3	37	8	15	9	3	1.62776	0.020565
8P5	8	3	38	8	15	9	3	1.715405	0.019686
10P2	10	3	47	8	20	12	3	1.482424	0.018478
10P6	10	3	48	8	20	12	3	0.700699	0.022608

8AL2	8	4	28	9	12	8	2	1.397138	0.030812
8AL5	8	4	29	9	12	8	2	1.67907	0.008104
8AL9	8	4	30	9	12	8	2	1.247368	0.058713
10AL3	10	4	41	9	17	11	2	0.81682	0.007021
10AL6	10	4	42	9	17	11	2	1.268957	0.014319
8AP2	8	5	31	10	13	8	2	1.200306	0.012837
8AP3	8	5	32	10	13	8	2	1.115836	0.01382
8AP4	8	5	33	10	13	8	2	1.218707	0.035985
10AP1	10	5	43	10	18	11	2	0.819013	0.002792
10AP7	10	5	44	10	18	11	2	0.830832	0.010824

Priloga 5: Razdelitev vzorcev za statistično analizo po tercilih odstotka največje možne relaksacije

vzorci	time	th	številka	grupavr	grupa	grupathvr	grupath	%maxrelax	relaxterc
K1	0	0	49	0	0	0	0	76.940	3.000
K2	0	0	50	0	0	0	0	69.100	2.000
K3	0	0	51	0	0	0	0	74.775	3.000
K4	0	0	52	0	0	0	0	60.450	1.000
K5	0	0	53	0	0	0	0	77.400	3.000
K6	0	0	54	0	0	0	0	76.650	3.000
K7	0	0	55	0	0	0	0	76.280	3.000
K8	0	0	56	0	0	0	0	74.275	3.000
K	0	0	57	0	0	0	0	73.425	3.000
K9	0	0	58	0	0	0	0	73.160	2.000
K10	0	0	59	0	0	0	0	68.600	2.000
K11	0	0	60	0	0	0	0	70.475	2.000
K12	0	0	61	0	0	0	0	68.475	2.000
4A10	4	1	1	1	1	1	1	71.733	2.000
4A11	4	1	2	1	1	1	1	74.940	3.000
6A5	6	1	10	1	6	4	1	73.229	3.000
6A7	6	1	11	1	6	4	1	75.914	3.000
6A8	6	1	12	1	6	4	1	77.757	3.000
4L10	4	2	6	2	4	3	3	72.833	2.000
4L11	4	2	7	2	4	3	3	62.633	1.000
6L2	6	2	20	2	9	6	3	67.225	2.000
6L3	6	2	21	2	9	6	3	79.625	3.000
4P10	4	3	8	3	5	3	3	59.217	1.000
4P11	4	3	9	3	5	3	3	61.977	1.000
6P1	6	3	22	3	10	6	3	67.629	2.000
6P7	6	3	23	3	10	6	3	77.140	3.000
6P8	6	3	24	3	10	6	3	76.500	3.000
4AL11	4	4	3	4	2	2	2	69.600	2.000
6AL1	6	4	13	4	7	5	2	77.050	3.000

6AL8	6	4	14	4	7	5	2	76.243	3.000
6AL9	6	4	15	4	7	5	2	77.350	3.000
6AL10	6	4	16	4	7	5	2	/	/
4AP10	4	5	4	5	3	2	2	64.200	1.000
4AP11	4	5	5	5	3	2	2	63.817	1.000
6AP5	6	5	17	5	8	5	2	65.613	1.000
6AP6	6	5	18	5	8	5	2	75.125	3.000
6AP9	6	5	19	5	8	5	2	71.800	2.000
8A2	8	1	25	6	11	7	1	60.567	1.000
8A4	8	1	26	6	11	7	1	68.317	2.000
8A6	8	1	27	6	12	7	1	65.560	1.000
10A0	10	1	39	6	16	10	1	60.414	1.000
10A1	10	1	40	6	16	10	1	63.543	1.000
8L1	8	2	34	7	14	9	3	64.800	1.000
8L6	8	2	35	7	14	9	3	68.850	2.000
8L7	8	2	36	7	14	9	3	59.300	1.000
10L4	10	2	45	7	19	12	3	64.200	1.000
10L5	10	2	46	7	19	12	3	63.117	1.000
8P3	8	3	37	8	15	9	3	65.100	1.000
8P5	8	3	38	8	15	9	3	69.286	2.000
10P2	10	3	47	8	20	12	3	60.133	1.000
10P6	10	3	48	8	20	12	3	77.088	3.000
8AL2	8	4	28	9	12	8	2	69.250	2.000
8AL5	8	4	29	9	12	8	2	70.850	2.000
8AL9	8	4	30	9	12	8	2	68.325	2.000
10AL3	10	4	41	9	17	11	2	64.600	1.000
10AL6	10	4	42	9	17	11	2	64.525	1.000
8AP2	8	5	31	10	13	8	2	71.000	2.000
8AP3	8	5	32	10	13	8	2	74.025	3.000
8AP4	8	5	33	10	13	8	2	52.075	1.000
10AP1	10	5	43	10	18	11	2	67.780	2.000
10AP7	10	5	44	10	18	11	2	69.040	2.000

Priloga 6: Razdelitev vzorcev za statistično analizo po tercilah odstotka največje možne konstrukcije

vzorci	time	th	številka	grupavr	grupa	grupathvr	grupath	%maxkonstr	konstrterc
K1	0	0	49	0	0	0	0	90.680	2.000
K2	0	0	50	0	0	0	0	95.400	3.000
K3	0	0	51	0	0	0	0	93.325	3.000
K4	0	0	52	0	0	0	0	95.875	3.000
K5	0	0	53	0	0	0	0	87.750	2.000
K6	0	0	54	0	0	0	0	94.150	3.000
K7	0	0	55	0	0	0	0	89.100	2.000
K8	0	0	56	0	0	0	0	90.925	3.000
K	0	0	57	0	0	0	0	91.525	3.000

K9	0	0	58	0	0	0	0	94.980	3.000
K10	0	0	59	0	0	0	0	93.550	3.000
K11	0	0	60	0	0	0	0	97.450	3.000
K12	0	0	61	0	0	0	0	91.700	3.000
4A10	4	1	1	1	1	1	1	101.350	3.000
4A11	4	1	2	1	1	1	1	99.280	3.000
6A5	6	1	10	1	6	4	1	87.114	2.000
6A7	6	1	11	1	6	4	1	92.771	3.000
6A8	6	1	12	1	6	4	1	75.514	1.000
4L10	4	2	6	2	4	3	3	78.833	1.000
4L11	4	2	7	2	4	3	3	77.683	1.000
6L2	6	2	20	2	9	6	3	76.775	1.000
6L3	6	2	21	2	9	6	3	76.675	1.000
4P10	4	3	8	3	5	3	3	82.883	2.000
4P11	4	3	9	3	5	3	3	62.667	1.000
6P1	6	3	22	3	10	6	3	100.571	3.000
6P7	6	3	23	3	10	6	3	83.040	2.000
6P8	6	3	24	3	10	6	3	89.357	2.000
4AL11	4	4	3	4	2	2	2	90.571	2.000
6AL1	6	4	13	4	7	5	2	70.900	1.000
6AL8	6	4	14	4	7	5	2	89.929	2.000
6AL9	6	4	15	4	7	5	2	74.525	1.000
6AL10	6	4	16	4	7	5	2	/	/
4AP10	4	5	4	5	3	2	2	92.550	3.000
4AP11	4	5	5	5	3	2	2	89.133	2.000
6AP5	6	5	17	5	8	5	2	93.613	3.000
6AP6	6	5	18	5	8	5	2	71.538	1.000
6AP9	6	5	19	5	8	5	2	82.340	2.000
8A2	8	1	25	6	11	7	1	71.733	1.000
8A4	8	1	26	6	11	7	1	67.450	1.000
8A6	8	1	27	6	12	7	1	79.320	1.000
10A0	10	1	39	6	16	10	1	73.114	1.000
10A1	10	1	40	6	16	10	1	78.329	1.000
8L1	8	2	34	7	14	9	3	77.900	1.000
8L6	8	2	35	7	14	9	3	85.825	2.000
8L7	8	2	36	7	14	9	3	90.950	3.000
10L4	10	2	45	7	19	12	3	84.033	2.000
10L5	10	2	46	7	19	12	3	79.367	2.000
8P3	8	3	37	8	15	9	3	91.186	3.000
8P5	8	3	38	8	15	9	3	85.757	2.000
10P2	10	3	47	8	20	12	3	76.650	1.000
10P6	10	3	48	8	20	12	3	83.238	2.000
8AL2	8	4	28	9	12	8	2	77.875	1.000
8AL5	8	4	29	9	12	8	2	95.925	3.000
8AL9	8	4	30	9	12	8	2	82.600	2.000
10AL3	10	4	41	9	17	11	2	83.225	2.000
10AL6	10	4	42	9	17	11	2	90.900	3.000

8AP2	8	5	31	10	13	8	2	50.650	1.000
8AP3	8	5	32	10	13	8	2	69.875	1.000
8AP4	8	5	33	10	13	8	2	86.650	2.000
10AP1	10	5	43	10	18	11	2	80.440	2.000
10AP7	10	5	44	10	18	11	2	77.680	1.000