

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Miha KRKOVIČ

**POLIMORFIZEM GENA JEDRNEGA
RECEPTORJA γ , KI GA AKTIVIRA
PEROKSISOMSKI PROLIFERATOR – PPAR γ -
MOŽNI GENETSKI OZNAČEVALEC ESENCIALNE
ARTERIJSKE HIPERTENZIJE**

DIPLOMSKO DELO
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Miha KRKOVIČ

**POLIMORFIZEM GENA JEDRNEGA RECEPTORJA γ , KI GA
AKTIVIRA PEROKSISOMSKI PROLIFERATOR – PPAR γ -MOŽNI
GENETSKI OZNAČEVALEC ESENCIALNE ARTERIJSKE
HIPERTENZIJE**

DIPLOMSKO DELO
univerzitetni študij

**POLYMORPHISM IN THE PEROXISOME
PROLIFERATOR - ACTIVATED RECEPTOR - γ GENE –
POTENTIAL GENETIC MARKER OF ESSENTIAL ARTERIAL
HYPERTENSION**

GRADUATION THESIS
university studies

Ljubljana, 2007

Krkovič M. Polimorfizem gena jedrnega receptorja γ , ki ga aktivira ... esencialne arterijske hipertenzije.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2007

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Inštitutu za histologijo in embriologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani in oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete (Katedra za genetiko, animalno biotehnologijo, imunologijo, splošno živalinorejo in konjerejo). Bolniki so bili zajeti na Nefrološkem oddelku Pediatrične klinike Kliničnega centra v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Danijela Petroviča, dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Miklavž GRABNAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Danijel PETROVIČ, dr. med.
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za histologijo in embriologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Spodaj podpisani prof. dr. Danijel Petrovič, dr. med., mentor diplomske naloge izjavljam, da je delo končano.

prof. dr. Danijel Petrovič, dr. med.

Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki identična tiskani verziji.

Miha Krkovič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	579.61:616.12-008(043.2)=863
KG	esencialna arterijska hipertenzija/PPAR/PPARG/polimorfizem/Pro12Ala
KK	
AV	KRKOVIC, Miha
SA	PETROVIČ, Danijel
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo,
LI	2007
IN	POLIMORFIZEM GENA JEDRNEGA RECEPTORJA γ, KI GA AKTIVIRA PEROKSISOMSKI PROLIFERATOR – PPARγ -MOŽNI GENETSKI OZNAČEVALEC ESENCIALNE ARTERIJSKE HIPERTENZIJE
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 43 str., 8 pregl., 6 sl., 0 pril., 80 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Esencialna arterijska hipertenzija je bolezen, za katero pravega vzroka ne poznamo. Nanjo vplivajo številni dejavniki (okoljski in genetski). PPAR γ 2 je jedrni uravnavni receptor, ki je vpleten v številne, predvsem metabolne procese, ki so posredno povezani z nastankom in razvojem arterijske hipertenzije. Obstajajo tri izotipi PPAR, in sicer PPAR α , PPAR γ , PPAR δ , kateri je skupna 4 domenska struktura. V skupini PPAR γ sta bili do sedaj izolirani dve izoformi (PPAR γ 1 in PPAR γ 2), ki nastaneta kot posledica aktivnosti različnih promotorjev in različnega izrezovanja mRNA. Na ta način nastanejo tri različne mRNA, in sicer mRNA PPAR γ 1, mRNA PPAR γ 2 in mRNA PPAR γ 3. Polimorfizem Pro12Ala na genu za PPAR γ se nahaja na N - terminalni regiji proteina, in sicer na odseku A/B domene, ki je del eksona B. Z metodo polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP) smo najprej pomnožili željene odseke DNA in jih nato cepili z restrikcijskim encimom <i>MspI</i> . Transverzija C v G povzroči translacijsko spremembo aminokisline prolin v alanin v 12 kodonu eksona B, kar ima za metodološko posledico izničenje cepitvenega mesta za <i>MspI</i> . Z našo raziskavo smo dokazali, da polimorfizem Pro12Ala jedrnega receptorja PPAR γ 2 ni genetski označevalec za EAH pri otrocih in genotip Ala12Ala ne predstavlja rizičnega genotipa za nastanek EAH.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC 579.61:616.12-008(043.2)=863
 CX essential arterial hypertension/PPAR/polymorphism/Pro12Ala
 CC
 AU KRKOVIČ, Miha
 AA PETROVIČ, Danijel
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology
 PY 2007
 TI Polymorphism of the gene of Peroxisome-proliferator activated receptor
 -potencial genetic marker of essential arterial hypertension
 DT Graduation Thesis (University studies)
 NO X, 43 p., 8 tab., 6 fig., 0 ann., 80ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB Essential arterial hypertension (EAH) is multifactorial disease triggered by several genetics and multiple environmental factors. The peroxisome proliferator - activated receptor γ (PPAR γ) is a prototypical member of the nuclear receptor family who integrates the control of especially metabolic proces, which are indirect involved in EAH. Today we know three subtypes of receptor: PPAR α , PPAR γ , PPAR δ . Because of activating different promoters an alternative splicing exist 2 different isoforms and three mRNAs. The structure of protein PPAR γ 2 is separated in 4 domains. The Pro12Ala single nucleotide polymorphism is the best known polymorphism in PPAR γ 2. To detect transversion of nucleotide cytosine to guanine which causes missense mutation proline to alanine, we used restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique. The findings in our research suggest that Ala allele or Ala12Ala genotype is not potential risk factor for essential arterial hypertension.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Izvleček	VII
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
Slovarček	X
1. UVOD.....	1
1.1 EPIDEMIOLOGIJA ARTERIJSKE HIPERTENZIJE.....	2
1.2 DEFINICIJA EAH PRI OTROCIH.....	3
1.3 PATOGENEZA ESENCIALNE ARTERIJSKE HIPERTENZIJE.....	5
1.3.1 Uravnavanje krvnega tlaka.....	6
1.4 DRUŽINSKA OBREMENITEV KOT DEJAVNIK TVEGANJA ZA AH.....	7
1.5 KANDIDATNI GENI ZA EAH.....	7
1.6 VLOGA PPAR γ	8
1.6.1 VLOGA PPAR γ PRI BOLNIKI Z AH.....	11
1.7 GEN ZA PPAR γ	12
2. NAMEN DELA IN HIPOTZE.....	15
3. PREISKOVANCI IN METODE DELA.....	15
3.1 PREISKOVANCI.....	15
3.1.1 Bolniki z EAH.....	15
3.1.1.1 Vključitveni kriterij.....	16
3.1.2 Kontrolna skupina.....	16
3.2 MOLEKULARNO GENETSKE METODE.....	17
3.2.1 Izolacija DNA.....	17
3.2.1.1 Izolacija po klasični metodi.....	17
3.2.1.2 Izolacija DNA s komercialnim kitom FlexiGene DNA kit (QIAGEN).....	18
3.2.2 Analiza polimorfizma gena PPAR γ (Pro12Ala).....	18
3.2.2.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR).....	18
3.2.2.2 Cepitev fragmentov.....	19
3.3 STATISTIČNA ANALIZA.....	19
3.3.1 Opis spremenljivk.....	19
3.3.2 Velikost skupin.....	19
3.3.3 Testiranje razlik med skupinami.....	19
3.3.4 Skladnost genotipov s Hardy-Weinbergovim ravnovesjem.....	20

4.	REZULTATI.....	20
4.1	KLINIČNA ANALIZA PREISKOVANCEV.....	20
4.2	GENETSKI POLIMORFIZEM.....	22
4.2.1	Rezultati molekularno genetske analize.....	22
4.2.2	Rezultati statistične analize.....	23
4.2.3	Genski polimorfizem in Hardy-Weinbergovo ravnovesje.....	24
5.	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	25
5.1	KLINIČNE ZNAČILNOSTI ESENCIALNE ARTERIJSKE HIPERTENZIJE	25
5.2	DRUŽINSKA OBREMENITEV IN ARTERIJSKA HIPERTENZIJA.....	26
5.3	GENSKI POLIMORFIZEM GENA ZA PPAR γ (Pro12Ala) IN HARDY - WEINBERGOVO RAVNOVESJE.....	27
5.4	GENSKI POLIMORFIZEM GENA ZA PPAR γ (Pro12Ala) IN HIPERTENZIJA.....	27
5.5	INTERAKCIJA MED GENSKIM POLIMORFIZMOM GENA ZA PPAR γ (Pro12Ala) IN DEBELOSTJO.....	30
5.6	POMANJKLJIVOSTI RAZISKAVE.....	31
5.7	KLINIČNA UPORABNOST PREISKAVE.....	32
5.8	SKLEP.....	32
6.	POVZETEK.....	32
7.	VIRI.....	33
7.1	CITIRANI VIRI.....	33
7.2	DRUGI VIRI.....	43
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

1. Pregl. 1: Klinični podatki o bolnikih z arterijsko hipertenzijo in oseb v kontrolni skupini.....	20
2. Pregl. 2: BMI pri bolnikih z arterijsko hipertenzijo in pri osebah v kontrolni skupini.....	21
3. Pregl. 3: Podatki o arterijski hipertenziji v družinski anamnezi pri bolnikih z esencialno hipertenzijo in v kontrolni skupini.....	21
4. Pregl. 4: Razporeditev genotipov in alelov za polimorfizem gena za $PPAR\gamma 2$ pri bolnikih z EAH in pri kontrolni skupini.....	23
5. Pregl. 5: Razmerje obetov potencialnih rizičnih genotipov polimorfizma gena <i>PPARG</i> pri bolnikih z arterijsko hipertenzijo in v kontrolni skupini.....	23
6. Pregl. 6: Interakcija med genskim polimorfizmom Pro12Ala in BMI nad P_{85} pri bolnikih in v kontrolni skupini.....	24
7. Pregl. 7: Razmerje obetov za bolnike in kontrolno skupino za osebe s prekomerno telesno težo ($BMI > P_{85}$).....	24
8. Pregl. 8: Testiranje razporeditev genotipov bolnikov in kontrolnih skupin na razporeditev genotipov v Hardy-Weinbergovim ravnoesju.....	24

Krkovič M. Polimorfizem gena jedrnega receptorja γ , ki ga aktivira ... esencialne arterijske hipertenzije.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2007

KAZALO SLIK

1. Slika 1: Vrednosti krvnega tlaka glede na spol in starost (Task force on blood pressure control in children: Report of the second task force on blood pressure control in children, 1987).....	4
2. Slika 2: Mozaični model nastanka EAH (prirejeno po: Page I. H. 1967. Mozaična teorija hipertenzije. Perspectives in Biology and medicine, 10, 3: 325-333).....	5
3. Slika 3: Molekularni mehanizem delovanja PPAR γ 2 (Guan, 2004).....	10
4. Slika 4: Struktura gena za PPAR γ (Deswergne in Wahli, 1999).....	13
5. Slika 5: PPAR γ 2 in njegovi do sedaj najbolj proučevani polimorfizmi.....	14
6. Slika 6: Analiza polimorfizma Pro12Ala gena PPAR γ	22

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AH	arterijska hipertenzija
a.k.	aminokislina
ATP	adenozin trifosfat
BMI	indeks telesne teže (angl. body mass index)
bp	bazni par
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
dNTP	deoksinukleozid trifosfat
EAH	esencialna arterijska hipertenzija
EKG	elektrokardiogram
eNOS	endotelijska NO sintaza
HDL	angl. high density lipoprotein
HWE	Hardy-Weinbergovo ravnovesje (angl. Hardy-Weinberg equilibrium)
IZ	interval zaupanja
KT	krvni tlak
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
PPAR γ	receptor jedra gama, ki ga aktivira peroksisomski proliferator
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. Restriction fragment length polymorphism)
RLE	raztopina za lizo eritrocitov
RLL	raztopina za lizo levkocitov
RO	razmerje obojnih
SD	standardna deviacija
SNP	polimorfizem posameznih nukleotidov (angl. SNP - single nucleotide polymorphism)
RXR	retinoidni X receptor
RAR	receptor za retinoidno kislino

SLOVARČEK

- BMI** indeks telesne teže (angl. Body mass index) je statistična enota prikazovanja teže, ki je umerjena na višino telesa. Ljudje, ki imajo BMI večji od 30 se smatrajo kot ljudje s prekomerno telesno težo.
- inzulinska rezistenca** inzulin je hormon trebušne slinavke, ki uravnava raven glukoze v krvi in sicer na način, da omogoči prehod glukoze v celico, kjer je le - ta potrebna oziroma se v celicah jeter in mišic pretvarja v glikogen, ki predstavlja zalogo glukoze v telesu. Inzulinska rezistenca je stanje, ko normalna koncentracija inzulina ne zadošča, da bi se koncentracija glukoze v krvi znižala na normalno vrednost, zato trebušna slinavka izloča več inzulina. Vsak bolnik s hipertenzijo ima tudi inzulinsko rezistenco.
- ishemija** stanje nezadostne prekrvljenosti tkiva. Celicam v ishemičnem tkivu primanjkuje kisika in hranil, kar vodi v okvaro tkiva ali organa.
- kaotropni agensi** najpogostejše gre za soli, ki rahljajo molekulsko strukturo predvsem z rahljanjem vodikovih, Wan - der Waalsovih in hidrofobnih vezi
- minutni volumen srca** količina krvi, katero srce prečrpa v eni minuti
- PPRE** (angl. peroxisome proliferator response element) Odsek DNA na promotorju regulatornega gena, kamor se pripenja PPAR γ
- SNP** (angl. single nucleotide polymorphism) Polimorfizem na enem samem nukleotidnem mestu

1. UVOD

Arterijska hipertenzija (AH) je zaradi svoje razsežnosti eden glavnih zdravstvenih problemov v svetu (Strasser, 1997). Imenujemo jo lahko tudi "civilizacijska bolezen", saj je nadomestila zgodovinske, predvsem kužne bolezni, kot so kuga, kolera, tuberkuloza, ki so v prejšnjih stoletjih zdesetkale človeštvo. V razvitem svetu prizadene 1 - 3% otrok in 20-25% odraslih (Kaplan, 1994, Gregorič, 1997). Sama AH predstavlja enega najpomembnejših dejavnikov tveganja za razvoj srčno-žilnih bolezni (Iwai *in sod.*, 1994; Tired *in sod.*, 1998).

Krvni tlak (KT) je v fizikalnem pomenu tlak, ki ga povzroča sila gibajoče krvi na steno žile. Da tekočina (kri) teče skozi žilo je potrebna tlačna razlika na dveh različnih koncih žile. Le - ta pa je odvisna od pretoka krvi skozi žilo in od upora žil (periferni upor). Najpogosteje se izraz krvni tlak uporablja za arterijski krvni tlak, saj vene zelo malo prispevajo k skupnemu perifernemu uporu. Krvni tlak je tem večji, čim silnejši je srčni utrip, čim hitreje srce utriplje, čim več je krvi v obtoku, čim ožje so žile in čim bolj je kri židka (viskozna). Med srčnim stisljajem je tlak višji (sistolični tlak) kot med raztezanjem (diastolični tlak). Čeprav je osnovna fizikalna enota za tlak pascal (Pa) merimo krvni tlak iz zgodovinskih razlogov najpogosteje v mmHg.

Pri večini bolnikov etiologija bolezni (AH) ni znana. Namreč, AH je multifaktorsko pogojena bolezen, pri nastanku katere sodelujejo številni genetski dejavniki in dejavniki okolja (Kaplan, 1994). Genetski dejavniki so odgovorni za motnje presnove maščob in sladkorja (Annest *in sod.*, 1979), debelost (Wiciok, 2000), motnje v izločanju in prenosu natrija preko celične membrane (Bonilla *in sod.*, 1999), struktura žilne stene (Bonilla *in sod.*, 1999). Med eksogene dejavnike pa uvrščamo dejavnike okolja, motnje hranjenja (Bratanič, 2000), stres (McCorry, 1992), neuravnotežene prehranjevalne navade, prevelika količina zaužite soli (Wiciok, 2000). Dejavniki tveganja za AH se pri odraslih in otrocih ne razlikujejo.

Upravljanje krvnega tlaka je izjemno zapleteno, saj je uravnavan na več načinov. In sicer poteka hitra (nevralna) uravnava preko baroreceptorjev v aorti, preko kemoreptorskega refleksa ob pomanjkanju O_2 in zmanjšanjem krvnem tlaku ter tudi preko ishemijske

reakcije, ki deluje v skrajnih primerih, ko pade tlak pod 50mmHg.

Počasna (fiziološka) uravnava poteka na nivoju prehoda tekočine iz/v kapilare in preko stresne relaksacije arterij ob primerih nenadnega dviga tlaka.

Dolgoročno uravnavanje poteka preko ledvic, saj imajo le - te poglavitno vlogo pri uravnavanju volumna telesne tekočine. Še posebno vlogo ima tu hormonsko uravnavanje (aldosteron) in renin - angiotenzinski sistem (RAS) ter natriuretski faktor, ki deluje ravno nasprotno kot RAS.

Prvo vodilo k opažanju anomalij krvnega tlaka in vzrokov za nastanek AH na genetskem nivoju, je bila pogosta prisotnost AH v nekaterih družinah (Ward, 1995). Vendar se genetski dejavniki izražajo v kompleksni mreži medsebojnih interakcij (Peterlin *in sod.*, 1998).

Novejša spoznanja so razširila dejavnost na iskanje potencialnih genetskih dejavnikov tveganja (kandidatni geni) za AH, ki jih diagnosticiramo z genetskimi polimorfizmi (Lifton, 1993). Raziskujemo jih v asociacijskih študijah, ki so glede na literaturo (Risch in Merkanigas, 1996) ustrezen način raziskovanja kompleksnih bolezni, katerih vzrok so številni dejavniki. Ugotoviti želimo ali se pogostnost določenih genotipov statistično značilno razlikuje med pacienti z določeno boleznijo in med kontrolno skupino, ki te bolezni nima. Omenjeni genotip imenujemo rizični faktor oziroma genetski označevalec za določeno bolezen.

1.1 EPIDEMIOLOGIJA ARTERIJSKE HIPERTENZIJE

Arterijska hipertenzija je ena najpogostejših bolezni, saj prizadene okoli 20 do 25% odrasle populacije v razvitem svetu in je enako zastopana po spolu (Dobovišek, 1998). Med otroki in mladostniki so epidemiološke študije doma in na tujem pokazale, da je razširjenost arterijske hipertenzije 1-3%, v naši epidemiološki študiji v Mariboru pa 1,2% (Kaplan, 1994, Gregorič, 1997). Pogostnost arterijske hipertenzije je odvisna tudi od starosti in varira okoli 16% v starosti med 35 in 44 leti in 55% pri bolnikih starih okoli 60.-ega leta. V Sloveniji je incidenca arterijske hipertenzije 18,9% (Accetto, 1997a).

Povišan krvni tlak je pomemben dejavnik tveganja za srčno - žilno obolenost in smrtnost (cerebrovaskularna obolenja, odpoved srca, miokardni infarkt, odpoved ledvic). Epidemiološke študije so pokazale, da se smrtnost poveča za 15% pri zvišanju krvnega tlaka za 5 do 15% nad povprečjem ter da je znižanje krvnega tlaka smrtnost zmanjšalo (Kaplan, 1994).

Rizični dejavnik pri ugotavljanju oziroma odkrivanju arterijske hipertenzije je debelost v družini (Gillman *in sod.*, 1993). Otroci, ki so se rodili z nizko porodno težo so prav tako rizični za nastanek AH (Yiu *in sod.*, 1999).

Iz številnih študij povzamemo, da telesno težo, ki jo prikazujemo z indeksom telesne teže (BMI) in krvni tlak lahko predvidimo čez 10 let oziroma v odrasli dobi, kot je razvidno iz študije Bogalusa (Berenson *in sod.*, 1994; Bao *in sod.*, 1995)

Dosedanje študije niso pokazale povezave med kakšnim samostojnim genskim rizičnim faktorjem in AH.

1.2 DEFINICIJA EAH PRI OTROCIH

Čeprav je AH značilna bolezen odraslih, so v zadnjih letih začeli temeljito proučevati AH tudi pri otrocih in mladostnikih. Kajti pred tem so menili, da gre pri AH vedno za sekundarno obliko, kar je pomenilo, da je AH le posledica neke druge bolezni, najpogosteje ledvične ali srčno - žilne.

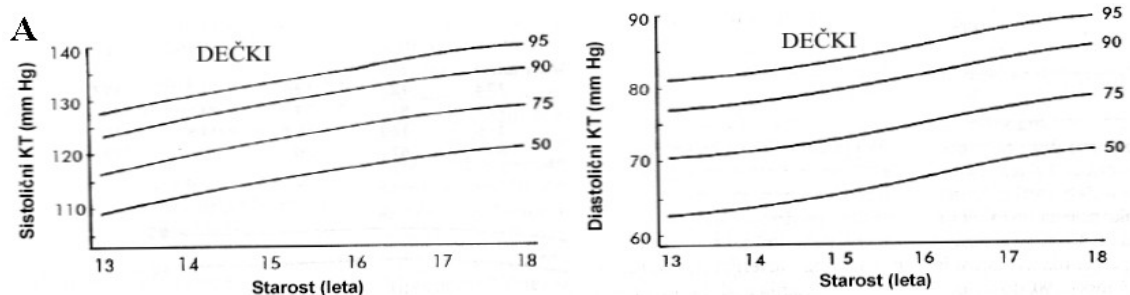
Etiologija esencialne arterijske hipertenzije (EAH) ni znana (Pineas in Elkwiry, 1992). Včasih jo imenujemo tudi primarna AH. Le - ta je pogostejša pri otrocih in dojenčkih, medtem, ko je sekundarna pogostejša pri mladostnikih (Gregorič, 1997).

Danes je moč AH dokazati že pri otrocih in je njena prevalenca pri mladostnikih 1%. Tako kot pri odraslih, velja tudi za otroško populacijo, da ima približno 90% populacije EAH in le 10% sekundarno AH (Gregorič, 1997).

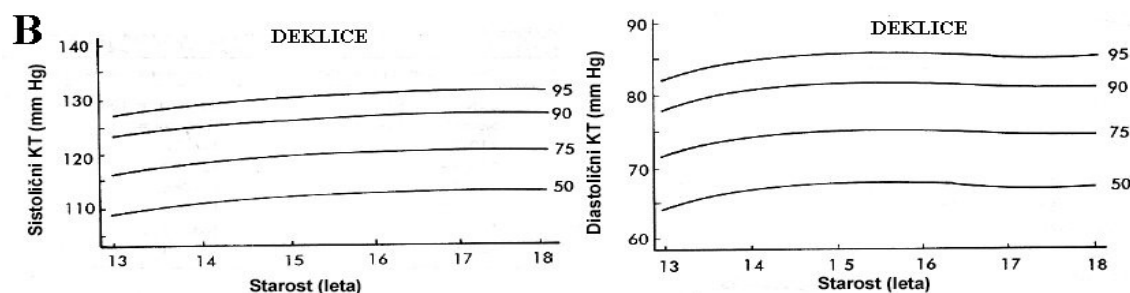
Ker posameznikov krvni tlak ostaja več let v istem percentilnem razredu, obstaja verjetnost, da bo imel otrok s krvnim tlakom večjim od devetdesetega percentila (P_{90}), kot odrasel zvišan krvni tlak.

Krvni tlak se pri otrocih postopno zvišuje od rojstva do mladostniškega obdobja. Za mejo med normalnim in povišanim krvnim tlakom je ameriška delovna skupina za hipertenzijo (Task Force on Blood Pressure Control In Children, 1987) priporočila naslednje vrednosti (slika 1):

- normalni krvni tlak je sistolični in diastolični krvni tlak, ki je nižji od P_{90} za spol in starost;
- visoko normalen krvni tlak je povprečni (najmanj dve merjenji) sistolični in (ali) diastolični krvni tlak med P_{90} in P_{95} , določen za spol in starost;
- povišan krvni tlak je sistolični ali diastolični krvni tlak, ki je enak ali večji od P_{95} -ega percentila za spol in starost.



vrednost P_{90} za starost [dečki]	13	14	15	16	17	18
sistolični KT [mmHg]	124	126	129	131	134	136
diastolični KT [mmHg]	77	78	79	81	83	84
višina v cm	165	172	178	182	184	184
teža v kg	62	68	74	80	84	86



vrednost P_{90} za starost [deklice]	13	14	15	16	17	18
sistolični KT [mmHg]	124	125	126	127	127	127
diastolični KT [mmHg]	78	81	82	81	80	80
višina v cm	165	168	169	170	170	170
teža v kg	63	67	70	72	74	74

Slika 1: Vrednosti krvnega tlaka glede na spol in starost; A - zgoraj: graf prikazuje vrednosti sistoličnega in diastoličnega tlaka pri dečkih glede na starost. A - spodaj: Tabela prikazuje natančne vrednosti krvnega tlaka glede na starost dečkov ; B - zgoraj: Graf prikazuje vrednosti sistoličnega in diastoličnega tlaka pri deklicah. B - spodaj: Tabela prikazuje natančne vrednosti krvnega tlaka pri deklicah. (Task force on blood pressure control in children: Report of the second task force on blood pressure control in children, 1987)

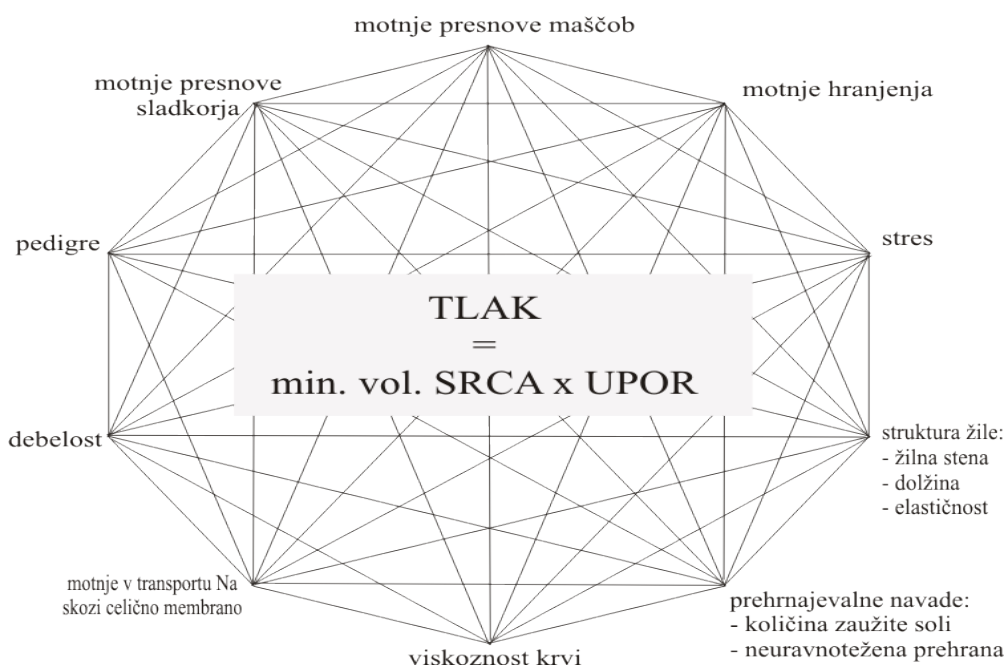
1.3

PATOGENEZA ESENCIALNE ARTERIJSKE HIPERTENZIJE

AH opredelimo glede na anamnestične podatke, klinično sliko in izvide preiskav na esencialno in sekundarno hipertenzijo. Če vzroka za AH ne najdemo govorimo o EAH, če pa odkrijemo vzrok, govorimo o sekundarni arterijski hipertenziji.

Sekundarna AH je lahko bodisi prehodna ali kronična (Gregorič, 1997). Vzroki sekundarne AH so najpogostejše ledvični (Leuman, 1983), žilni, bolezni endokrinih žlez (hipertiroidizem, hiperparatiroidizem...), vzroki v osrednjem živčevju (tumorji, krvavitve (Falkner, 1993; Jakša, 1992)).

Ker natančnih vzrokov za nastanek EAH ne poznamo, si pomagamo z raziskovanjem mehanizmov ki pripeljejo do zvišanega KT. Glede na to, da je tlak produkt pretoka (minutni volumen srca) in upora, lahko sklepamo, da tlak zagotavlja ustrezno prekrvitev tkiv. Iz tega je izhajal tudi Page (1967), ki je sestavil mozaični model nastanka EAH. Model ne razjasni neposredne sosledne vzročnosti, ampak trdi, da je EAH posledica delovanja številnih dejavnikov, ki so medsebojno povezani. Zato sprememba v enem mehanizmu sproži spremembe v številnih drugih mehanizmi in ne samo na enem. Napoveduje tudi, da bodo na novo odkriti mehanizmi, le del tega mozaika (Slika 2).



Slika 2: Mozaični model nastanka EAH (prirejeno po : Page I.H. 1967. Mozaična teorija hipertenzije. *Perspectives in biology and medicine*, 10, 3: 325-333)

Številni poskusi na živalih in opazovanja na ljudeh so pokazali, da je začetni dejavnik pri nastanku AH najverjetneje povečan minutni volumen srca, ki mu sledi zvečanje perifernega upora (Kaplan, 1994). Nekatere študije so tudi pokazale, da je krožeči volumen krvi pri bolnikih z EAH večji od normalnega, medtem ko v drugih, pa dokazujejo ravno obratno (Kaplan, 1994).

1.3.1 Uravnavanje krvnega tlaka

Uravnavanje krvnega tlaka je izjemno zapletena, saj je reguliran preko treh različnih sistemov, ki so med seboj soodvisni in se aktivirajo ob različnih spremembah KT in delujejo v različno dolgih časovnih intervalih.

Hitra (nevralna) uravnava poteka preko baroreceptorjev v aorti, ki ob nenadni spremembi KT v cervikalni aorti sporočijo informacijo v vazomotorični center, kar ima za posledico vazokonstrikcijo.

Na podoben način deluje kemoreptorski refleks, kjer pomanjkanje O_2 ob zmanjšanem KT sproži, preko možgan, splošno vazokonstrikcijo.

Ishemijska reakcija je mehanizem (sprožitev simpatikusa, kar ima za posledico vazokonstrikcijo), ki deluje v skrajnih primerih, ko pade tlak pod 50mmHg.

Počasno (fiziološko) uravnavanje poteka na nivoju prehoda tekočine iz/v kapilare. In sicer se ob povišanem tlaku poveča izločanje tekočine iz kapilar v intersticij, kar posledično doprinese k znižanju krvnega tlaka zaradi manjše količine tekočine v kapilarah.

Ob primerih nenadnega dviga tlaka zaradi stresne situacije se arterije že po kakšni uri adaptirajo in s tem znižajo KT.

Dolgoročna uravnava KT poteka preko ledvic, saj imajo le - te poglavitno vlogo pri uravnavanju volumna tekočine v telesu. Ob povišanem KT je več tekočine v intersticiju in takrat ledvica pospešeno odvaja tekočino in soli iz telesa.

Pomembno vlogo ima tudi hormonska uravnava (aldosteron) in sistem (RAS) ter natriuretski faktor, ki deluje ravno nasprotno kot RAS.

Nobeden od teh mehanizmov ni sposoben samostojne uravnave krvnega tlaka, ampak delujejo v soodvisnosti in po principu, nekateri bolj, nekateri manj, v določenih primerih.

1.4 DRUŽINSKA OBREMENITEV KOT DEJAVNIK TVEGANJA ZA AH

Arterijska hipertenzija je multifaktorska bolezen, na katero vplivajo dejavniki okolja in genetski dejavniki (Julius in Jamerson, 1994). Poznavanje genetskih dejavnikov je omejeno. Prvo opažanje, ki je usmerilo raziskovalce v iskanje genetskih dejavnikov pri nastanku AH, je bila pogosta prisotnost AH v nekaterih družinah. Ugotovili so, da je pomemben dejavnik tveganja za razvoj AH, podatek o bolnikih z AH v bližnjem sorodstvu (Whitaker *in sod.*, 1997, Lauer *in sod.*, 1993).

AH je približno dvakrat pogostejša pri ljudeh, pri katerih jo ima eden od staršev (Ward, 1995). Pri tem pa ima zelo pomembno vlogo tudi prehrana, navade in slog življenja, ki jih najpogosteje pridobimo preko staršev.

Podobno sliko kažejo raziskave dvojčkov in ostale epidemiološke raziskave, ki nakazujejo, da je AH dedna bolezen, ki se prenaša iz roda v rod (Havlik *in sod.*, 1979).

1.5 KANDIDATNI GENI ZA EAH

Pri raziskovanju AH, kot predstavnico multifaktorsko - poligensko razvijajoče se bolezni, se uporablja pristop t.i. "funkcionalnih kandidatnih genov", ki temelji na predhodnem poznavanju patofiziologije AH in poznavanju živalskih modelov (Boerwinkle, 1996; Lifton, 1993; Sibony *in sod.*, 1993).

Nekaj možnih genov v povezavi z AH:

- gen za Na^+/H^+ antiporter 1 (NHE-1), ki je odgovoren za izmenjavo Na^+ in H^+
- gen za renin, ki katalizira nastajanje angiotenzina I, ki se v pljučih s pomočjo angiotenzinske konvertaze spremeni v angiotenzin II, ki je močan vazokonstriktor
- gen za angiotenzinsko konvertazo
- gen za sintazo dušikovega oksida (eNOS), ki je znani vazodilatator

- gen za inzulinske receptorje
- geni za skupino receptorjev jedra, ki aktivirajo peroksisomsko proliferacijo (PPAR)

Genske polimorfizme v kandidatnih genih za AH raziskujemo v asociacijskih študijah (Boerwinkle, 1996). Temeljno načelo asociacijskih študij je iskanje povezave med določenim genskim označevalcem (genotipom) in določenim fenotipom, kot je to npr. AH. Torej, z asociacijskimi študijami odkrivamo ali je kakšen alel pogostejše zastopan med bolniki kot v kontrolni skupini.

1.6 VLOGA PPAR γ

Receptor jedra gama, ki ga aktivira peroksisomski proliferator (PPAR γ), spada v družino transkripcijskih nuklearnih faktorjev (Bishop-Bailey *in sod.*, 2002), ki šteje 48 (Guan, 2004) oziroma kar 70 (Moras in Gronemeyer, 1998) receptorjev in regulira številne fiziološke procese kot so npr. homeostaza, celična diferenciacija in embriološke procese (Gronemeyer in Laudet, 1995)

Nomenklatura superdružine nuklearnih receptorjev (označeni z „NR“) temelji na evolucijski sorodnosti najbolj ohranjenih regij (C, E regija). Razvrščeni so v 6 poddružin, ki so označene z zaporedno številko, znotraj le teh pa v skupine označene s črko. Skupina PPAR receptorjev spada v skupino 1C (Nuclear Receptor Committee, 1999).

PPAR γ je bil prvič kloniran kot receptor, ki v aktivnem stanju (vezan ligand) poveča velikost in inducira proliferacijo peroksisomov v hepatocitah glodavcev (Isseman in Green, 1990).

PPAR spadajo v isto družino kot steroidni in tiroidni hormoni (Desvergne in Wahli, 1999). Zato so jih takoj povezali z metabolizmom karbohidratov, maščob in proteinov, celično rastjo in diferenciacijo, adipogenezo, imunskim odzivom (Desvergne in Wahli, 1999).

Tako PPAR γ vpliva na raven glukoze in inzulinsko rezistenco (Kubota *in sod.*, 1999), zmanjša vnetni odgovor (Ricote *in sod.*, 1998), zmanjša sintezo vnetnih metabolitov, kot so

TNF, interlevkin-1, interlevkin-6 (Jiang *in sod.*, 1998).

Družina receptorjev PPAR je razdeljena v tri skupine, ki vključujejo tri podtipe (izotipe) receptorjev, katerih geni so paralogni (Nuclear Receptor Comittee, 1999). In sicer receptorje α (alfa) (NR 1C1), γ (gama) (NR 1C3) in δ (delta) (NR 1C2) (Willlson *in sod.*, 2000).

Receptor PPAR α je večinoma sintetiziran v jetrih, ledvicah, srcu in skeletnih mišicah. Ne aktivira peroksisomske proliferacije pri ljudeh (Bentley *in sod.*, 1993).

Malo je znanega o PPAR δ , še posebno o njegovi fiziološki vlogi. Gen za PPAR δ se prepisuje v številnih tkivih (možgani, adipozno tkivo, koža) (Braissant *in sod.*, 1996). Nekako najbolj verjetna je povezava z uravnavanjem vstopa in izstopa holesterola v makrofage (Oliver *in sod.*, 2001).

Skupina receptorjev PPAR γ je razdeljena v tri podskupine (Berger in Moller, 2002). In sicer:

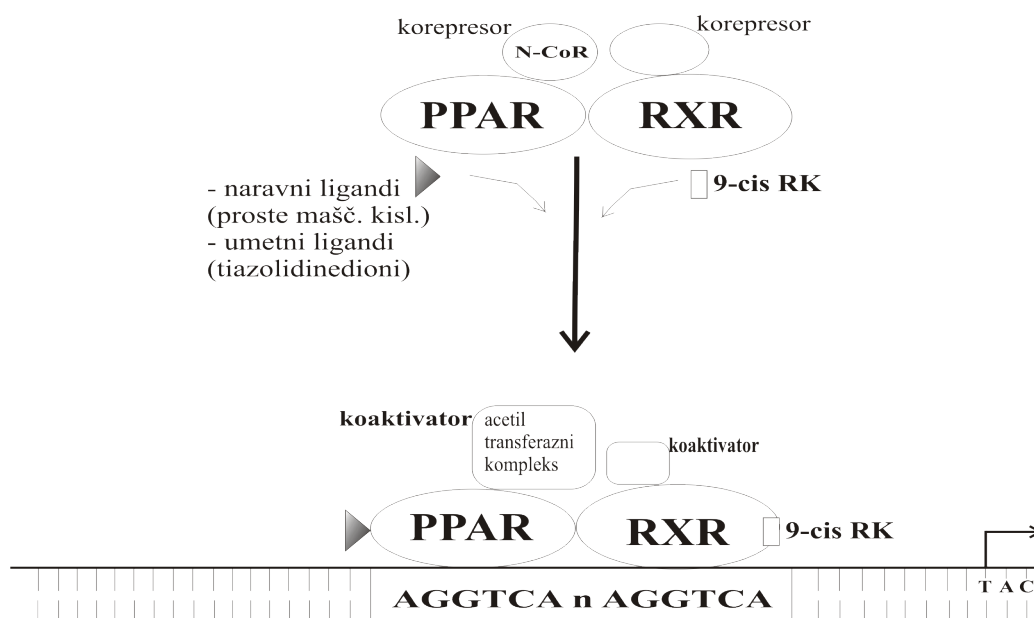
- PPAR γ 1: sintetizira se v vseh tkivih, pretežno v jetrih
- PPAR γ 2: sintetizira se pretežno v adipocitah (28 a.k. daljši)
- PPAR γ 3: sintetizira se v makrofagih, debelem črevesu, belem maščobnem tkivu

Podskupinsko različni so tudi kofaktorji in ligandi (Kiec-Wilk *in sod.*, 2005).

Tontoz in sodelavci (1994) so objavili njegovo vlogo pri razvoju adipocit. In sicer se prekursorska fibroblastna celica, s pomočjo aktivacije PPAR γ in ostalih regulatornih proteinov, diferencira preko nalaganja maščobnih kapljic v veliko maščobno vakuolo, kar je značilnost adipocit. Torej ima receptor PPAR γ vlogo induciranja transkripcije genov, ki skrbijo za diferenciacijo adipocit in za shranjevanje maščobe. Medtem ko so raziskave *in vivo* na genetsko spremenjenih miši, katerim je bil inhibiran PPAR γ , pokazale ključno vlogo receptorja pri razvoju belega in rjavega maščevja (Barak *in sod.*, 1999).

Molekularna fiziologija receptorja PPAR γ , v človeškem organizmu ima podobno vlogo, kot vsi ostali transkripcijski faktorji. Sam potek aktivacije se prične z vezavo liganda na receptor. Namreč receptor PPAR γ je v jedru ves čas heterodimeriziran z RXR proteinom

(Pershadsingh, 2004). Namreč, RXR receptor (retinoidni X receptor iz skupine NR 2B) se heterodimerizira s steroidnimi in tiroidnimi receptorji, kamor spadajo receptorji PPAR, receptor vitamina D in LXR (jetrni X receptor) (Hazra *in sod.*, 2004). Nanju sta na C konec proteina pripeta proteina (korepresorja), ki delata takšen kompleks (heterodimer in korepresor) neaktivnega. Za izoformo PPAR γ 2 so to najpogostejše molekule N-CoR (angl. Nuclear receptor corepresor) in SMRT (angl. Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor) (Guan, 2004). Ko se na AF2 regijo receptorja pripne ligand, pride najprej do spremembe konformacijskega stanja, kar ima za posledico odcepitev inhibitornega proteina (korepresorja). Nato se heterodimer z vezanim ligandom preko DNA vezavne regije (regija C) pripne na promotorsko regijo tarčnega gena. Del promotorske DNA, na katerega se pripne heterodimer imenujemo PPRE (angl. Peroxisome - proliferator response element), ki vsebuje heksamerne ponovitve 5' (AGGTCA) $_n$ -3', pri čemer X pomeni poljuben nukleotid (Hazra *in sod.*, 2004). Cinkove zanke služijo za vezavo na ta del promotorja. Ob vezavi kompleksa na PPRE se nanj pripne koaktivator. Če je koaktivator acetil transferazni kompleks le - ta najprej acilira histonske repe, kar spremeni obliko zvite DNA, čemur sledi pripenjanje polimeraze, ki prične s prepisovanjem reguliranega gena (Desvergne in Wahli, 1998) (Slika 3).



Slika 3: Molekularni mehanizem delovanja PPAR γ 2. Na heterodimer PPAR γ /RXR, ki je v jedru, je pripet inhibitorni protein imenovan korepresor. Ob vezavi liganda (naravni ali umetni) se spremeni konformacijsko stanje receptorja in sledi odcepitev korepresorja. Temu sledi vezava koaktivatorskega acetil transferaznega kompleksa, ki najprej acilira histonske repe, da DNA spremeni svoje konformacijsko stanje, čemur sledi pripenjanje polimeraze. (Guan, 2004)

Uravnavanje aktivnosti heterodimera poteka preko vezave ligandov in kofaktorjev (korepresorjev in koaktivatorjev). Ko se heterodimer z vezanim ligandom pripne na PPRe, se mora nanj pripeti tudi koaktivator. Za PPAR γ so to največkrat steroidni receptor koaktivator - 1 (SRC 1), CBP proteini, PGC1 (PPAR γ koaktivator-1), acetil transferazni kompleks. Desvergene in sodelavci pa so dokazali, da v primeru, ko je na RXR receptor tudi pripet ligand (9-*cis* retinoična kislina) ima aditiven učinek na hitrost prepisovanja. O koaktivatorjih in korepresorjih, ki so pripeti na RXR je malo znanega.

Ker ligandov dolgo časa niso poznali, se mnogokrat PPAR receptorje imenuje „osamljeni receptorji“ (angl. orphan receptors). Aktivirajo jih tako naravni ligandi (prostaglandin J₂, proste maščobne kisline), ki se nahajajo zunaj jedra, kakor tudi umetni (tiazolidinedioni) (Guan, 2004).

PPAR je terapevtska tarča za tretiranje bolnikov s tiazolidinedioni, kot sta to pioglitazon in rosiglitazon, ki predstavljajo umetne ligande za PPAR. Uporablja se jih za zdravljenje bolnikov z diabetesom tipa 2 (Pershadsingh, 2004). Dokazano tudi zmanjšujejo koncentracijo trigliceridov maščobnih kislin (Diamant in Heine, 2003). Izkazali so se tudi kot potencialni protivnetni, antitrombotični agensi, kar dolgoročno znižuje tveganje za razvoj kardiovaskularnih bolezni pri pacientih z diabetesom tipa 2 (Pershadsingh, 2004).

1.6.1 VLOGA PPAR γ PRI BOLNIKI Z AH

Glede na to, da je hipertenzija multifaktorsko pogojena bolezen, je bilo zadnje čase veliko študij narejenih na živalskih modelih s hipertenzijo, inzulinsko rezistenco ali obojim. Prav tako je bilo ugotovljeno, da agonisti PPAR γ - tiazolidinedioni, zmanjšajo krvni pritisk in zmanjšujejo tveganje za razvoj hipertenzije (Buchanan *in sod.*, 1995). Pri pacientih z različnimi komponentami metabolnega sindroma je bilo dokazano signifikantno znižanje krvnega pritiska, in sicer 4-5 mm Hg znižan sistolični krvni pritisk ter 2-4 mm Hg znižan diastolični krvni pritisk. (Negro *in sod.*, 2004).

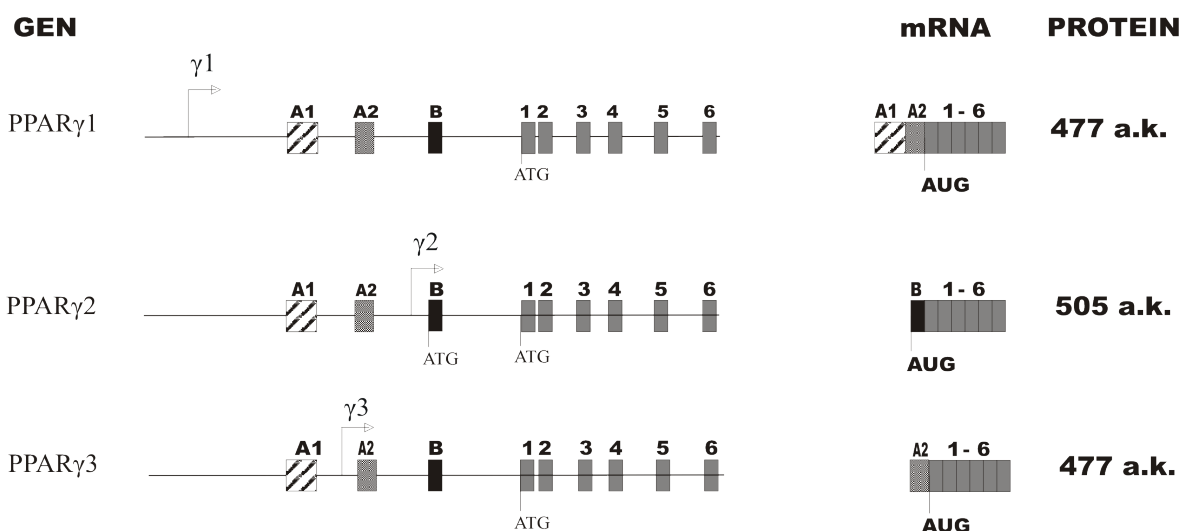
Eden izmed adaptacijskih mehanizmov kardiovaskularnega sistema na kronično povišanje krvnega pritiska je tudi hipertrofija levega srčnega prekata. Številne študije so pokazale, da

aktivacija PPAR γ inhibira hipertrofijo in ima številne antihipertenzitivne funkcije (Kiec - Wilk in sod., 2005), kot na primer stimulacija produkcije NO, ki je znan vazodilatator (Calnek in sod., 2003). Raziskave Asakawe in sodelavcev (Asakawa in sod., 2002) so pokazale klinično pozitivni efekt aktivacije PPAR γ na hipertrofijo srčne mišice pri bolnikih z arterijsko hipertenzijo. Prav tako je dokazano, da aktivni PPAR γ inhibira proliferacijo vaskularnih celic gladkih mišic v steni žil (Iglarz in sod., 2003).

1.7 GEN ZA PPAR γ

Gen za PPAR γ se nahaja na kromosomu 3 (3p25) (Greene *in sod.*, 1995). Gen kodira dve različni izoformi receptorjev: PPAR γ 1 in PPAR γ 2 in tri različne mRNA, ki nastanejo kot posledica uporabe različnih promotorjev in različnega (alternativnega) izrezovanja mRNA in ne kot posledica izražanja različnih genov. Na ta način se izoformi razlikujeta v aminokislinski sekvenci na N-terminalnem delu proteina (Deswergne in Wahli, 1999).

Skupno obema izoformama je 6 eksonov, in sicer 1 ekson za N-terminalno regijo (A/B domena), 2 eksona za DNA-vezavno domeno (C regija), 1 ekson za D regijo, 2 eksona za E/F regijo (Slika 4)



Slika 4: Struktura gena za PPAR γ . Dve različni izoformi (PPAR γ 1, PPAR γ 2) nastaneta z uporabo različnih promotorjev in različnega izrezovanja mRNA (mRNA PPAR γ 1, mRNA PPAR γ 2). Skupno obema izoformama je 6 eksonov (obarvani s sivo). Izoforma PPAR γ 2 ima na N - terminalnem koncu dodan ekson B (obarvan s črno), kar ima za posledico za 28 aminokislin daljši protein. mRNA PPAR γ 1 in mRNA PPAR γ 3 sta različni. In sicer se njuno prepisovanje prične na različnih promotorjih. Tako je mRNA PPAR γ 1 sestavljena poleg skupnih šestih eksonov še iz dodatnih A1 (črtast vzorec) in A2 (pikčast vzorec), medtem ko ima mRNA PPAR γ 3 na N - terminalnem delu dodan le ekson A2. Ker eksona A1 in A2 nimata začetnega translacijskega kodona (AUG), se translacija prične na začetku prvega skupnega eksona (ekson 1). (Desvergne in Wahli, 1999)

Izoforma PPAR γ 2 je sestavljena iz 7 eksonov (505 aminokislin). Zanj je značilen je ekson B na N - terminalnem delu, ki se v genotipski DNA nahaja med eksonom A2 in prvim skupnim eksonom 1. Le - ta (ekson B) po zaključeni translaciji prispeva dodatnih 28 aminokislin na N - terminalnem delu proteina.

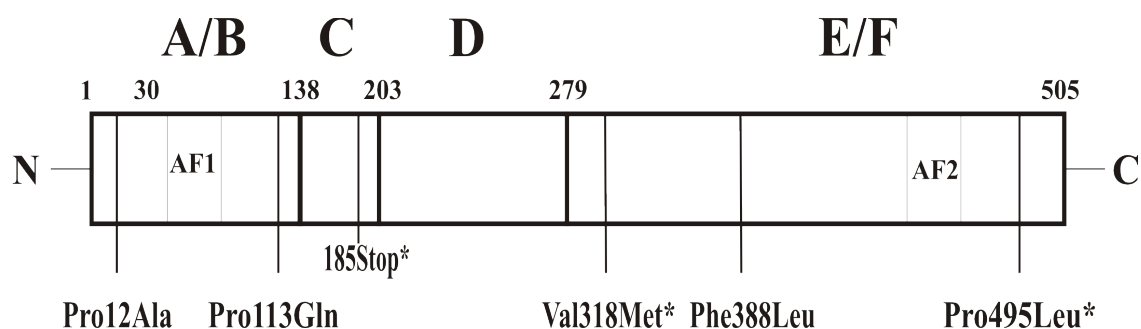
mRNA PPAR γ 1 in mRNA PPAR γ 3 sta različni. Njuna transkripcija se prične na različnih promotorjih. K njuni različni nukleotidni sekvenci prispeva tudi različno izrezovanje intronskih regij. Tako je mRNA PPAR γ 1 sestavljena iz skupnih šestih eksonov in iz dodatnih dveh (A1 in A2), medtem ko ima mRNA PPAR γ 3 poleg skupnih šestih eksonov pripet le ekson A2. Ker eksona A1 in A2, za razliko od eksona B, nimata začetnega translacijskega kodona (AUG) se translacija tako pri mRNA PPAR γ 1 kot pri mRNA PPAR γ 3 prične na začetku prvega skupnega eksona (ekson 1). Posledica tega so proteini, ki imajo enako aminokislinsko zaporedje (Slika 4) (Desvergne in Wahli, 1999).

Protein PPAR γ 2 je sestavljen iz 4 (štirih) funkcionalnih domen (Moras in Gronemeyer, 1998), tako kot vsi ostali nuklearni receptorji (Slika 5):

- N - terminalna, od liganda neodvisna domena (A/B regija): Njena poddomena AF1 skrbi za aktivacijo receptorja
- DNA vezavna domena (C regija): preko nje se veže receptor na promotorsko regijo tarčnega gena (PPRE – angl. Peroxisome proliferator response element). Kontakt in prepoznavo omogoča struktura dveh cinkovih zank (angl. Zn-finger loop).
Regija C predstavlja najbolj ohranjeno regijo receptorjev PPAR
- domena, kamor se pripenja kofaktor (koaktivator, korepresor) (D regija)
- C-terminalna domena, kamor se pripenja ligand (E / F regija). Znotraj le – te se nahaja AF2 regija, ki je odgovorna za pripenjanje liganda na receptor.

Do sedaj je bilo na samem genu odkritih že nekaj polimorfizmov posameznih nukleotidov (angl. single nucleotide polymorphisms - SNP), ki so povzročili drugačnosmiselne mutacije (angl. missense). In sicer (slika 5):

- Pro113Gln
- 185Stop
- Val318Met
- Phe388Leu
- Pro495Leu
- Pro12Ala pri PPAR γ 2 je do sedaj najbolj proučevan polimorfizem na dodatnem N - terminalnem delu (12. kodon mRNA eksona B) izoforme PPAR γ 2 receptorja (Stumvoll in Häring, 2002). Rezultat je posledica transverzije pirimidina v purin (CCA v GCA) (Slika 5).



Slika 5: PPAR γ 2 in njegovi do sedaj najbolj proučevani polimorfizmi. Pro12Ala je edini polimorfizem, ki je značilen zgolj za PPAR γ 2. Ostali so prisotni tako v izoformi PPAR γ 1 kot v izoformi PPAR γ 2. Polimorfizmi označeni z zvezdico (*) imajo za posledico izgubo funkcije receptorja. Polimorfizmi brez dodatne zvezdice prispevajo k zmanjšani aktivnosti receptorja. (Knouff in Auwerx, 2004)

2. NAMEN DELA IN HIPOTEZE

V naši raziskavi smo hoteli ugotoviti ali se populacijske značilnosti genskega polimorfizma PPAR γ 2 (Pro12Ala), bolnikov (otrok) z EAH v Sloveniji, razlikujejo od populacije zdravih otrok in s tem oceniti pomen tega polimorfizma pri etiologiji bolezni.

V ta namen smo opravili asociacijsko raziskavo, s katero smo želeli ugotoviti:

- ali genotip Ala12Ala gena za PPAR γ 2 vpliva na nastanek EAH pri otrocih

3. METODE DELA IN PREISKOVANCI

3. PREISKOVANCI IN METODE DELA

3.1 PREISKOVANCI

V študijo smo v okviru magistrske naloge Matjaža Bidovca, dr. med. iz Kliničnega oddelka za nefrologijo Pediatrične klinike Kliničnega centra v Ljubljani (Povezava med polimorfizmom gena za angiotenzinsko konvertazo, za angiotenzinogen in za atrijski natriuretični faktor ter esencialno arterijsko hipertenzijo pri mladostnikih) vključili dve skupini otrok. In sicer je bilo v prvo skupino vključenih 56 bolnikov z EAH, v drugo prav toliko (56) zdravih otrok. Le ti so nam predstavljali kontrolno skupino.

Popolnoma vsi sodelujoči so bili z raziskavo seznanjeni, kar so tudi pisno privolili. Raziskavo je odobrila komisija za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravstvo republike Slovenije, na svoji seji dne 19. 11. 1997 in 31. 5. 1997.

3.1.1 Bolniki z EAH

V raziskavo vključenih 56 bolnikov je bilo starih med 9 in 18 letom. Vsi so se zdravili na nefrološkem oddelku Pediatrične klinike v Ljubljani. Vsi so bili slovenske narodnosti in so zastopali vse geografske regije Slovenije.

3.1.1.1 Vključitveni kriterij

Vključitveni kriterij bolnikov je temeljil na predlogih, ki sta jih predlagali "Second task force for arterial hypertension in children" leta 1987, oziroma 1996 nemško združenje za arterijsko hipertenzijo (Sorgel *in sod.*, 1997). Kot norme so bile upoštevane vrednosti nad P_{95} za starost, višino in težo, kot je to opredelila akademija za pediatrijo (Second task force for arterial hypertension in children, 1987 in 1996). Prav tako smo opredelili EAH kot vrednosti nad P_{95} za višino in spol, izmerjeno z avtomatskim merilcem krvnega tlaka (Space Lab 90207) (Sorgel *in sod.*, 1997).

Dnevni (7-21) in nočni (21-7) krvni tlak jim je bil merjen z avtomatskim merilcem. Diagnoza pa je bila postavljena na podlagi merjenj KT z avtomatskim merilcem, anamnestičnih podatkov, kliničnem pregledu in merjenju KT s sfingomanometrom.

Bolniki s sekundarno AH so bili izključeni na podlagi kliničnih preiskav (EKG, pregled očesnega ozadja, ultrazvok abdomna, krvni sladkor, lipidogram, insulin, dopler renalnih žil). Preiskava se ni v ničemer razlikovala od normalne klinične preiskave.

Anamnezo (osebno in družinsko) in klinične podatke za bolnike z EAH smo povzeli po enotnem vprašalniku.

3.1.2 Kontrolna skupina

V kontrolno skupino je bilo vključenih 56 zdravih otrok, ki so zastopali vse geografske regije Slovenije. Vključitveni pogoj so bili podatki o izmerjenem krvnem tlaku, telesni teži in višini. Anamnezo (osebna in družinska) in klinične podatke smo povzeli po enotnem vprašalniku, ki so ga izpolnjevali pediatri iz perifernih zdravstvenih domov.

Preiskovančevi starši so bili ustno in pisno obveščeni o sodelovanju njihovih otrok v raziskavi. Za sodelovanje v raziskavi so tudi pisno privoli.

Bolnikom z EAH smo vzeli kri za biokemične in molekularno - genetske raziskave, medtem ko smo otrokom iz kontrolne skupine vzeli kri le za molekularno - genetske analize.

3.2 MOLEKULARNO GENETSKE METODE

Pacientovo kri (20ml) smo uporabili za molekularno - genetske raziskave. In sicer metoda, ki smo jo uporabili, temelji na pomnoževanju željnega odseka DNA s polimerazo *in vitro* (verižna reakcija s polimerazo - PCR). DNA smo izolirali iz levkocitov periferne krvi. Pomnožene fragmente DNA smo cepili z restrikcijskimi encimi. Celotno metodo imenujemo tudi polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov ali RFLP (angl. restriction fragment length polymorphism).

3.2.1 Izolacija DNA

3.2.1.1 Izolacija DNA po klasični metodi

Izolacija DNA po klasični metodi je bila izvedena v raziskovalnem laboratoriju za molekularno genetiko Službe za medicinsko genetiko na Ginekološki kliniki v Ljubljani. Odvzeti krvi (20ml) smo dodali desetino volumna krvi antikoagulanta EDTA. Le tako smo lahko hranili do 48 ur na sobni temperaturi, oziroma jo takoj zamrznili na -20°C . Tako zamrznjeno kri smo odmrznili, v vodni kopeli ali na zraku, na sobni temperaturi.

Kri smo centrifugirali 10 minut pri 3000 obratov na minuto in odpipetirali supernatant – plazmo. Preostalemu peletu (10-15ml) smo dodali 50ml raztopine za lizo eritrocitov (RLE) (10ml 2M Tris, 10ml 0,5M EDTA, 1000ml H_2O) in inkubirali 20 minut na ledu ali v hladilniku pri 4°C (potekla je liza eritrocitov). Po 10 - ih minutah centrifugiranja pri 3000 obratih na minuto smo odpipetirali supernatant. Nato smo ponovili postopek dodajanja RLE, centrifugiranja in pipetiranja še 1-krat. Dodatek (3ml) RLE je povzročil, da je nastala suspenzija, kateri smo dodali 10ml raztopine za lizo levkocitov (RLL) (5ml 2M Tris, 20ml 0,5M EDTA, 10ml 5M NaCl, 20ml 10% SDS in do 1000ml H_2O) in 40 μl proteinaze K (1 mg/ml) za proteolizo. Po končani inkubaciji (16 ur pri 41°C na stresalniku) smo dodali 3,3 ml 9,5 M amonijevega acetata in premešali. Po končanem centrifugiranju (20min pri 3000 obratov na minuto) smo odpipetirali supernatant v svežo epruveto. V tako odpipetirano fazo smo dodali leden absolutni etanol (99,8%) do 50ml in dobro premešali, da se je DNA oborila. Oborino DNA smo sprali najprej v absolutnem, nato pa v 70-odstotnem etanolu ter posušili. Da bi tako izolirano DNA lažje hranili, smo dodali 500 μl pufra TE (10:1) in hranili pri 4°C . Koncentracijo DNA smo določali

spektrofotometrično z merjenjem absorpcije raztopine DNA v primerjavi s topilom (voda) v UV delu svetlobnega spektra ($\lambda=260\text{nm}$), kjer je vrh absorpcije purinskih in pirimidinskih baz.

3.2.1.2 Izolacija DNA s komercialnim kitom FlexiGene DNA kit (QIAGEN)

Izolacija s kitom je potekala po proizvajalčevih navodilih s proizvajalčevimi reagenti. Lizirajoči pufer, ki razgradi celično membrano, smo dodali k vzorcu (300 ml krvi). Po centrifugiranju smo supernatant zavrgli in pelet (jedro, mitohondriji, levkociti, eritrociti) resuspendirali ter kasneje inkubirali v denaturacijskem pufru. Le - ta vsebuje kaotropne soli in proteaze. V tem postopku so se encimsko razgradili proteini, pri čemer je pomagal termodinamski efekt kaotropnih soli. Sledila je precipitacija DNA s pomočjo izopropanola, centrifugiranja, 70%-ega etanola in sušenja. DNA smo nato resuspendirali v hidratacijskem pufru (10mM TrisCl, pH 8.5) in shranili pod temperaturo zmrzišča ($< -25^{\circ}\text{C}$)

3.2.2 Analiza polimorfizma gena za PPAR γ (Pro12Ala)

Genski polimorfizem Pro12Ala smo določili tako, da smo pomnožili odsek DNA gena za PPAR γ in po cepljenju z restrikcijskim encimom, z elektroforezo ločili produkte cepljenja, značilne za posamezen genotip.

3.2.2.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Reakcijska mešanica za PCR (10 μl) je vsebovala 1 μl 10x koncentriranega pufra (Promega), 0,1 μl 10 μM obeh začetnih oligonukleotidov, in sicer P12A-F: 5'-CAAGCCCAGTCCTTTCTGTG-3' in P12A-R: 5'-CCAGTGAAGGAATCGCTTTCCG-3' (Invitrogene), 1 μl 25mM MgCl_2 (Promega), 1 μl 10mM dNTP (Promega), 6,1 μl H_2O , 0,2 μl (1,0U) *Thermus aquaticus* DNA - polimeraze (Promega) in 0,5 μl (500ng) genomske DNA.

Postopek PCR smo izvajali v napravi za verižno pomnoževanje fragmentov DNA (Whatman Biometra Tgradient Thermocycler 2400, Germany) po sledečem postopku:

začetni 10 - minutni denaturaciji DNA (94°C) je sledilo 29 ciklov enominutne denaturacije pri 94°C, 90 sekundnega pripenjanja začetnih oligonukleotidov pri temperaturi 58 °C in enominutna sinteza (podaljševanje) DNA pri 72°C. Protokol se je zaključil z 10 minutnim podaljševanjem pri 72°C.

Prisotnost obarvanih (SYBR® Safe(Molecular Probes)) produktov PCR smo preverjali z elektroforezo na 1 - odstotnem agaroznem gelu (Sigma).

3.2.2.2 Cepitev fragmentov

Vzorec pomnoženih fragmentov smo 8 ur cepili pri 37°C z restrikcijskim encimom *MspI* (Promega, Madison, WI). Le ta ima cepitveno mesto na divjem tipu alela (12Pro). Cepitveno mesto je označeno pod točko 3.2.2.1 in je del začetnih oligonukleotidov (podčrtana črka).

3.3 STATISTIČNA ANALIZA

3.3.1 Opis spremenljivk

Atributivne spremenljivke smo opisali z relativno frekvenco, medtem ko smo zvezne podatke opisali z aritmetično sredino ($\bar{x}$) in standardnim odklonom (SD). Frekvenco genotipov smo izmerili s pomočjo metode štetja in sicer kolikokrat se posamezen genotip pojavi v vzorcu.

3.3.2 Velikost skupin

Velikost skupine smo ocenili na podlagi dosedanjih izkušenj glede na predhodne raziskave na drugih genskih polimorfizmih.

3.3.3 Testiranje razlik med skupinami

Numerične vrednosti spremenljivk pri bolnikih z EAH in kontrolno skupino smo primerjali z analizo variance (Student t-test).

S pomočjo retrospektivne študije obetov smo izračunali razmerje obetov (RO) in 95%

interval zaupanja (IZ). Tako smo dobili podatke o stopnji tveganja za posamezen model genotipov.

Statistično analizo smo naredili s pomočjo računalniškega programa SPSS 14 (SPSS Inc. Illinois) za okolje Windows.

3.3.4 Skladnost genotipov s Hardy-Weinbergovim ravnoesjem

Iz opaženih frekvenc genotipov in nato izračunanih pričakovanih frekvenc genotipov smo s pomočjo Pearsonovega testa chi-kvadrat (χ^2) izračunali χ^2 . S pomočjo tabel nato preverili ali je naša vrednost χ^2 sovpadla znotraj intervala ($p < 0.05$, $p < 0.01$). Nato pa s pomočjo računalniškega programa določili vrednost p in podali oceno o morebitni skladnosti naših genotipov s skladnostjo genotipov v populaciji po Hardy-Weinbergovem načelu.

4. REZULTATI

Analiza bolnikov z EAH je bila razdeljena na klinični in molekularno-genetski del.

4.1 KLINIČNA ANALIZA PREISKOVANCEV

Tabela 1: Klinični podatki o bolnikih z arterijsko hipertenzijo in oseb v kontrolni skupini.

	arterijska hipertenzija	kontrolna skupina	p
število oseb	56	56	
starost ($\bar{x} \pm SD$)	14,7 $\pm$ 2,3 let	13,9 $\pm$ 2,5 let	$p < 0,1$
delež moških (%)	44 (78,6%)	22 (39,3%)	$p < 0,001$
višina ($\bar{x} \pm SD$)	169,3 $\pm$ 14,7 cm	154,7 $\pm$ 39,5 cm	$p < 0,01$
teža ($\bar{x} \pm SD$)	73,9 $\pm$ 19,4 kg	50,7 $\pm$ 18,3 kg	$p < 0,001$
BMI ($\bar{x} \pm SD$)	25,6 $\pm$ 5,5 kg/m ²	19,7 $\pm$ 2,9 kg/m ²	$p < 0,001$
sistolični krvni tlak ($\bar{x} \pm SD$)	148,1 $\pm$ 23,2 mmHg	110,0 $\pm$ 23,5 mmHg	$p < 0,001$
diastolični krvni tlak ($\bar{x} \pm SD$)	87,0 $\pm$ 17,8 mmHg	67,6 $\pm$ 14,8 mmHg	$p < 0,001$

Med bolniki in kontrolno skupino ni bilo statistično značilnih razlik v starosti (Tabela 1). Prav tako je iz Tabele 1 razvidno, da je bil v skupini bolnikov z arterijsko hipertenzijo delež dečkov večji, kot v kontrolni skupini in da so bolniki imeli višji sistolični in diastolični krvni tlak kot kontrolna skupina.

Bolniki so imeli večjo telesno težo in višji indeks telesne teže (BMI) kot kontrolna skupina

(Tabela 1). BMI je bil v skupini z arterijsko hipertenzijo bistveno višji, nad P_{95} za starost, medtem, ko je bil v kontrolni skupini nad P_{50} za starost.

Tabela 2: BMI pri bolnikih z arterijsko hipertenzijo in pri osebah v kontrolni skupini.

	<i>AH</i>	<i>kontrolna skupina</i>
	<i>število oseb</i>	
	56	56
$>P_{95}$	18 (32,1%)	0 (0%)
$>P_{85}$	33 (58,9%)	5 (8,9%)
$>P_{50}$	53 (94,6%)	39 (69,6%)
$<P_{50}$	3 (5,4%)	17 (30,4%)

BMI-indeks telesne teže;

BMI nad P_{85} , kar opredeljujemo kot prekomerno telesno težo, je bil v skupini z AH pri 33 (58,9%) otrocih, medtem ko je bil v kontrolni skupini le pri 5 (8,9%) otrocih (Tabela 2).

BMI med P_{50} in P_{85} za starost ali primerno telesno težo ima v skupini z AH 20 (35,7%) otrok, medtem ko jih je v kontrolni skupini 29 (51,8%) otrok (Tabela 2).

Telesno težo oziroma BMI pod P_{85} ima 23 (41,1%) otrok iz skupine bolnikov in 51 (91,1%) otrok iz kontrolne skupine (Tabela 2).

Tabela 3: Podatki o arterijski hipertenziji v družinski anamnezi pri bolnikih z esencialno hipertenzijo in v kontrolni skupini

	<i>AH</i>	<i>kontrolna skupina</i>	<i>p</i>	<i>RO (95% IZ)</i>
	<i>število oseb</i>			
	55*	56		
pozitivna družinska anamneza glede AH	40 (72,7%)	3 (5,4%)	$p < 0,001$	47,1 (12,8-173,9)

**ker določenih podatkov v skupini bolnikov nismo posedovali, je število statističnih preiskovancev nižje od števila velikosti skupine bolnikov*

Iz tabele 3 je razvidno, da so imeli bolniki pogostejše pozitivno družinsko anamnezo glede arterijske hipertenzije, pred 55-im letom v prvem kolenu, kot kontrolna skupina. Pozitivna

družinska anamneza v zvezi z AH v prvem kolenu je dejavnik tveganja za esencialno AH v otroštvu in poveča tveganje zanjo 47,1-krat (IZ = 12,8-173,8).

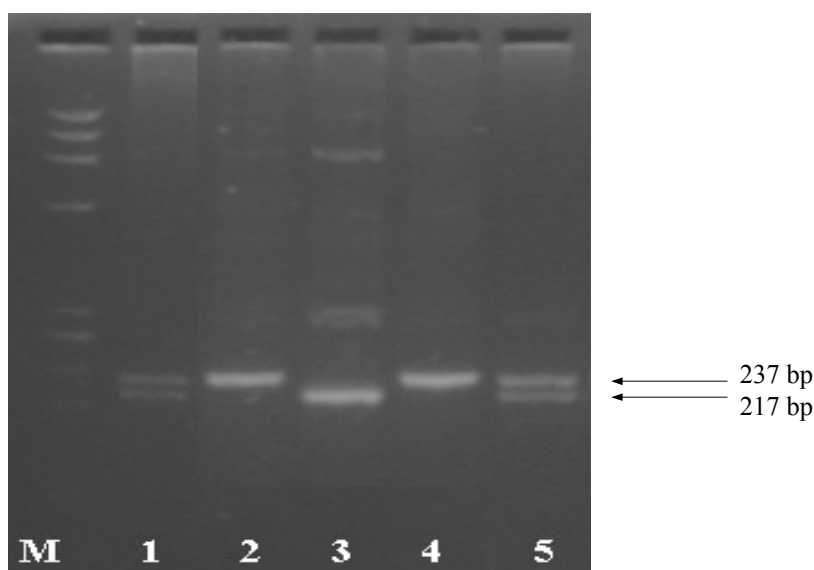
4.2 GENSKI POLIMORFIZEM

Preučevali smo genski polimorfizem gena za PPAR γ , izoformo PPAR γ 2 (Pro12Ala).

4.2.1 Rezultati molekularno genetske analize

Elektroforeza na 1 - odstotnem agaroznem gelu je pokazala pomnožene PCR produkte dolžine 237 bp. Ker ima pomnoženi fragment pri preiskovancih z divjim tipom alela (Pro12Pro) (Stumvoll in Häring, 2002) cepitveno mesto za restrikcijski encim *MspI* (5' - C ∇ CGG - 3'), smo po cepljenju tega genotipa dobili dva manjša fragmenta velikosti 217 bp in 20 bp.

Transverzija C v G (CCG $\rightarrow$ GCG) (Yen *in sod.*, 1997), ki sicer povzroči translacijsko spremembo aminokisline prolin v alanin v 12 (dvanajstem) kodonu eksona B, ima za posledico izničenje cepitvenega mesta za *MspI*. Tako na elektroforezi vzorca heterozigotov Pro12Ala dobimo 3 fragmente dolžin 237 bp (alel Ala12), 217 bp in 20 bp (alel Pro12). Preiskovanci z genotipom Ala12Ala imajo na agaroznem gelu daljši izmed fragmentov z dolžino 237 bp (Slika 6).



Slika 6: Analiza polimorfizma Pro12Ala gena PPARG. Po zaključeni cepitvi smo na elektroforezi na 2% - em agaroznem gelu fragmente DNA obarvali s SYBR® SafeI. M predstavlja označevalca dolžin fragmentov DNA z oznako Φ 174HaeIII (Sigma). 1, 5 sta vzorca z genotipom Pro/Ala, 2, 4 vzorca z genotipom Ala/Ala in 3 je vzorec z genotipom Pro/Pro.

4.2.2 Rezultati statistične analize

Ugotavljali smo pogostnost domnevno obremenilnega alela (Ala12), ki ima v dvanajstem kodonu zapis za aminokislino alanin namesto prolina, kar je posledica transverzije citozina v gvanin. S statističnimi metodami smo preverjali ali se skupini, skupina bolnikov in kontrolna skupina, značilno razlikujeta v pogostnosti domnevno obremenilnega genotipa Ala12Ala.

Tabela 4: Razporeditev genotipov in alelov za polimorfizem gena za PPAR γ 2 pri bolnikih z EAH in pri kontrolni skupini

<i>genotipi / aleli</i>	<i>bolniki z EAH n (%)</i>	<i>kontrolna skupina n (%)</i>
genotipi		
genotip Pro12Pro	38 (67,9 %)	34 (60,7 %)
genotip Pro12Ala	16 (28,6 %)	21 (37,5 %)
genotip Ala12Ala	2 (3,5 %)	1 (1,8 %)
skupno	56	56
aleli		
alel Pro12	92 (82,1%)	89 (79,5%)
alel Ala12	20 (17,9%)	23 (20,5%)

Iz tabele št. 4 je razvidno, da ima največji delež zastopanosti v vzorcu divji genotip (angl. wild - type genotype) Pro12Pro. Polovico manjšo zastopanost v skupini ima genotip Pro12Ala. Genotip Ala12Ala je zastopan le v dveh primerih v skupini z bolniki in v enem samem primeru v kontrolni skupini. Delež alelov Pro12 je približno enak v obeh skupinah in je približno 4 - krat večji kot delež alelov Ala12.

Tabela 5: Razmerje obetov potencialnih rizičnih genotipov polimorfizma gena *PPARG* pri bolnikih z arterijsko hipertenzijo in v kontrolni skupini

<i>genotip</i>	<i>bolniki z EAH n (%)</i>	<i>kontrolna skupina n (%)</i>	<i>p</i>	<i>RO (95% IZ)</i>
Ala/Ala+Pro/Ala	18 (32,1%)	22 (39,3%)	0,43	0,73 (0,3 – 1,6)
Pro/Pro	38 (67,9%)	34 (60,7%)	0,43	1,4 (0,6-3,0)
Ala/Ala	2 (3,6%)	1 (1,8%)	0,56	2.1 (0,2-23,1)
Pro/Pro + Pro/Ala	54 (96,4%)	55 (98,2%)	0,56	0,49 (0,1-5,6)

Iz tabele št. 5 je razvidno, da tako pri dominantnem modelu alela Ala, kot v dominantnem modelu alela Pro, ni statistično značilnih razlik v razmerju obetov.

Tabela 6: Interakcija med genskim polimorfizmom Pro12Ala in BMI nad P_{85} pri bolnikih in v kontrolni skupini.

<i>genotip</i>	<i>bolniki z EAH (%)</i>	<i>kontrolna skupina (%)</i>	<i>p</i>	<i>RO (95% IZ)</i>
Ala/Ala + Pro/Ala + BMI> P_{85}	11 (19,6%)	3 (5,4%)	0,03	4,2 (1,1-15,9)
Pro/Pro + BMI> P_{85}	22 (39,3%)	2 (3,6%)	<0,001	17 (3,7-77,1)
Pro/Pro + Pro/Ala + BMI> P_{85}	31 (55,4%)	5 (8,9%)	<0,001	12,4 (4,3-35,9)
Ala/Ala + BMI > P_{85}	2 (3,6%)	0 (0%)	0,16	2 (1,6-2,4)

Tabela št. 6 prikazuje povezanost genotipov skupaj s prekomerno telesno težo in AH. V modelu dominantnega Ala alela je izračunana vrednost razmerja obetov 4,2 ($p = 0,03$). To pomeni, da imajo ljudje z genotipom Ala/Ala ali Pro/Ala in hkrati s prekomerno telesno težo ($BMI > P_{85}$) 4,2 - krat večjo verjetnost za nastanek in razvoj EAH. Razmerje obetov (17; $p < 0,001$) je najbolj očitno povišano v skupini dominantnega Ala modela, in sicer pri ljudeh s Pro/Pro genotipom. V modelu dominantnega Pro alela prav tako obstaja statistično značilna razlika med bolniki z genotipom Pro/Pro ali Pro/Ala in prekomerno telesno težo ($BMI > P_{85}$) in kontrolno skupino z genotipom bodisi Pro/Pro ali Pro/Ala.

Tabela 7: Razmerje obetov za bolnike in kontrolno skupino za osebe s prekomerno telesno težo ($BMI > P_{85}$)

<i>genotip</i>	<i>bolniki z EAH (%)</i>	<i>kontrolna skupina (%)</i>	<i>p</i>	<i>RO (95% IZ)</i>
BMI > P_{85}	33	5	< 0,001	14,4 (4,9-41,9)

Iz tabele št. 7 je razvidno, da je 14,4 - krat večja verjetnost, da ljudi z $BMI > P_{85}$ spremlja tudi hipertenzija, saj za to obstaja statistično značilna razlika.

4.2.3 Genski polimorfizem in Hardy - Weinbergovo ravnovesje

Tabela 8: Testiranje razporeditev genotipov bolnikov in kontrolnih skupin na razporeditev genotipov v Hardy-Weinbergovem ravnovesju

	<i>bolniki z EAH</i>	<i>kontrolna skupina</i>
<i>p</i>	0,84	0,79
χ^2	0,037 ($p < 0,982$)	1,241 ($p < 0,538$)

Vrednosti χ^2 dokazujejo (pri dveh stopinjah prostosti), da je bila razporeditev genotipov gena za PPAR γ 2 tako pri bolnikih z EAH kot pri kontrolni skupini v Hardy - Weinbergovem ravnovesju (Tabela 8).

5. RAZPRAVA IN SKLEPI

V naši raziskavi smo ugotovili, da so telesna višina in telesna teža pomembna dejavnika pri nastanku esencialne arterijske hipertenzije pri otrocih. Ta dva podatka sta združena v indeks telesne teže. Pomemben dejavnik tveganja za nastanek EAH pri otrocih so še pozitivna družinska anamneza za AH v prvem kolenu. Medtem ko polimorfizem Pro12Ala v 12 - em kodonu eksona B receptorja PPAR γ 2 ni neodvisni dejavnik tveganja za nastanek EAH. Genotip Ala12Ala se ni potrdil kot potencialno rizični genotip za nastanek EAH. Ugotovili smo še interakcijo med genotipom Pro/Pro testiranega genskega polimorfizma in povečano telesno težo, za nastanek EAH.

5.1 KLINIČNE ZNAČILNOSTI ESENCIALNE ARTERIJSKE HIPERTENZIJE

V raziskavi smo obravnavali 56 otrok z EAH in jih primerjali s kontrolno skupino otrok z normalnim krvnim tlakom. Sistolični in diastolični krvni tlak v skupini z arterijsko hipertenzijo je bil povišan, oziroma nad P_{95} , medtem ko je bil v kontrolni skupini normalen, torej pod P_{50} .

Iz kliničnih podatkov je razvidno, da je kljub statistično neznačilni razliki v starosti obeh skupin, opazna statistično značilna razlika tako v teži, višini, indeksu telesne teže (BMI) kot v sistoličnem in diastoličnem krvnem tlaku med skupinama.

Najverjetnejši vzrok za statistično večjo višino je večji delež dečkov v skupini bolnikov glede na kontrolno skupino. Prav tako bi s to razlago razlagali statistično večjo težo v skupini bolnikov. Zato smo primerjali še drugi parameter (BMI) za ocenjevanje telesne teže, ki povezuje tako telesno težo kot višino.

Ugotovili smo, da je bil BMI v skupini z AH bistveno višji ($25,6 \pm 5,5 \text{ kg/m}^2$) glede na kontrolno skupino ($19,7 \pm 2,9 \text{ kg/m}^2$) ($p < 0,001$). To potrjuje raziskave, ki dokazujejo povezanost prekomerne telesne teže in povišan KT (Pan, 1986). Medtem ko nam je razmerje obetov (Tabela 7) napovedalo, da imajo ljudje s prekomerno telesno težo ($\text{BMI} > P_{85}$) kar 14,4 – krat ($95\% \text{ IZ} = 4,9\text{--}41,9$) večjo možnost za nastanek hipertenzije, kot ljudje z normalno telesno težo ($\text{BMI} < P_{85}$). Prekomerna telesna teža je najverjetneje dejavnik, ki vpliva na porast krvnega tlaka ob drugih pomembnih prožilcih, kot so prehranjevalne navade, kajenje, uživanje soli, razporeditev maščob, življenjski slog.

Povezava med povečano maso in povišanim krvnim tlakom je nedvoumna. Večja kot je masa, več krvi je potrebno, da bi telo oskrbovalo samo sebe, zato mora srce močnejše in hitreje delati. Temu logično sledi, da se bo krvni tlak prej preveč zvišal. Ker so pri ljudeh s povečano telesno težo žile debelejšje in daljše, temu primerno tudi manj prožne, se pritisk v žilah neenakomerno prerazporeja. Poleg tega pa imajo debelejši ljudje več krvi in sistem je preobremenjen. Ker imajo večje telo, potrebujejo več napora za premikanje težkega telesa in zopet potrebujejo več hrane, kar vodi v začaran krog.

Molekularna fiziologija vzroka za povišan krvni tlak pri osebah s prekomerno telesno težo je precej zapletena in sicer je najprej povečana periferna odpornost na inzulin in hiperinzulinemija, kar poveča adrenergično aktivnost (Wyss, 1993). Namreč, hiperinzulinemija lahko povzroči prekomerno proliferacijo gladkih mišičnih celic v žilni steni s čimer se povečuje upor in zadrževanje natrija. Zaradi zadrževanja natrija v celicah žilne stene se tudi zviša upor v žilah zaradi dodatnega ozmotskega tlaka. Te spremembe spremlja večje izločanje aldosterona, s tem pa se dodatno poveča zadrževanje natrija in vode, kar lahko vodi v AH (Rocchini, 1993).

Prekomerna telesna teža je tudi eden izmed tako imenovanih družinskih (familiarnih) faktorjev, ki vplivajo na porast krvnega tlaka. Vendar sama telesna teža ni zadosten vzrok za nastanek AH.

5.2 DRUŽINSKA OBREMENITEV IN ARTERIJSKA HIPERTENZIJA

Univariatna analiza je pokazala, da je pozitivna družinska anamneza za AH v prvem kolenu pred 55. letom, pomemben dejavnik tveganja za EAH. Opazna je statistično značilna razlika v številu pacientov s pozitivno družinsko anamnezo pri bolnikih z EAH, glede na število preiskovancev s pozitivno družinsko anamnezo v kontrolni skupini.

Pozitivna družinska anamneza glede AH predstavlja neodvisni dejavnik tveganja za razvoj EAH (RO = 47,1; 95% IZ (12,8-173,9), $p < 0,001$) (Tabela 3).

Naše ugotovitve so v skladu s tujimi raziskavami (Whitaker, 1997, Lauer, 1993). V študiji otrok (Lauer *in sod.*, 1991) so opozorili na povezavo med povišanim krvnim tlakom med starši in otroci, zlasti če so bili prisotni še drugi obremenilni dejavniki, kot npr. prekomerna telesna teža, kajenje, stres.

V adopcijskih študijah (Skandinavija, Amerika, Kanada) so ugotovili, da obstaja korelacija med krvnim tlakom bioloških staršev in otrok, medtem ko korelacije med krvnim tlakom krušnih staršev in otrok ni bila dokazana (Annest *in sod.*, 1979). Raziskave krvnega tlaka pri dvojčkih so potrdile visoko korelacijo krvnega tlaka pri enojajčnih dvojčkih in izrazito manjšo korelacijo krvnega tlaka pri dvojajčnih dvojčkih (Feinleib *in sod.*, 1975).

Glede na to, da so naši dve skupini pacientov in kontrol predstavljali otroci, lahko sklepamo na toliko večji vpliv pozitivne družinske anamneze na nastanek in razvoj EAH. Testiranja staršev na genetski polimorfizem Pro12Ala, na genu za PPAR γ 2, nismo izvedli.

5.3 GENSKI POLIMORFIZEM GENA ZA PPAR γ 2 (Pro12Ala) IN HARDY - WEINBERGOVO RAVNOVESJE

Genotipska distribucija (Pro/Pro, Pro/Ala, Ala/Ala) testiranega polimorfizma gena za PPAR γ izoforme PPAR γ 2, je bila v skladu s HWE tako v skupini bolnikov ($\chi^2 = 0,037$; $p < 0,982$), kot v kontrolni skupini ($\chi^2 = 1,241$; $p < 0,538$) (Tabela 8).

5.4 GENSKI POLIMORFIZEM GENA ZA PPAR γ 2 (Pro12Ala) IN HIPERTENZIJA

Ker s klasičnimi dejavniki tveganja, ne moremo zanesljivo napovedati EAH, smo v naši raziskavi ugotavljali genetske dejavnike tveganja za EAH. Z asociacijsko raziskavo smo ugotavljali povezavo med testnim genetskim označevalcem (polimorfizem Pro12Ala gena za PPAR γ 2) in EAH pri otrocih. Raziskava, ki je zajemala skupino slovenskih otrok z EAH, smo primerjali s kontrolno skupino otrok, katera ni imela kliničnih znakov AH.

Univariatna analiza je pokazala, da noben testiran genotip za PPAR γ 2, po nobenem modelu (dominantni za Ala: Ala/Ala ali Ala/Ala+Pro/Ala; recisivni za Ala: Ala/Ala, dominantni za Pro: Pro/Pro ali Pro/Pro+Pro/Ala; recisivni za Pro: Pro/Pro), ne predstavlja neodvisnega dejavnika tveganja za EAH (Tabela 5) v slovenski populaciji mladostnikov.

Naša raziskava je bila prva, ki je proučevala pomen testiranega polimorfizma pri bolnikih otrocih z EAH, kot možnega označevalca za EAH, zato referenčna primerjava ni možna. Je pa bilo do sedaj sicer testiranih kar nekaj polimorfizmov posameznih nukleotidov (SNP), ki naj bi imeli posredno vlogo pri nastanku EAH (polimorfizem I/D gena za angiotenzinsko konvertazo, polimorfizem gena za angiotenzinogen, polimorfizem gena za receptor 1 za angiotenzin II, polimorfizem gena za natriuretski faktor) (Bidovec, 2001).

Glede na to, da je AH multifaktorsko pogojena bolezen, se le te skoraj vedno držijo bolezni, kot so debelost (prekomerna telesna teža), hiperholesterolemija, povišana inzulinska rezistenca. Prav tako ni zanemarljiv sociološki vidik, saj je zelo pomemben način življenja (telesna aktivnost, uživanje alkohola, kajenje). Zato je smiselno raziskovati tudi polimorfizme, ki so posredno vpleteni v nastanek ali razvoj EAH.

Raziskovalci so do sedaj dokazali, da aminokislinska substitucija prolina z alaninom na N - terminalnem delu proteina (12 aminokislinsko mesto eksona B), ki je kodirana v genu *PPARG*, zmanjšuje aktivnost receptorja PPAR γ 2 (Deeb *in sod.*, 1998). In sicer je afiniteta izoforme Ala/Ala, receptorja PPAR γ 2, za PPARE dvakrat manjša (1,6 - do 2,5-krat) glede na Pro/Pro izoformo receptorja. (Deeb *in sod.*, 1998). Prav tako je disociacija PPARE in receptorja PPAR γ 2 izoforme Ala/Ala za 36% hitrejša od izoforme receptorja Pro/Pro

(Deeb *in sod.*, 1998). Iz tega avtorji sklepajo, da je Ala izoforma šibkejši stimulator začetka transkripcije genov, ki jih regulira PPAR γ 2, kar naj bi povzročalo manjšo adipozno akumulacijo. Predpostavljamo, da bi morali imeti ljudje s prekomerno telesno težo (BMI>P₈₅) manjšo frekventnost Ala alela oziroma Ala/Ala genotipa. Vendar v naši raziskavi tega nismo dokazali. Raziskave na tem področju potekajo in dajejo zelo različne rezultate (Stumvoll in Häring, 2002). Raziskovalci sklepajo, da genotip Ala/Ala ni neposredno povezan s pridobivanjem teže, ampak bolj s povečanjem inzulinske rezistence, katera pa predstavlja neodvisni dejavnik tveganja za debelost (Stumvoll in Häring, 2002).

Naslednja raziskava (Vidal-Puig *in sod.*, 1997) potrjuje, da je koncentracija mRNA, ki jo kodira gen *PPARG* v adipoznem tkivu pri ljudeh s prekomerno telesno težo večja. To pa je v skladu z dosedanjim znanjem, ki poudarja vlogo PPAR γ 2 pri nastajanju adipoznega tkiva. Vendar se je potrebno zavedati, da PPAR γ ne regulira samo adipogeneze, ampak tudi glikemijo, lipidemijo ter inzulinsko rezistenco.

PPAR γ deluje stimulirajoče na produkcijo dušikovega oksida (NO) endotelialnih mišično - žilnih celic, kar ima za posledico vazodilatacijo. Uravnavanje transkripcije poteka neodvisno od produkcije eNOS ekspresije (Calnek *in sod.*, 2003), kar jo dela posebno glede na normalno molekularno fiziologijo v telesu.

Glede na to, da je AH ena od poglavitnih dejavnikov tveganja za nastanek in razvoj koronarne bolezni in možganske kapi (Strasser, 1997) je tveganje seštevek hkratnega delovanja številnih dejavnikov tveganja. Tako predstavljata hipertenzija in hiperholesterolemija približno dvakratno povečanje tveganje za nastanek miokardnega infarkta. (Strasser, 1997). Tako raziskava (Mori *in sod.*, 2001) poroča o povišani celokupni koncentraciji holesterola pri osebah nosilcih Ala alela, kar pa predstavlja enega od pomembnih dejavnikov razvoja AH. Medtem ko raziskava (Ridker *in sod.*, 2003) poroča, da alel Ala ščiti ljudi pred razvojem ateroskleroze.

Umetni ligandi, kot so tiazolidinedioni simulirajo naravne ligande receptorja PPAR γ . In sicer je posledica delovanja ligandov najprej odcepitev korepresorjev, kateri sledi aktivacija koaktivatorjev in začetek transkripcije tarčnega gena. Potemtakem pri ljudeh s

prekomerno telesno težo jemanje zdravil, ki vsebujejo tiazolidinedione ni priporočljivo, saj bi le ti še povečevali adipogenezo. Vendar temu ni tako, saj hipertenzija ni odvisna zgolj od adipogeneze in aktivnosti PPAR γ . Pomembno je tudi, katerim tarčnim genom bo PPAR γ aktiviral iniciacijo transkripcije. In tudi sicer se ta zdravila uporablja kot vazodilatatorji, kot npr. pioglitazon (Buchanan *in sod.*, 1995), kar potemtakem znižuje krvni tlak. Umetna zdravila s tiazolidinedioni zmanjšujejo inzulinsko rezistenco (Sarafidis in Lasaridis, 2006) ter zvišujejo zgolj HDL ter znižujejo koncentracijo trigliceridov v krvi.

Način, kako naj bi PPAR γ vplival na EAH ni znan. Nekateri raziskovalci (Iglarz, 2002) menijo, da aktivatorji PPAR γ znižujejo izločanje endotelina - 1 iz endotelija žil in žilnih gladkih mišičnih celic. Ker je endotelin - 1 vazokonstriktor, ki ima pomembno vlogo pri AH, in ker naj bi aktivacija PPAR γ zniževala aktivnost izločanja endotelina - 1, bi potemtakem imela aktivacija PPAR γ za posledico znižanje krvnega pritiska.

Zmanjšana transkripcijska aktivnost oseb, ki so nosilci Ala izoforme (Deeb *in sod.*, 1998), je torej posledica spremembe primarne strukture proteina v N-terminalni regiji, ki je odgovorna za aktivnost. Takšen efekt sicer malce preseneča, saj sta si aminokislini precej podobni. V biokemijskem smislu gre za ohranitev nenabite stranske verige. Vendar v primeru prolina imamo stranski radikal ($-C_3H_6$), ki tvori neke vrste kelatni obroč z dušikom in osnovnim ogljikom aminokislina. Medtem ko v primeru alanina predstavlja stranski radikal le metilna skupina ($-CH_3$).

Naša raziskava je pokazala, da je pogostnost številčno šibkejšega alela (Ala) v kontrolni skupini zdravih otrok 20,5% (Tabela 4), kar je več kot velja splošno za kavkaško raso (12%). Prav tako je pogostnost alela Ala12 pri bolnikih z EAH višja (17,8%) od splošnega podatka za kavkaško raso, ki znaša 12% (Stumvoll in Häring, 2002). Vzrok nastanka te razlike je najverjetneje statistične narave, in sicer zaradi domnevno premajhnega števila preiskovancev našega vzorca.

Naša raziskava je dokazala, da ne obstaja asociacija med pogostnostjo posameznih genotipov polimorfizma Pro12Ala receptorja PPAR γ 2 in EAH pri otrocih. V nekem smislu je bilo to tudi pričakovati, saj je EAH tako kompleksno sestavljena bolezen, da bi težko pričakovali, da bi omenjeni polimorfizem signifikantno povečal tveganje za razvoj EAH.

5.5 INTERAKCIJA MED GENSKIM POLIMORFIZMOM GENA ZA PPAR γ 2 (Pro12Ala) IN DEBELOSTJO

Raziskovalci so do sedaj dokazali, da aminokislinska substitucija prolina z alaninom v genu *PPARG* v eksonu B na 12-em aminokislinskem mestu zmanjšuje BMI (Deeb *in sod.*, 1998), vendar raziskave pomena alela 12Ala na BMI niso pokazale enotnih rezultatov. Predlagajo, da naj bi alel 12Ala ščitil vitke ljudi pred debelostjo, medtem ko naj bi ljudem nagnjenim k debelosti, dodatno prispeval k pridobivanju telesne mase (Witchel *in sod.*, 2001).

V naši raziskavi smo ugotovili, da je pri osebah, ki so imele povečano telesno težo ($\text{BMI} > P_{85}$ za starost) tveganje za EAH v otroštvu znatno povečano ($\text{RO}=14,4$; $\text{IZ}=4,9-41,9$; $p<0,01$) (Tabela 7). Prav tako smo ugotovili, da so določene kombinacije t. i. rizičnih genotipov v povezavi s prekomerno telesno težo ($\text{BMI} > P_{85}$ za starost) pogostejše prisotne v skupini bolnikov glede na kontrolno skupino (Tabela 6). In sicer je bilo tveganje največje pri tistih, ki so imeli genotip Pro/Pro in $\text{BMI} > P_{85}$ ($\text{RO}=17$; $\text{IZ}=3,7-77,1$; $p>0,001$). Prav tako so imeli zelo povečano tveganje za nastanek EAH v otroštvu tisti, ki so imeli po dominantnem modelu alela Pro eno izmed kombinacij genotipov Pro/Pro oziroma Pro/Ala in prekomerno telesno težo ($\text{RO}=12,4$; $\text{IZ}=4,3-35,9$; $p>0,001$). Statistično značilna razlika pa se je pokazala tudi pri skupini s prekomerno telesno težo in kombinacijo genotipov Ala/Ala bodisi Ala/Pro, in sicer je znašalo razmerje obetov 4,2, interval zaupanja 1,1-15,9 ($p=0,03$). Natančen mehanizem medsebojnega delovanja domnevno rizičnih genotipov in debelosti ni poznan.

5.6 POMANJKLJIVOSTI RAZISKAVE

Glavno pomanjkljivost raziskave vidimo predvsem v njenem obsegu. In sicer tako v številčnosti preiskovancev, kot v izmerjenih kliničnih meritvah. Tako bi lahko pacientom izmerili razmerje pas/boki, koncentracijo holesterola v krvi, koncentracijo HDL, LDL, trigliceridov. S tem bi ugotavljali asociacijo med polimorfizmom Pro12Ala in različnimi komponentami, za katere sumimo in vemo, da na njih vpliva tudi aktivnost PPAR γ 2.

5.7 KLINIČNA UPORABNOST PREISKAVE

Identifikacija genetskih označevalcev, ki predstavljajo genetske dejavnike tveganja za EAH, ima pomembno vlogo pri raziskovanju nastanka EAH. V zadnjem času se omenjajo številni dodatni geni označevalci, ki so vpleteni v patogenezo EAH. Potrebno je poudariti, da glede na to, da na AH vpliva mnogo dejavnikov, bi lahko na osnovi genetskih označevalcev hitreje in bolj natančno določili genetske vzroke EAH. Predvsem je to pomembno pri otrocih, saj se patološki znaki v začetku razvoja bolezni kažejo bolj v sledovih, kar lahko s staranjem, že v adolescentni dobi pusti nepopravljive patološke posledice. Namreč, mnogokrat je klinična anamneza premalo za potrjeno diagnozo bolezni. S takim načinom bi lahko hitreje vplivali na življenjski slog bolnika in s tem na njegovo kvaliteto življenja.

Na podlagi genetskih rezultatov (genotipov) bi se določila predispozicija za arterijsko hipertenzijo. Le te rezultate bi primerjali z družinsko anamnezo. Tako bi izluščili rizične dejavnike (pozitivna družinska anamneza, prekomerna telesna teža, kajenje, genetski markerji). Na ta način bi lahko pri njih z ustreznimi ukrepi (hujšanje, zmanjševanje stresa, življenjske navade) hitreje preprečili nastanek AH v odrasli dobi oziroma bi pri njih intenzivneje zdravili AH.

5.8 SKLEP

Iz naše raziskave je razvidno, da ni populacijskih značilnosti genskega polimorfizma Pro12Ala jedrnega receptorja PPAR γ 2, pri otrocih z EAH in kontrolno skupino brez EAH. Prav tako lahko zaključimo, da polimorfizem Pro12Ala, jedrnega receptorja PPAR γ 2, ni genetski označevalec za EAH pri otrocih in genotip Ala12Ala ne predstavlja rizičnega genotipa za nastanek EAH.

6. POVZETEK

Esencialna arterijska hipertenzija je multifaktorsko pogojena bolezen, na patogenezo katere vplivajo številni dejavniki. Najbolj jo opiše mozaični model, ki razlaga medsebojno soodvisnost praktično vseh dejavnikov (genetski, okoljski).

PPAR γ 2 je jedrni uravnavni receptor, ki je vpleten v številne, predvsem metabolne procese. Še posebej je pomemben pri razvoju adipocit, saj s svojim delovanjem nadzoruje pričetek prepisovanja številnih strukturnih genov.

Spada v družino steroidnih receptorjev. Obstajajo tri izotipi PPAR, in sicer PPAR α , PPAR γ , PPAR δ , katerim je skupna 4 domenska struktura. V skupini PPAR γ sta bili do sedaj izolirani dve izoformi (PPAR γ 1 in PPAR γ 2), ki nastaneta kot posledica aktivnosti različnih promotorjev in različnega izrezovanja mRNA. Na ta način nastanejo tri različne mRNA, in sicer mRNA PPAR γ 1, mRNA PPAR γ 2 in mRNA PPAR γ 3.

V genih humanega genoma se nahajajo številni polimorfizmi. Predvsem SNP (angl. single nucleotide polymorphism) so tarče množičnega raziskovanja, saj se jih želi povezati z vzroki bolezenskega stanja.

Polimorfizem Pro12Ala na genu za PPAR γ je najbolj množično proučevan polimorfizem izoforme PPAR γ 2. Nahaja se na N-terminalni regiji proteina, in sicer na odseku A/B domene, ki je del eksona B.

Z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo pomnožili odsek DNA, ki zajema odsek DNA na delu, ki kodira 12 - o aminokislino eksona B. Po dosedanjih raziskavah je bilo ugotovljeno, da gre za transverzijo C v G, ki sicer povzroči translacijsko spremembo aminokislinske prolin v alanin v 12 kodonu eksona B. Le ta mutacija ima za metodološko posledico izničenje cepitvenega mesta za *MspI*.

Z našo raziskavo smo dokazali, da polimorfizem Pro12Ala jedrnega receptorja PPAR γ 2 ni genetski označevalec za EAH pri otrocih in genotip Ala12Ala ne predstavlja rizičnega genotipa za nastanek EAH.

7. VIRI

7.1 CITIRANI VIRI

Accetto R. 1997. Epidemiologija hipertenzije v Sloveniji. V: Arterijska hipertenzija 4. izdaja. Dobovišek J., Accetto R. (ur.). Ljubljana: Lek d.d., 49-52

Annest J.L., Sing C.F., Biron P., Mongeau J.G. 1979. Familial aggregation of blood pressure and weight in adoptive families. II. Estimation of relative contributions of genetic and common environmental factors to blood pressure correlations between family members. *American Journal of Epidemiology*, 110, 4: 492-503

Asakawa M., Takano H., Nagai T., Uozumi H., Hasegawa H., Kubota N., Saito T., Masuda Y., Kadowaki T., Komuro I. 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma plays a critical role in inhibition of cardiac hypertrophy in vitro and in vivo. *Circulation*, 105, 10: 1152-1154

Bao W., Threefoot S.A., Srinivasan S.R., Berenson G.S. 1995. Essential hypertension predicted by tracking of elevated blood pressure from childhood to adulthood: the Bogalusa Heart Study. *American Journal of Hypertension*, 8, 7: 657-665

Barak Y., Nelson M.C., Ong E.S., Jones Y.Z., Ruis-Lozano P., Chien K.R., Koder A., Evans R.M. 1999. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Molecular cell*, 4, 4: 585-595

Bentley P., Calder I., Elcombe C., Grasso P., Stringer D., Wiegand H.J. 1993. Hepatic peroxisome proliferation in rodents and its significance for humans. *Food and chemical toxicology*, 31, 11: 857-907

Berenson G.S., Wattiqney W.A., Bao W., Nicklas T.A., Jiang X., Rush J.A. 1994. Epidemiology of early primary hypertension and implications for prevention: the Bogalusa Heart Study. *Journal of human hypertension*, 8, 5: 303-311

Krkovič M. Polimorfizem gena jedrnega receptorja γ , ki ga aktivira ... esencialne arterijske hipertenzije.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2007

Berger J, Moller D.E., 2002. The mechanisms of action of PPARs. Annual review of medicine, 53: 409-435

Bidovec M. Povezava med polimorfizmom gena za angiotenzinsko konvertazo, za angiotenzinogen in za atrijski natriuretični faktor ter esencialno arterijsko hipertenzijo pri mladostnikih. Ljubljana: Medicinska fakulteta, 2001:36.

Bishop-Bailey D, Hla T, Warner T.D. 2002. Intimal vascular smooth muscle cells as a target for PPAR γ ligand therapy. Circulation Research, 91: 210-217

Boerwinkle E., 1996. A contemporary research paradigm for the genetic analysis of a common chronic disease. Annals of Medicine, 28, 5:451-457

Bonnilla F.M.A., Yetman R.J., Portman R.J. 1999. Epidemiology of hypertension. V: Pediatric nephrology. Barratt T.M., Avner E.D., Harmon W.E. (eds.). Baltimore, Williams and Wilkins: 959-985

Braissant O., Foufelle F., Scotto C., Dauca M., Wahli W. 1996. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- α , - β , and - γ in the adult rat. Endocrinology, 137, 1: 354-366

Bratanič N. 2000. Epidemiologija debelosti v Sloveniji. V: Debelost in motnje hranjenja. Battelino T.(ur.).Ljubljana, Medicinska fakulteta: 79-90

Buchanan T.A., Meehan W.P., Jeng Y.Y., Yang D., Chan T.M., Nadler J.L., Scott S., Rude R.K., Hsueh W.A. 1995. Blood pressure lowering by pioglitazone. Evidence for a direct vascular effect. The Journal of clinical investigation, 96, 1: 354-360

Calnek D.S., Mazzella L., Roser S., Roman J., Hart C.M. 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands increase release of nitric oxide from endothelial cells. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 23, 1: 52-57

Cristian J.C. 1985. Twins studies of blood pressure. V: Children's blood pressure. Filer J.L., Laurer R.M.(eds.). Columbs, OH, Ross Laboratories: 51-55

Deeb S.S., Fajas L., Nemoto M., Pihlajamaki J., Mykkanen L., Kuusisto J., Laakso M., Fujimoto W., Auwerx J. 1998. A pro 12Ala substitution in PPAR γ 2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. Nature genetics, 20, 3: 284-287

Desvergne B, Wahli W. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. Endocrine reviews, 20, 5: 649-688

Diamant M., Heine R.J. 2003. Thiazolidinediones in Type 2 Diabetes Mellitus: Current Clinical Evidence. Drugs, 63, 13: 1373-1405

Dobovišek J., Accetto R. 1998. Arterijska hipertenzija. V: Interna medicina. Kocijančič A., Mrevlje F.(ur.). Ljubljana, DZS: 189-199

Esterbauer, H., Oberkofler, H., Linnemayr V., Iglseder B., Hedegger M., Wolfsgruber P., Paulweber B., Fastner G., Krempfer F., Patsch W. 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 gene locus: associations with obesity indices in middle-aged women. Diabetes 51, 4: 1281-1286

Falkner B. 1993 Hypertension in childhood and adolescence. Clinical and experimental hypertension. 15, 6: 1315-1326

Feinlieb M., Garrison R., Borhani N. 1975. Studies in hypertension twins. V: Epidemiology and control of hypertension. Paul O. (ur.). New York, Grune and Stratton: 3-17

Gillman M.W., Cook N.R., Rosner B., Evans D.A., Keough M.E., Taylor Y.O., Hednnekens C.H. 1993. Identifying children at high risk for the development of essential hypertension. The Journal of pediatrics, 122, 6: 837-846

Krkovič M. Polimorfizem gena jedrnega receptorja γ , ki ga aktivira ... esencialne arterijske hipertenzije.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2007

Globočnik Petrovič M., Kunej T., Peterlin B., Dovč P., Petrovič D. 2005. Gly482Ser polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 gene might be a risk factor for diabetic retinopathy in Slovene population (Caucasians) with type 2 diabetes and the Pro12Ala polymorphism of the *PPAR γ* gene is not. *Diabetes Metabolism Research and reviews*, 21:470-474

Greene M.E., Blumberg B., McBride O.W., Yi H.F., Kronquist K., Kwan K., Hseih L., Green G., Nimer S.D. 1995. Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expression* 4, 4-5: 281-299

Gregorič A. 1997. Hipertenzija pri otrocih in mladostnikih. V: Arterijska hipertenzija 4. izdaja. Dobovišek J, Acetto R. (ur.). Ljubljana, Lek d.d.: 231-240

Gronemeyer H., Laudet V. 1995. Nuclear receptors. *Protein Profile* 2: 1173-1308

Guan Y. 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor family and its relationship to renal complications of the metabolic syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15, 11: 2801-2815

Gurnell M., Savage D.B., Chatterjee V.K., O'Rahilly S. 2003. The metabolic syndrome: peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its therapeutic modulation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 88, 6: 2412-2421

Globočnik Petrovič M., Kunej T., Peterlin B., Dovč P., Petrovič D. 2005. Gly482Ser polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 gene might be a risk factor for diabetic retinopathy in Slovene population (Caucasians) with type 2 diabetes and the Pro12Ala polymorphism of the *PPARgamma* gene is not. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 21, 5:470-474

Havlik R.J., Garrison R.J., Fenleib M., Kannel W.B., Castelli W.P., McNamara P.M. 1979.

Blood pressure aggregation in families. *American journal of epidemiology*, 110, 3: 304-312

Hara K., Tobe K., Okada T., Kadowaki H., Akanuma Y., Ito C., Kimura S., Kadowaki T. 2002. A genetic variation in the PGC-1 gene could confer insulin resistance and susceptibility to Type II diabetes. *Diabetologia*, 45, 5: 740-743

Hazra S., Miyahara T., Rippe R. A., Tsukamoto H. 2004. PPAR Gamma and Hepatic Stellate Cells. *Comparative Hepatology*, 3, Suppl1: S7

Iglarz M., Touyz R.M., Amiri F., Lavoie M.F., Diep Q.N., Schiffrin E.L. 2003. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma activators on vascular remodeling in endothelin-dependent hypertension. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 23, 1: 45-51

Issemann I., Green S. 1990 Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 347, 6294: 645-650

Iwai N., Ohmichi N., Nakamura Y., Kinoshita M. 1994. DD genotype of the angiotensin-converting enzyme gene is a risk factor for left ventricular hypertrophy. *Circulation*, 90, 6: 2622-2628

Jakša I. 1992. Arterijska hipertenzija v otroštvu. V: Arterijska hipertenzija 3. izdaja Jezeršek P., Dobovišek J.(ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 127-134

Jiang C., Ting A. T., Seed B. 1998. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*, 391, 6662: 82-86

Julius S., Jamerson K. 1994. Sympathetics, insulin resistance and coronary risk in hypertension: the 'chicken-and-egg' question. *Journal of hypertension*, 12, 5: 495-502

Kaplan N.M. 1994. Clinical Hypertension. William and Wilkins

Krkovič M. Polimorfizem gena jedrnega receptorja γ , ki ga aktivira ... esencialne arterijske hipertenzije.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2007

Kiec-Wilk B., Dembinska-Kiec A., Olszanecka A., Bodzioch M., Kawecka-Jaszcz K. 2005. The selected pathophysiological aspects of PPARs activation. *Journal of physiology and pharmacology*, 56, 2: 149-162

Knouff C., Auwerx J. 2004. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Calls for Activation in Moderation: Lessons from Genetics and Pharmacology, 25, 6: 899-918

Kubota N., Terauchi Y., Miki H., Tamemoto H. *In sod.* 1999. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Molecular cell*, 4, 4: 597-609

Lauer R.M., Clarke W.R., Mahoney L.T., Witt J. 1993. Childhood predictors for high adult blood pressure. The Muscatine Study. *Pediatric clinics of North America*, 40, 1: 23-40

Leuman E.P. 1983. Der renal-bedingte Hochdruck. *Monatsschr Kinderhelik*, 131: 822-824

Lifton R.P. 1993. Genetic factors in hypertension. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 2, 2: 258-264

McCrory W.W. 1992. Definition, prevalence, and distribution of causes of hypertension. V: *Pediatric and adolescent hypertension*. Logie J.M.H. (ed.). Boston, Blackwell Scientific Publications: 104-111

Moras D. Gronemeyer H. 1998. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Current opinion in cell biology*, 10, 3: 384-391

Mori H., Ikegami H., Kawaguchi Y., Seino S., Yokoi N., Takeda J., Inoue I., Seino Y., Yasuda K., Hanafusa T., Yamagata K., Awata T., Kadowaki T., Hara K., Yamada N., Gotoda T., Iwasaki N., Iwamoto Y., Sanke T., Nanjo K., Oka Y., Matsutani A., Maeda E., Kasuga M. 2001. The Pro12Ala substitution in PPAR- γ is associated with resistance to development of diabetes in the general population: Possible Involvement in Impairment of Insulin Secretion in Individuals With Type 2 Diabetes. *Diabetes* 50: 891-894

Krkovič M. Polimorfizem gena jedrnega receptorja γ , ki ga aktivira ... esencialne arterijske hipertenzije.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2007

Negro R., Dazzi D., Hassan H., Pezzarossa A. 2004. Pioglitazone reduces blood pressure in non-dipping diabetic patients. *Minerva endocrinologica*, 29,1: 11-17

Nuclear Receptors Committee. 1999. A Unified Nomenclature System for the Nuclear Receptor Subfamilies. *Cell*, 97: 1-20

Oliver W.R. Jr, Shenk J.L., Snaith M.R., Russell C.S., Plunket K.D., Bodkin N.L., Lewis M.C., Winegar D.A., Sznaidman M.L., Lambert M.H., Xu H.E., Sternbach D.D., Kliewer S.A., Hansen B.C., Willson T.M. 2001. A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 9: 5306-5311

Page I.H. 1967. Mozaična teorija hipertenzije. *Perspectives in biology and medicine*, 10, 3: 325-333

Pan W.H., Nanas S., Dyer A., Lyu K., McDonald A., Schoenberger J.A., Shekelle R.B., Stamler R., Stamler J. 1986. The role of weight in the positive association between age and blood pressure. *American journal of epidemiology*, 124, 4: 612-623

Pershadsingh H.A. 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: therapeutic target for diseases beyond diabetes: quo vadis? *Expert opinion on investigational drugs*, 13, 3: 215-228

Peterlin B., Petrovič D., Milanez T. 1998. Pomen nekaterih genetskih polimorfizmov na razvoj ateroskleroze. *Medicinski razgledi*, 37, Suppl 3: 75-84

Pineas R.J., Elkwiry Z.M. 1992. Epidemiology and measurement of high blood pressure in children and adolescents. V: *Pediatric and adolescence hypertension*. Loggie J.H.M.(ed.). Boston, Blackwell Scientific Publication: 91-103

Ricote M., Li A. C., Willson T. M., Kelly C. J., Glass C. K. 1998. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*, 391, 6662: 79-82

Krkovič M. Polimorfizem gena jedrnega receptorja γ , ki ga aktivira ... esencialne arterijske hipertenzije.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2007

Ridker P. M., Cook N. R., Cheng S., Erlich H. A., Lindpaintner K., Plutzky J., Zee R. Y. 2003. Alanine for proline substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor γ -2 (PPAR γ 2) gene and the risk of incident myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vascular Biology*, 23:859-863

Risch N., Merikangas K. 1996. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*, 13, 273: 1516-1517

Rocchini A. P. 1993. Adolescent obesity and hypertension. *Pediatric clinics of North America*, 40, 1: 81-92

Sarafidis P. A., Lasaridis A. N. 2006. Actions of peroxisome proliferator-activated receptors-gamma agonists explaining a possible blood pressure-lowering effect. *American journal of hypertension : journal of the American Society of Hypertension*, 19, 6: 646-653

Sibony M., Gasc J.M., Soubrier F., Alhenz-Gelas F., Corvol P. 1993. Gene expression and tissue localization of the two isoforms of angiotensin I converting enzyme. *Hypertension*, 21, 6: 827-835

Sorgel M., Kirschstein M., Busch C., Danne T., Gellermann J., Holl R., Krull F., Reichert H., Reusz G.S., Rascher W. 1997. Oscillometric twenty-four-hour ambulatory blood pressure values in healthy children and adolescents: A multicenter trial including 1141 subjects. *Journal of Pediatrics*, 130, 2: 178-184

Strasser T. 1997. Epidemiologija hipertenzije. V: Arterijska hipertenzija 4. izdaja. Dobovišek J., Accetto R.(ur.). Ljubljana: Lek d.d.: 37-48

Stumvoll M., Haring H. 2002. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12Ala polymorphism. *Diabetes*, 51, 8: 2341-2347

Task Force on Blood Pressure control in children. 1987. Report of the second task force on blood pressure control in children. *Pediatrics*, 79, 1: 1-25

Tiret L., Blanc H., Ruidavets J.B., Arveiler D., Luc G., Jeunemaitre X., Tichet J., Mallet C., Poirier O., Plouin P.F., Cambien F. 1998. Gene polymorphisms of the renin-angiotensin system in relation to hypertension and parental history of myocardial infarction and stroke: the PEGASE study. Project d'Etude des Genes de l'Hypertension Arterielle Severe a moderee Essentielle. *Journal of hypertension*, 16, 1: 37-44

Tontonoz P., Hu E., Spiegelman B.M. 1994. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*, 79, 7: 1147-1156

Vidal-Puig A. J., Considine R.V., Jimenez-Linan M., Werman A., Pories W. J., Caro J., F., Flier J.S. 1997. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *The Journal of clinical investigation*, 99, 10: 2416-2422

Yen C J, B. A. Beamer, C. Negri, K. Silver, K. A. Brown, D. P. Yarnall, D. K. Burns, J. Roth, A. R. Shuldiner. 1997 Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma (hPPAR gamma) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR gamma 2 missense mutation. *Biochemical and biophysical research communications* ; 241, 2: 270-274.

Yiu V., Buka S., Zurakowski D., McCormick M., Brenner B., Jabs K. 1999. Relationship between birthweight and blood pressure in childhood. *American journal of kidney diseases*, 33, 2: 253-260

Ward R. 1995. *Familial Aggregation and Genetic Epidemiology of Blood Pressure. V: Hypertension: Patophysiology, Diagnosis and Management.* Laragh J.H., Brenner B.M.(eds.). New York, Raven Press: 863-877

Whitaker R.C., Wright J.A., Pepe M.S., Seidel K.D., Dietz W.H. 1997. Predicting obesity in young adulthood from childhood and parental obesity. *The New England journal of medicine*, 337, 13: 869-873

Willson T.M., Brown P.J., Sternbach D.D., Henke B.R. 2000. The PPARs: from orphan

Krkovič M. Polimorfizem gena jedrnega receptorja γ , ki ga aktivira ... esencialne arterijske hipertenzije.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2007

receptors to drug discovery. Journal of medicinal chemistry, 43, 4: 527-550

Witchel S.F., White C., Siegel M.E., Aston C.E. 2001. Inconsistent effects of the proline12
--> alanine variant of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene on body
mass index in children and adolescent girls. Fertility and sterility, 76, 4: 741-747

Wyss J. M. 1993. The role of the sympathetic nervous system in hypertension. Current
opinion in nephrology and hypertension, 2, 2: 265-273

DRUGI VIRI

Guyton 1976. Medicinska fiziologija. Zagreb, Medicinska knjiga Beograd-Zagreb

Wiciok J., Ouhl W. 2000. Visok krvni tlak. Prepoznavanje, preprečevanje, zdravljenje.
Ljubljana

ZAHVALA

Iskrena zahvala na prvem mestu velja prof. dr. Danielu Petroviču, dr. med., ki mi je omogočil izvedbo naloge, za njegove spodbudne besede in podporo pri vseh fazah nastajanja diplomske naloge.

Iskreno se zahvaljujem obema predstavnikoma inštitucij, kjer je naloga nastajala, in sicer prof. dr. Marjeti Zorc, dr. med., kot predstojnici Inštituta za histologijo in embriologijo MF in namestniku predstojnice katedre za genetiko, animalno biotehnologijo, imunologijo, splošno živinorejo in konjerejo na oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete, prof. dr. Petru Dovču.

Zahvala velja tudi asist. dr. Tanji Kunej iz Oddelka Biotehniške fakultete za zootehniko (Katedra za genetiko, animalno biotehnologijo, imunologijo, splošno živinorejo in konjerejo), ki je vsestransko pripomogla pri nastanku te naloge.

Mag. Matjažu Bidovcu, dr. med. se zahvaljujem, ker je zbral paciente.

Posebno zahvalo zasluži vsestranski univ. dipl. ing. Dejan Bregar, ki me je učil tehnike PCR, vestno skrbel, da je delo v laboratoriju teklo nemoteno in sodeloval pri obdelavi podatkov.

Zahvala velja tudi dr. Heleni Hruscovicovi, ki me je uvajala v svet PCR tehnike.

Zelo velika zahvala velja mojim staršem, ki so mi omogočili študij in so eni redkih, ki so vedno verjeli vame, da bo ta naloga enkrat le ugledala prah knjižnih polic.