

# Uloga kongeničnih štakora BN.GH u pozicijskom kloniranju gena ključnih u patogenezi hipertenzije

---

**Bilušić, Marijo**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2005**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:133649>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-20**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**Sveučilište u Splitu**

**Medicinski fakultet**

**Marijo Bilušić**

**ULOGA KONGENIČNIH ŠTAKORA BN.GH U POZICIJSKOM  
KLONIRANJU GENA KLJUČNIH U PATOGENEZI HIPERTENZIJE**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**Split, svibanj 2005. god.**

Rad je izrađen u laboratoriju dr. Howard Jacoba pri Human and Molecular Genetic Centre Katedre za fiziologiju na Medical College of Wisconsin u Milwaukeeju (SAD).

Opisani pokusi su dio multicentrične studije Family Blood Pressure Program (FBPP) Nacionalnog instituta za bolesti srca, pluća i krvi Sjedinjenih Američkih Država (NHLBI) (broj projekta: FBPP UO1 HL154508 te PGA UO1 HL066579).

Voditelj rada: prof. dr. sc. Mladen Boban, dr. med.

Redni broj rada:

## ZAHVALE

*Prof. dr. Howard Jacobu* zahvaljujem na izvrsnim radnim uvjetima te na kontinuirani interesu i potpori mom radu i edukaciji.

Posebno zahvaljujem mentoru, *prof. dr. Mladenu Bobanu*, i članovima povjerenstva *prof. dr. Željku Dujiću* i *prof. dr. Zvonku Rumboldtu* koji su pokazali golemo razumijevanje i pružili mi svu potrebnu pomoć tijekom moje poslijediplomske edukacije na Medicinskom fakultetu u Splitu, kao i tijekom pripreme te obrane disertacije. Od srca im hvala.

Zahvalu upućujem gospođi *prof. Mariti Mimici* za brojne savjete pri rješavanju tekućih problema tijekom poslijediplomskog studija. Njezina pomoć i uvijek vedro raspoloženje uvelike su mi olakšali proces poslijediplomske edukacije.

Također zahvaljujem *prof. dr. Anne Kwitek* jer je unatoč brojnim obvezama uvijek bila spremna pomoći u rješavanju tekućih problema. Njezina pomoć i podrška bili su nezamjenjivi te joj od srca zahvaljujem.

*Prof. dr. Carol Moreno-Quinn* bila je ključna osoba prvih dana mog boravka u Sjedinjenim Državama kao i u mojim prvim koracima na ovom području znanosti. Razmjenjujući svoja iseljenička iskustva i sjedeći u istom uredu, satima smo znali razgovarati o problemima za koje je ona uvijek imala izvrsna rješenja. Nesebično je znala podijeliti svoje znanje fiziološke genomike na čemu sam joj neizmjerano zahvalan.

Zahvaljujem i svim ostalim članovima tima dr. Jacoba i brojnim suradnicima na Katedri za fiziologiju Medical College of Wisconsinu, posebice *prof. dr. Julianu Lombardu* i *prof. dr. Jeanne Seagard* bez čijih savjeta i pomoći ovi pokusi vjerojatno ne bi bili dovršeni.

Posebnu zahvalu upućujem *prof. dr. Željku Bošnjaku* i *prof. dr. Matku Marušiću* bez čije pomoći i preporuka nikad ne bih došao u laboratorij dr. Jacoba. Njihova nesebičnost te spremnost da pomognu običnim ljudima bit će mi uzor u danima koji slijede. Profesori Bošnjak i Marušić ostat će zauvijek u mom sjećanju kao ljudi koji su omogućili početak ključnog poglavlja u mom životu.

Na kraju zahvaljujem svojoj obitelji, bližoj i daljoj, svojoj djevojci, kao i svim prijateljima koji su mi pružili potporu, utjehu i savjete u svim teškim danima kojih nije bilo baš malo. Bez njihove pomoći i razumijevanja vjerojatno nikad ne bih bio mogao završiti ovo poglavlje u svom životu.

Još jednom velika hvala svima.

Marijo Bilušić

## SADRŽAJ

<b>POPIS KRATICA</b>	1
<b>INTERNETSKI IZVORI</b>	4
<b>1. UVOD</b>	5
<b>1.1. Problematika hipertenzije</b>	5
<i>1.1.1. Epidemiologija i problematika arterijske hipertenzije</i>	5
<i>1.1.2. Definicija i podjela hipertenzije</i>	7
<i>1.1.3. Etiologija hipertenzije</i>	9
<i>1.1.4. Patofiziologija hipertenzije</i>	12
<i>1.1.5. Čimbenici rizika</i>	14
<i>1.1.6. Uloga barorefleksa u regulaciji arterijskog tlaka</i>	15
<b>1.2. Genetika hipertenzije</b>	18
<i>1.2.1. Osnovni pojmovi u genetici</i>	18
<i>1.2.2. Genetika poligenskih bolesti</i>	22
<i>1.2.3. Teorije o nasljednosti hipertenzije</i>	24
<i>1.2.4. Monogenski oblici hipertenzije</i>	25
<i>1.2.5. Geni kandidati</i>	27
<i>1.2.6. Zaključci iz literature</i>	30
<b>1.3. Metodologija u genetici poligenskih bolesti</b>	31
<i>1.3.1. Metode za otkrivanje gena u humanoj genetici</i>	31

1.3.2. <i>Životinjski modeli - rješenje za poligenske bolesti?</i>	33
1.3.3. <i>Štakori s genski uvjetovanom hipertenzijom</i>	34
1.3.4. <i>Pozicijsko kloniranje gena</i>	36
<b>2. CILJ DISERTACIJE</b>	39
<b>3. TVORIVA I POSTUPCI</b>	41
3.1. Otkrivanje QTL-a za hipertenziju u štakora GH	41
3.2. Kongenični štakori BN.GH	42
3.3. Protokol za određivanje fenotipa kongeničnih štakora BN.GH	44
3.4. Mjerenje arterijskog tlaka	46
3.5. Mjerenje učinka ANG II, NA i L-NAME-a	46
3.6. Procjena osjetljivosti baroreceptora	47
3.7. Mjerenje biokemijskih pokazatelja i tireoidnih hormona u krvi	47
3.8. Statistička analiza	47
<b>4. REZULTATI</b>	49
4.1. Rezultati kartiranja QTL-a kod štakora GH	49
4.2. Rezultati genotipiziranja kongeničnih štakora BN.GH	52
4.3. Rezultati mjerenja arterijskog tlaka	54
4.4. Biometrijska mjerenja	55
4.5. Rezultati biokemijskih i hormonalnih pretraga	56
4.6. Učinci L-NAME-a	58

<b>4.7. Rezultati primjene NA i ANG-a II</b>	60
<b>4.8. Osjetljivost baroreceptorskog refleksa</b>	62
<b>5. RASPRAVA</b>	64
<b>5.1. Dosadašnji rezultati potrage za „hipertenzivnim“ genima</b>	64
<b>5.2. Lyonski hipertenzivni soj štakora</b>	65
<b>5.3. Rezultati pokusa s kongeničnim štakorima BN.GH</b>	67
<i>5.3.1. Analiza QTL-a za hipertenziju u štakora GH</i>	67
<i>5.3.2. Stvaranje kongeničnih sojeva</i>	68
<i>5.3.3. Arterijski tlak kod kongeničnih životinja</i>	69
<i>5.3.4. Određivanje biokemijskih i hormonskih osobitosti u kongeničnih životinja</i>	71
<i>5.3.5. Određivanje prohipertenzivnih subfenotipova u kongeničnih životinja</i>	72
<i>5.3.6. Određivanje osjetljivosti barorefleksa u kongeničnih životinja BN.GH18</i>	75
<b>5.4. Budućnost genetičkih istraživanja humane hipertenzije</b>	77
<b>5.5. Budućnost kongeničnih štakora BN.GH</b>	79
<b>6. ZAKLJUČCI</b>	81
<b>7. SAŽETAK</b>	84
<b>8. SUMMARY</b>	86
<b>9. LITERATURA</b>	88
<b>10. ŽIVOTOPIS</b>	102



## POPIS KRATICA

<b>11B-HSD</b>	11 beta-hidroksisteroidna dehidrogenaza
<b>ACE</b>	konvertaza angiotenzina (engl. angiotensin converting enzyme)
<b>AD</b>	autosomno dominantni oblik nasljeđivanja
<b>AME</b>	prividan višak mineralokortikoida (engl. apparent mineralocorticoid excess)
<b>ANG</b>	angiotenzinogen
<b>ANG II</b>	angiotenzin II
<b>ApoE</b>	apolipoprotein E
<b>AR</b>	autosomno recesivni oblik nasljeđivanja
<b>AT1</b>	angiotenzinski receptor, tip1
<b>AT2</b>	angiotenzinski receptor, tip2
<b>BB</b>	BioBreeding soj štakora (životinjski model dijabetesa tipa 1)
<b>BMI</b>	indeks tjelesne mase (engl. body mass index)
<b>BN</b>	BN/EIh - soj štakora Brown Norway (normotenzivni, kontrolni)
<b>BN.GH2</b>	kongenični soj štakora BN.GH-(D2Rat22-D2Mgh11)/Mcwi
<b>BN.GH6</b>	kongenični soj štakora BN.GH-(D6Mit12-D6Rat15)/Mcwi
<b>BN.GH18</b>	kongenični soj štakora BN.GH-(D18Rat41-D18Mgh4)/Mcwi
<b>CHD</b>	koronarna srčana bolest (engl. coronary heart disease)
<b>cM</b>	centimorgan
<b>DBP</b>	dijastolički arterijski tlak (engl. diastolic blood pressure)
<b>EnaC</b>	gen za podjedinicu beta bubrežnog epitelnog natrijskog kanala
<b>GDB</b>	genomska baza podataka (engl. genome database)
<b>GH</b>	GH/Omr – soj štakora s genski uvjetovanom hipertenzijom (engl. genetically hypertensive rat)

<b>GRA</b>	hiperaldosteronizam ovisan o glukokortikoidu (engl. glucocorticoid remediable aldosteronism)
<b>HR</b>	srčana frekvencija (engl. heart rate)
<b>LDB</b>	lokacijska baza podataka (engl. location database)
<b>LDL</b>	lipoproteini male gustoće (engl. low density lipoproteins)
<b>LDLR</b>	receptor lipoproteina male gustoće (LDL)
<b>LEW</b>	Lewisov soj štakora
<b>LH</b>	Lyonski hipertenzivni soj štakora
<b>LN</b>	Lyonski normotenzivni soj štakora
<b>LOD</b>	logaritam vjerojatnosti (engl. logarythm of odds)
<b>L-NAME</b>	N-nitro L-arginin metil ester (blokator sinteze dušičnog oksida)
<b>MAP</b>	srednji arterijski tlak (engl. mean arterial pressure)
<b>MCW</b>	Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI, SAD
<b>MNS</b>	Milanski normotenzivni soj štakora
<b>MTHFR</b>	metiltetrahidrofolatna reduktaza
<b>NA</b>	noradrenalin
<b>NIDDM</b>	Dijabetes tip 2 (engl. noninsulin dependent diabetes melitus)
<b>OMIM</b>	baza podataka nasljednih bolesti u ljudi koje se nasljeđuju po mendelovskim zakonima (engl. online mendelian inheritance in man)
<b>PCR</b>	lančana reakcija polimeraze (engl. polymerase chain reaction)
<b>PGA</b>	Program za primjenu genoma (engl. Program for genome application)
<b>QTL</b>	mjesto količinskih značajki (engl. quantitative trait loci)
<b>RAAS</b>	renin-angiotenzin-aldosteronski sustav
<b>RGD</b>	baza podataka štakorskog genoma (engl. rat genome database)
<b>SBP</b>	sistolički arterijski tlak (engl. systolic blood pressure)

- SHR** spontano hipertenzivni soj štakora (engl. spontaneously hypertensive rat)
- SHR-SP** spontano hipertenzivni soj štakora sklon moždanom udaru (engl. spontaneously hypertensive rat - stroke prone)
- SSLP** genski biljeg (engl. simple sequence length polymorphism)
- SNP** polimorfizam jednog nukleotida (engl. single nucleotide polymorphism)
- SS** soj štakora s hipertenzijom osjetljivom na kuhinjsku sol (engl. Dahl salt sensitive rat)
- SZO** Svjetska zdravstvena organizacija
- WKY** soj štakora Wistar Kyoto

## INTERNETSKI IZVORI

### **Ensembl Genome Browser**

<http://www.ensembl.org/>

(Genomski pretraživač Wellcome Trusta, London, Velika Britanija)

### **FBPP**

<http://www.sph.uth.tmc.edu/center/hgc/fbpp/default.asp>

(**Family Blood Pressure Program**, Nacionalni institut za bolesti srca, pluća i krvi, Bethesda, SAD)

### **NHLBI (National Heart, Lung and Blood Institute)**

<http://www.nhlbi.nih.gov>

(Nacionalni institut za bolesti srca, pluća i krvi, Bethesda, SAD)

### **OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)**

[www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim)

(Baza podataka o ljudskim bolestima koje se nasljeđuju po mendelovskim načelima, NHLBI, Bethesda, SAD)

### **PUBMED (National Library of Medicine)**

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>

(Nacionalna medicinska biblioteka, Bethesda, SAD)

### **RGD (Rat Genome Database)**

<http://rgd.mcw.edu>

(Baza podataka štakorskog genoma, Medical College of Wisconsin, SAD)

### **USCS Genome Browser**

<http://www.genome.ucsc.edu/>

(Genomski pretraživač, University of California, Santa Cruz, SAD)

## 1. UVOD

Posljednjih su godina XX. stoljeća u molekularnoj biologiji, a posebice u genetici, postignuta velika otkrića, vjerojatno kao nikada prije u ljudskoj povijesti. Trebalo je nešto manje od 50 godina, koliko je proteklo od otkrića DNK do danas, kako bi se potpuno sekvencionirao kompletan genom čovjeka i još nekoliko pokusnih životinja poput štakora, miša, vinske mušice ili pak zebraste ribe. Nakon mnogobrojnih uspješnih otkrića genskih čimbenika monogenetskih bolesti, a primjenjujući sličnu metodologiju i strategije, znanstvenici su danas usmjereni na otkrivanje genske etiologije kompleksnih, poligenetskih bolesti zato što one imaju najveći udio u obolijevanju i smrtnosti populacije razvijenog svijeta. Među njima, hipertenzija zauzima jedno od vodećih mjesta, kako zbog svoje učestalosti i komplikacija, tako i zbog golemih troškova liječenja.

### 1.1. Problematika hipertenzije

#### 1.1.1. Epidemiologija i problematika arterijske hipertenzije

Arterijska hipertenzija vjerojatno je najvažniji medicinski i javno zdravstveni problem u razvijenom svijetu, s gotovo milijardu oboljelih i s više od 7,1 milijuna umrlih godišnje (<http://www.who.int/en/index.html>). Jedno od najpoznatijih istraživanja iz područja epidemiologije hipertenzije jest ono provedeno na populaciji iz grada Framinghama u SAD-u (<http://www.nhlbi.nih.gov/about/framingham/>). To je istraživanje pokazalo da gotovo petina bijelaca ima arterijski tlak viši od 160/95 mmHg, a gotovo polovica viši od 140/90 mmHg, što je ujedno definirano kao gornja granica normalnog arterijskog tlaka. Grupa istraživača iz navedene studije nedavno je objavila kako je kumulativni rizik za hipertenziju oko 90%, i to za muškarce i žene

koji nisu bili hipertenzivni u dobi između 55 i 65 godina, a doživjeli su 80-85 godina (1). Framinghamska studija je nadalje pokazala kako su vrijednosti sistoličkog tlaka između 130 i 139 mmHg i dijastoličkog nižeg od 89 mmHg povezane s gotovo dvostrukim porastom relativnog rizika od kardiovaskulnih bolesti u usporedbi s pojedincima koji imaju arterijski tlak niži od 120/80 mmHg (2).

Prevalencija hipertenzije ovisi o dva ključna čimbenika: 1.) o dobnoj i rasnoj pripadnosti ispitivane populacije te 2.) o kriterijima definiranja bolesti, a kreće se od gotovo 50% populacije u dobi između 60 i 69 godina i gotovo 75% populacije starije od 70 godina (3). Dobro je poznato kako bolesnici s hipertenzijom imaju kraći životni vijek, a jedan je od vodećih uzroka smrti ishemijska bolest srca koju po učestalosti slijede moždani udar i kronično zatajenje bubrega, osobito kod bolesnika sa značajnom retinopatijom te izraženom aterosklerozom. Zabrinjavajući su izvještaji SZO prema kojima je sistolički arterijski tlak viši od 115 mmHg odgovoran za 62% cerebrovaskulnih te 49% ishemijskih bolesti srca s malim varijacijama između spolova (4). Zanimljivo je napomenuti kako se za svakih 20 mmHg porasta sistoličkog tlaka, odnosno 10 mmHg porasta dijastoličkog tlaka, smrtnost od moždanog udara i ishemijske bolesti srca gotovo udvostručuje (5).

Povišeni arterijski tlak jedan je od najvažnijih rizičnih čimbenika i za druge kardiovaskulne bolesti, a rizik ishemijske bolesti srca i moždanog udara raste gotovo proporcionalno sa stupnjem hipertenzije. Najčešća srčana abnormalnost u hipertenziji jest hipertrofija miokarda, koja je sama po sebi neovisan čimbenik rizika za razvoj ishemijske bolesti srca i nenadane smrti (6). Još nije potpuno jasno je li sklonost ishemijskoj bolesti srca pretežno uvjetovana specifičnim, genskim čimbenicima koji izravno ubrzavaju razvoj bolesti ili je to uglavnom posljedica djelovanja većinom izvanjskih čimbenika.

Unatoč brojnim otkrićima i novim spoznajama o patofiziologiji te bolesti, u gotovo 90-95% bolesnika neposredan uzrok hipertenzije, a time i posljedično liječenje ili prognoza, uglavnom je nepoznat pa se za njih kaže da imaju primarni, esencijalni, odnosno idiopatski oblik hipertenzije. Zbog nepoznavanja uzroka bolesti, visoki arterijski tlak uglavnom se liječi simptomatski, što dovodi do toga da bolesnik nedovoljno prihvaća terapiju, zatim do velikog broja nuspojava, a na kraju i velikog postotka neprimjerenog liječenja, prema nekim studijama čak i do 60% (7).

### *1.1.2. Definicija i podjela hipertenzije*

Poznato je kako arterijski tlak nije stalna nego pulsatilna vrijednost te se neprekidno mijenja tijekom 24 sata, i to od najviših vrijednosti tijekom sistole (sistolčki arterijski tlak) do najnižih vrijednosti za vrijeme diastole srca (diastolički arterijski tlak). Ako su te vrijednosti povišene u odnosu na prihvaćene granice, takvo stanje nazivamo hipertenzijom. Vrijednosti normalnog arterijskog tlaka su arbitrarno određene te variraju između pojedinih država i zdravstvenih sustava, ali su ipak najšire prihvaćeni kriteriji Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) prema kojima se vrijednosti sistoličkog arterijskog tlaka više ili jednake 140 mmHg i/ili diastoličkog arterijskog tlaka više ili jednake 90 mmHg, dobivene u tri uzastopna, adekvatna mjerenja tijekom 1-3 tjedna smatraju hipertenzijom.

Iako je do danas opisano pedesetak različitih razloga povišenog arterijskog tlaka, ti sekundarni oblici mogu objasniti samo oko 5% slučajeva bolesti (8). Dijagnosticiranje hipertenzije dodatno je komplicirano određivanjem točnih vrijednosti arterijskog tlaka, kako zbog promjenjivog, pulsativnog karaktera arterijskog tlaka, tako i zbog dnevnih oscilacija koje uvelike ovise o okolnostima u kojima se jedinka nalazi.

Tablica 1. Podjela arterijskog tlaka prema Europskome društvu za hipertenziju i Europskome kardiološkom društvu iz 2003. godine (9).

### KLASIFIKACIJA HIPERTENZIJE

KATEGORIJA	SISTOLIČKI TLAK (mmHg)		DIJASTOLIČKI TLAK (mmHg)
Optimalan arterijski tlak	< 120	I	< 80
Normalan arterijski tlak	120 -129	IIi	80 - 84
Visoki normalan tlak	130 -139	IIi	85 - 89
Hipertenzija, stadij 1 (blaga)	140 - 159	IIi	90 - 99
Hipertenzija, stadij 2 (umjerena)	160 -179	IIi	100
Hipertenzija, stadij 3 (teška)	> 180	IIi	> 110
Izolirana sistolička hipertenzija	> 140	I	< 90



### 1.1.3. Etiologija hipertenzije

Već je duže poznato kako hipertenzija nastaje kao posljedica složenih interakcija nepoznatog broja genskih čimbenika te izvanjskih čimbenika rizika (1). Genetičke studije provedene na blizancima, kao i segregacijske analize, pokazale su da je gotovo polovica (33-50%) varijacija arterijskog tlaka među ljudskom populacijom nasljedna (10). Brojni su istraživači pokušavali pronaći ključne gene odgovorne za nastanak hipertenzije, ali su rezultati daleko od priželjkivanih. Do danas je opisano više mutacija koje dovode do hipertenzije; uglavnom se radi o genima koji kodiraju ključne enzime ili receptore unutar renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava (RAAS) ili pak o njihovim urođenim genskim greškama u sklopu raznih sindroma s recesivnim oblikom nasljeđivanja. Popis takvih stanja može se pronaći na OMIM-u, a u toj skupini osobito su poznati pseudohipoaldosteronizam tip 2B i Liddleov sindrom. Također postoji skupina potencijalnih gena kandidata čija se uloga u hipertenziji intenzivno istražuje kao što su gen za angiotenzinogen, za konvertazu angiotenzina, za glukokortikoidni receptor, za endotelin 1 ili pak za alfa-aducin. O nekima od njih više riječi bit će u nastavku. Većina studija ipak nije uspjela dokazati statistički značajnu povezanost tih gena s hipertenzijom, a kao jedno od mogućih obrazloženja za neuspjeh istraživači često navode visok udio lažno negativnih rezultata uvjetovanih genskom raznolikošću (heterogeničnost) hipertenzivnih bolesnika, odnosno ljudske populacije uopće.

Do trenutka pisanja ove disertacije (travanj 2005. god.) objavljeni su rezultati 21 istraživanja i opisano je 27 različitih lokusa značajno povezanih s hipertenzijom na ljudskom genomu. Gotovo svaki ljudski kromosom, osim kromosoma 13 i 20, ima najmanje jedan hipertenzivni lokus. Preklapanje lokusa jedino je primijećeno na kromosomu 2p, što taj kromosom čini posebice interesantnim za daljnja praćenja (11).

Dvije najveće genetičke studije koje su pokušale objasniti etiologiju hipertenzije, BRIGHT (engl. British Genetics of Hypertension) i FBPP (engl. Family Blood Pressure Program), tijekom 2003. godine objavile su rezultate skeniranja ljudskog genoma. Nažalost, rezultati su bili uglavnom negativni.

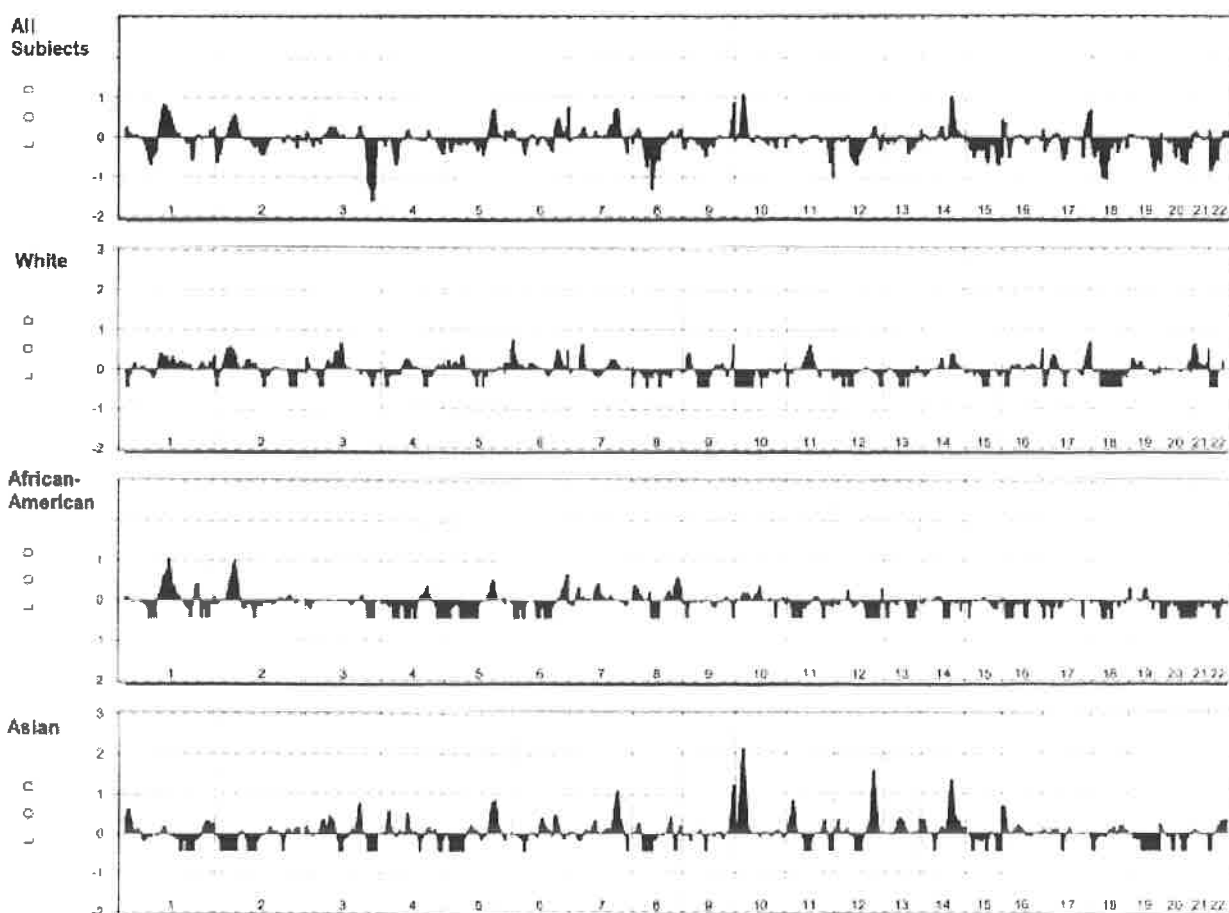
Studija **BRIGHT** obuhvatila je 3599 bijelaca s dijagnosticiranom hipertenzijom, a nakon provedenih analiza jedino je područje na kromosomu 6q pokazalo statistički značajan LOD od 3,2. Međutim, i taj je rezultat upitan jer je područje locirano na kraju kromosoma 6, a poznato je kako krajevi kromosoma, zbog nedostatnog broja genskih biljega, često pokazuju lažno pozitivne rezultate povezanosti. U studiji BRIGHT opisana su još tri područja na ljudskom genomu povezana s hipertenzijom (2q, 5q i 9q), ali su pokazala LOD niži od 3,0 (12).

**LOD** (engl. logartihm of odds) je mjera povezanosti genskog biljega s fenotipom. To je *logaritam vjerojatnosti* omjera koji se dobije uspoređujući hipotezu o povezanosti biljega i uzročnog gena s hipotezom njihove nepovezanosti, tj. mogućnošću njihove slobodne rekombinacije. Što je biljeg bliže uzročnom genu, to je vjerojatnost njihove rekombinacije manja, a LOD posljedično viši. LOD od 3,0 (vjerojatnost rekombinacije 1 prema 1000) i viši, upućuje na 95-postotnu vjerojatnost povezanosti gena s biljekom, a LOD manji od 2,0 na 99-postotnu vjerojatnost nepovezanosti gena i biljega.

**FBPP** je sedmogodišnji projekt NHLBI-a u kojem su sudjelovale četiri skupine istraživača od kojih je svaka proučavala različite etničke skupine: crnce, bijelce i Azijce te model hipertenzije kod štakora GH. Ni jedna skupina nije pronašla nijedan lokus povezan s hipertenzijom u ljudi unatoč 6245 obuhvaćenih ispitanika. Najviši pronađeni LOD iznosio je 2,96, i to za dijastolički tlak na kromosomu 1q te bez očitog gena kandidata u tom području. Na slici 1. predočeni su rezultati analiza povezanosti sistoličkog tlaka s biljezima na svim kromosomima unutar populacije FBPP (13).

Nije primijećeno nikakvo preklapanje rezultata FBPP-a s rezultatima studije BRIGHT, iako su obje uključivale istu etničku grupu (bijelci). Rezultati obaju istraživanja još su više iznenađujući uzmemo li u obzir činjenicu da je gotovo polovica varijabilnosti arterijskog tlaka genski uvjetovana.

**Slika 1. Rezultati analize povezanosti sistoličkog arterijskog tlaka u populaciji iz FBPP studije (13).** *Apscise označavaju vrijednosti LOD, a brojevi na ordinatama kromosome. Rezultati povezanosti predočeni su od vrha prema dnu kako slijedi: uključeni svi ispitanici, samo bijelci, samo crnci te samo Azijci.*

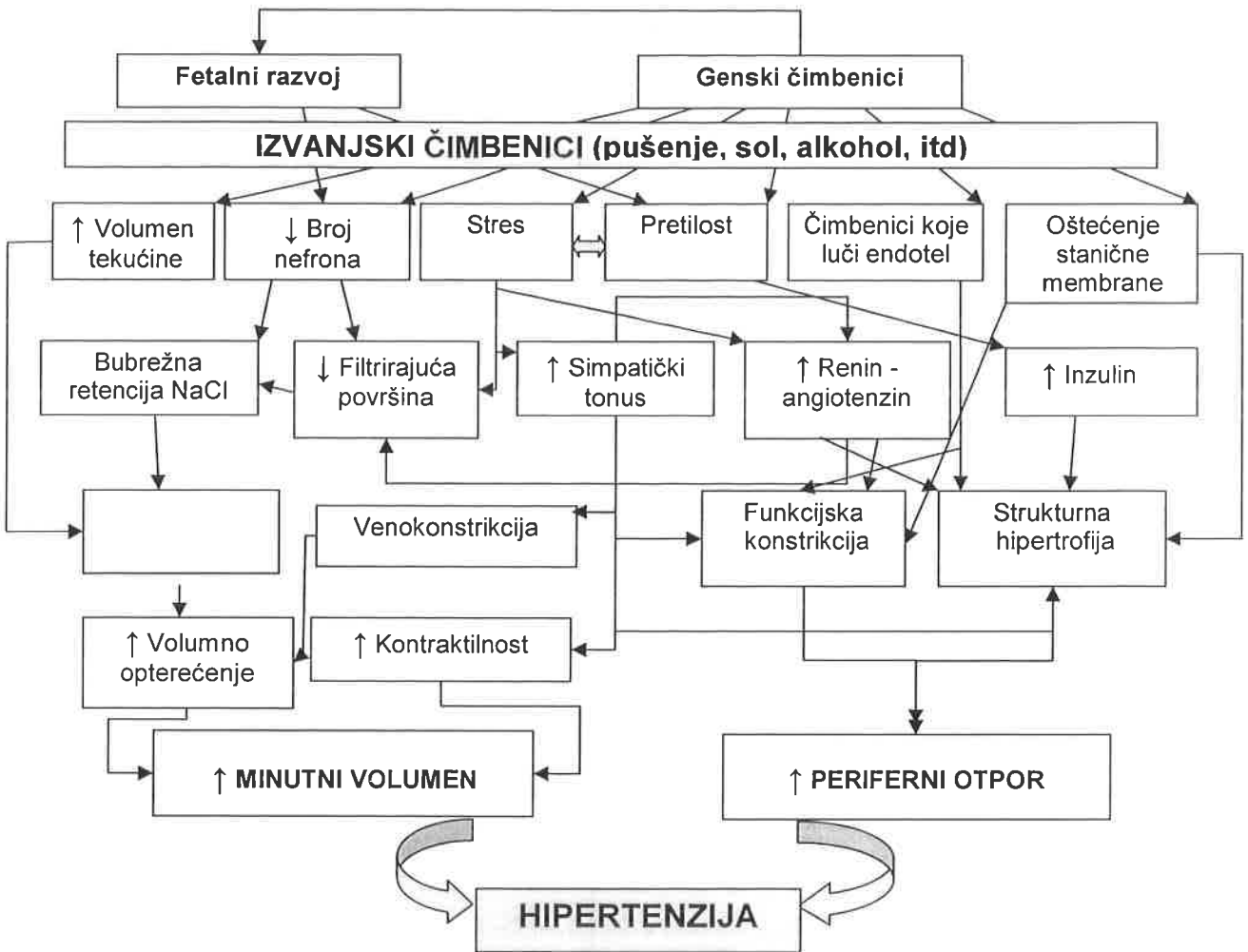


#### *1.1.4. Patofiziologija hipertenzije*

Pojednostavnjena jednadžba prema kojoj je srednji arterijski tlak jednak umnošku minutnog volumena i perifernog otpora, u živom organizmu znači iznimno kompliciranu mrežu fizioloških procesa i brojnih drugih čimbenika koji sudjeluju u regulaciji arterijskog tlaka (slika 2.). Unatoč studijama koje su otkrile i opisale neke od metaboličkih putova uključenih u homeostazu arterijskog tlaka, naše su spoznaje o ključnim čimbenicima ipak ograničene. Framinghamska studija je pokazala kako ljudi koji su tijekom života imali visoko normalne vrijednosti arterijskog tlaka također imaju povećan rizik kasnijeg pojavljivanja hipertenzije (14). Također je opisano kako neprimjereno povišenje tlaka tijekom fizičkog i psihičkog stresa, pretilost, povišena razina glukoze, triglicerida i serumskih proteina u krvi, također mogu ubrzati razvoj hipertenzije (15).

Etiologija hipertenzije još nije posve jasna pa je otkriće gena odgovornih za hipertenziju te spoznaja cjelokupne patofiziologije od goleme važnosti, kako za pojedince i njihove obitelji, tako i za kliničare u svrhu rješavanja ovog vodećeg problema XXI. stoljeća.

Slika 2. Pojednostavnjena patofiziologija hipertenzije. Modificirano prema (8).



### 1.1.5. Čimbenici rizika

**Kuhinjska sol.** Još je iz doba starokineske medicine (Huang Ti 2600. g. prije Krista) poznata povezanost količine NaCl u hrani s cirkulacijskim problemima (16). I danas je to jedan od najbolje proučenih čimbenika rizika. Pacijenti reagiraju na povećan unos soli vrlo različito: kod nekih redukcija soli u hrani dovodi do smanjenja, a kod drugih pak, što je paradoksalno, do porasta arterijskog tlaka (17). Bolesnici koji imaju hipertenziju osjetljivu na unos soli istodobno imaju i veću vjerojatnost razvoja hipertrofije lijeve klijetke ili mikroalbuminurije pa su izrazito pogodni za genetičke studije (18).

**Pretilost.** Jedan od ključnih rizičnih čimbenika esencijalne hipertenzije jest i pretilost, a redukcija tjelesne mase dovodi do osjetnog sniženja vrijednosti arterijskog tlaka i smanjenja hipertrofije lijeve klijetke (19). Rasna pripadnost kod pretilosti ima važnu predisponirajuću ulogu, tako da je udruženost pretilosti s hipertenzijom puno manja u Meksikanaca i crnaca nego u bijelaca (20). Uz pretilost, velik broj hipertenzivnih bolesnika ima i inzulinsku rezistenciju, odnosno stanje poznatije pod nazivom sindrom x ili metabolički sindrom, a koje je definirano intolerancijom glukoze, hipertenzijom, pretilošću i dislipidemijom. Pretpostavlja se da približno 50% bolesnika s hipertenzijom ujedno ima i metabolički sindrom (21).

**Dob.** Jedan od najočitijih rizičnih čimbenika jest životna dob, a porast incidencije hipertenzije u trećoj životnoj dobi vjerojatno je posljedica nakupljanja čimbenika koji pridonose hipertenziji, kao i onih povezanih s normalnim procesima starenja (22).

### 1.1.6. Uloga barorefleksa u regulaciji arterijskog tlaka

Poznato je kako u organizmu postoji nekoliko razina kontrole arterijskog tlaka. Među njima je osobito značajan autonomni živčani sustav koji je uključen u održavanje i regulaciju arterijskog tlaka za vrijeme promjene položaja, temperature, metaboličkih promjena ili za vrijeme djelovanja drugih stresora. Tako je iznimno precizno reguliranje arterijskog tlaka postignuto nizom visokospecijaliziranih, usko integriranih refleksnih lukova, uključujući dva glavna:

1.) *aortokarotidni luk* (receptori su završeci živaca osjetljivih na istežanje u karotidnom sinusu i aortnom luku koji djeluju kao senzori za nagle promjene arterijskog tlaka) te

2.) *kardiopulmonalni luk* (receptori su živčani završeci osjetljivi na istežanje u plućima i srcu, a koji ponajprije djeluju kao volumni senzori kod naglih promjena arterijskog tlaka i cirkulirajućeg volumena krvi).

Oba refleksna luka odašilju signale u moždano deblo gdje se u jezgrama solitarnog trakta (*nucleus tractus solitarii*, NTS) integriraju i moduliraju svi podražaji s periferije, hipotalamusa i korteksa u simpatički i parasimpatički odgovor. U moždanom se debelu zbivaju i važne interakcije između barorefleksa i neurohumoralnih elemenata kao što su endotelin, vazopresin, renin te atrijski natriuretski peptid (23-25).

Arterijske baroreceptore aktivira mehanički uzrokovana depolarizacija koja otvara o naponu ovisne natrijske i kalijске kanale uz posljedično stvaranje akcijskog potencijala, a impulsi putuju vagusom, glosofaringeusom i simpatičkim sustavom u središnji živčani sustav. Tijekom akutnog porasta arterijskog tlaka, baroreceptori se vrlo brzo prilagođavaju novim vrijednostima, u roku od nekoliko minuta. Pri prilagodbi refleksa dolazi do pomaka krivulje aktivnosti baroreceptora udesno, ali bez promjene u nagibu krivulje (slika 3.) (23). Kod kronične hipertenzije također dolazi do pomaka

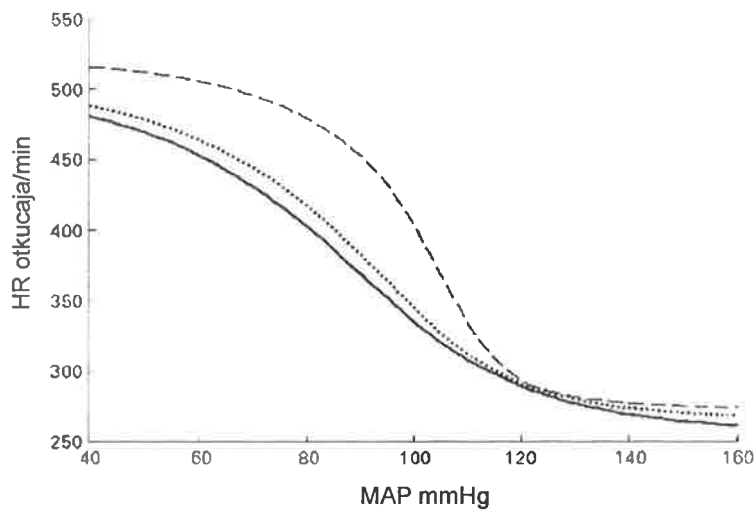
krivulje udesno, ali se mijenja i nagib krivulje baroreceptorskog refleksa, a razlozi tomu još nisu potpuno objašnjeni. Smatra se kako je to posljedica smanjenja žilne popustljivosti karotidnog sinusa te možda oštećene centralne regulacije refleksa. ANGII i vazopresin utječu na barorefleks centralno, i to u području areje postreme u moždanom deblu (23). Ti su učinci neovisni o njihovu posrednom djelovanju na barorefleks preko porasta arterijskog tlaka; ANG II pomiče krivulju refleksa udesno, tj. prema većim vrijednostima tlaka, dok antidiuretski hormon (ADH) radi suprotno. Osim ANG-a II, noradrenalin i prostaciklin također izravno djeluju na porast podražljivosti barorefleksa. Iz navedenog proizlazi kako bi inhibitori konvertaze i antioksidansi mogli imati mogućnost vraćanja baroreceptorskog refleksa na normalnu razinu djelovanja (23).

Druga komponenta barorefleksa, kardiopulmonalni luk, izravno kontrolira volumen krvi, minutni volumen i periferni otpor žilnog sustava integracijom podražaja iz kemoreceptora (koji su osobito značajni u patološkim stanjima poput ishemije, hipoksije te zatajenja srca) te polimodalnih receptora (koji su osjetljivi na kemijske, ali i na mehaničke podražaje), a moduliran je neuropeptidima uključujući vazopresin, renin, endotelin te atrijski natriuretski peptid (24).

Funkcija kardiopulmonalnog refleksa je pojačana u ranoj fazi hipertenzije u normotenzivnih ljudi s obiteljskom anamnezom hipertenzije. Pretjeran unos soli sam po sebi pojačava aktivnost tog refleksa i u normotenzivnih pojedinaca s negativnom obiteljskom anamnezom. Kako hipertenzija napreduje, refleks se polako gubi, a osobito nakon hipertrofije lijeve klijetke koja postaje manje rastegljiva. Smatra se da je hipertenzija ipak udružena s reverzibilnim promjenama tog refleksa te je posljedično nužno liječenje hipertenzije lijekovima koji dovode do regresije hipertrofije lijeve klijetke (24).



**Slika 3. Moguća krivulja aktivnosti barorefleksa u štakora pri akutnom i kroničnom povišenju arterijskog tlaka. Puna crta označava normalnu aktivnost baroreceptora, točkasta pomak udesno, ali bez promjene nagiba (akutna adaptacija barorefleksa), a isprekidana crta osim pomaka udesno ima i promijenjen nagib (barorefleks kod hipertenzije).**



## 1.2. Genetika hipertenzije

### 1.2.1. Osnovni pojmovi u genetici

**1. Mendelov zakon - zakon o jednoličnosti generacije F1** (engl. law of dominance). Taj zakon govori da križanjem čiste linije jedinki, tj. homozigotnih roditelja (AA, aa) nastaju potomci generacije F1 koji su međusobno identični.

**2. Mendelov zakon - zakon segregacije** (engl. law of segregation). Zakon segregacije govori o razdvajanju alela tijekom mejoze u generaciji F2 uz stalne omjere pojedinih obilježja. Npr., kod monohibridnog križanja s dominacijom u generaciji F1 pojavit će se samo dominantna osobina, dok u generaciji F2 dominantna osobina dolazi u omjeru 3:1.

**3. Mendelov zakon - zakon nezavisnog nasljeđivanja** (engl. law of independent assortment). Taj zakon govori o tome da se pojedina svojstva, koja se nasljeđuju odvojeno, pri križanju dviju jedinki raspoređuju slučajno, bez nekakva pravila (ako geni za ta dva svojstva nisu na istom haplotipu, tj. blizu jedan drugom na istom kromosomu).

**Aleli (genske varijante)** su alternativni oblici sekvencije DNK. Ako su pronađeni u više od 1% populacije, onda se njihove pozicije na genomu nazivaju polimorfičnim lokusima. Posljedično, varijacije u sekvenciji DNK dovode do razlika u fenotipovima pojedinaca.

**Analiza povezanosti** (engl. linkage analysis) mjeri povezanost bolesti unutar zahvaćenih obitelji s genskim biljezima. Potrebno je imati više od jedne generacije obitelji da bi se mogla pratiti segregacija biljega i bolesti na potomstvo. Idealni su polimorfični biljezi jednoliko raspoređeni duž genoma. Ako je biljeg povezan s fenotipom, može se očekivati da će se zajedno prenositi na potomstvo. Udaljenost

između biljega i fenotipa (gena) može se izračunati ovisno o broju rekombinacija tijekom mejoze.

**Centimorgan (cM)** je mjera genske udaljenosti, a otprilike odgovara udaljenosti dvaju lokusa koji pokazuju 1% rekombinacije.

**Delecija** je vrsta mutacije karakterizirana gubitkom dijela DNK, što može dovesti do bolesti ili abnormalnosti ukoliko je zahvaćen gen ili dio gena.

**Geni kandidati** su geni za koje se smatra da su mogući uzročnici fenotipa/bolesti. Da bi se pojedini gen proglasio kandidatom mora imati odgovarajući položaj na genomu (unutar QTL-a) te bi trebao kodirati proteine za koje je poznato da sudjeluju u pojedinim regulacijskim mehanizmima traženog stanja/bolesti, bilo na temelju podataka iz literature ili rezultata prethodnih istraživanja.

**Genomom** nazivamo cjelokupnu DNK koju posjeduje jedinka.

**Genomika** je različita od genetike, a proučava organizaciju i evolucijsku povijest DNK. Ljudski genom ima oko tri milijarde nukleotida, odnosno oko 30.000 gena.

**Genski biljezi** se koriste pri genotipiziranju, a najčešće su to SLLP (engl. short sequence length polymorphism) te mikrosatelitski biljezi. Biljezi označavaju mjesta u genomu na kojima se ponavljaju CA dinukleotidi različit broj puta, a pokazuju visok stupanj polimorfizma među pojedincima.

**Haplotip** – segment DNK s pripadajućim genima na jednom kromosomu koji se nasljeđuje u „paketu“ (nema mogućnosti rekombinacije zbog blizine gena).

**Insercija** je oblik kromosomske abnormalnosti, odnosno mutacije, kod koje je dio DNK „umetnut“ unutar gena narušavajući tako njegovu normalnu strukturu i funkciju.

**Kloniranje gena** je proces identifikacije gena koji se temelji na poznavanju produkta gena (protein), a sastoji se od određivanja redoslijeda aminokiselina te korištenja tih informacija u otkrivanju gena.

**Kosegregacija** (engl. cosegregation) je pojava nasljeđivanja dvaju ili više povezanih gena na istom kromosomu (haplotip).

**Mikrosateliti** (eng. microsatellites) su kratki segmenti ponavljajućih oligonukleotida raspoređenih duž nekodirajućeg dijela genoma (npr. ATTATTATTATTATT...).

**Mikrosatelitna nestabilnost** (engl. microsatellite instability) je promjena u redosljedu nukleotida uzrokovana insercijom ili delecijom mikrosatelita. Ova pojava nastaje kao posljedica nemogućnosti stanica da poprave pogreške u redosljedu nukleotida nastale tijekom umnažanja DNK. Nakupljanje ovih promjena može dovesti do maligne transformacije stanice (npr. kod karcinoma debelog crijeva).

**Mutacija** je proces u kojem se remeti redosljed nukleotida (sekvencija DNK), a može zahvatiti jedan ili više nukleotida. Promjena nukleotida može (ali i ne mora) posljedično dovesti do promjene redosljeda aminokiselina, odnosno strukture proteina.

**Nasljednost ili heritabilitet** -  $h^2$  (eng. heritability) opisuje koliki je dio varijacije fenotipa uzrokovan genskim varijacijama. Izračunava se statističkim metodama, a specifičan je za populaciju, odnosno fenotip.

**Neravnoteža spoja** (engl. LD - linkage disequilibrium) ili **asocijacijske studije** koriste se za proučavanje kosegregacije bolesti (gena) i biljega između različitih zahvaćenih obitelji, čak i između jedinki koje nisu u srodstvu. Kako bi se na ovaj način otkrili geni, potrebno je imati ispitanike (bolesnike) i kontrole s približno jednakim frekvencijama alela. Kako to često nije slučaj, u ispitivanjima se koristi nezahvaćena rodbina kao kontrolna skupina. Naime, u idealnim bi uvjetima biljeg i gen (fenotip) trebali imati mogućnost slobodne rekombinacije i segregacije u potomstvu. Ako je biljeg blizu ciljanog gena (fenotipa) onda je vjerojatnost da se među njima dogodi rekombinacija vrlo mala te će haplotip (točno određena sekvencija kromosoma s biljezima i ciljanim genom) biti prenesen na potomstvo

zajedno s bolešću. Za takve se alele/biljege kaže da su u neravnoteži (disekvilibriju) povezanosti.

**Pleotropija** je pojava više od jednog fenotipa ili bolesti koje su uzrokovane istim genima (npr. opisani zajednički genski čimbenik koji je medijator hipertenzije, dijabetesa i pretilosti među blizancima iz Sjeverne Amerike (26)).

**Polimorfizam** obično uključuje promjenu samo jednog nukleotida (SNP), deleciju manjeg ili većeg dijela sekvencije DNK, umetanje određenog broja nukleotida ili pak ponavljanja di-, tri- ili oligonukleotida različit broj puta, a koji varira među pojedincima.

**Pozicijsko kloniranje** je proces identifikacije gena koji uzrokuje ciljani fenotip/bolest koji se temelji na položaju gena na genomu. Taj proces uključuje izradu genskih karata, analize povezanosti te korištenje bioinformatičkih alata. Kod ovog pristupa nije nužno poznavanje biokemijske osnove bolesti, kao ni poznavanje produkta gena.

**QTL – mjesto količinskih značajki** (engl. quantitative trait loci) je genski lokus (područje genoma) koji je identificiran na temelju statističke analize složenog fenotipa, kao npr. tjelesna visina ili masa, arterijski tlak i slično, a koji je uglavnom uzrokovan interakcijom više gena i izvanjskih čimbenika.

**Rekombinacijska frakcija ( $\theta$ )** je mjera vjerojatnosti da gameta ima rekombinaciju između dva ciljane lokusa.

**Rekombinantna genska karta** je karta dobivena računanjem broja rekombinacija (koje se događaju za vrijeme mejoze) na pojedinom kromosomu, odnosno određivanjem položaja i rekombinacija genskih biljega (alela) dobivenih genotipiziranjem.

**Skeniranje genoma** uobičajeno se radi zbog procjena kosegregacije genskog biljega s fenotipom na određenim intervalima duž cijelog genoma. Obično se genotipiziraju biljezi na udaljenosti svakih 5-10 cM.

**SNP (engl. single nucleotide polymorphism)** je polimorfiizam jednog nukleotida u kojem je jedan od četiri nukleotida (A, T, C ili G) zamijenjen drugim. SNP-ovi uzrokuju promjenu sekvencije DNK. U ljudskom genomu ima oko 15 milijuna SNP-a, od kojih 50.000 do 100.000 može promijeniti funkciju ili izražaj gena. 70% SNP-a ima frekvenciju u populaciji manju od 5%, tako da ih nazivamo rijetkim SNP-om.

### 1.2.2. Genetika poligenih bolesti

Poznato je kako su mnoge kronične poligenne bolesti poput dijabetesa ili hipertenzije učestalije u nekim obiteljima, kako su uzrokovane s više gena te da nemaju jednostavan model nasljeđivanja koji se temelji na Mendelovim načelima (dominantni, recesivni, x vezani). Dapače, one pokazuju iznimno složen model nasljeđivanja sa znatnim utjecajem izvanjskih čimbenika (27). Arterijski tlak je kvalitativno obilježje s kontinuiranom distribucijom od niskih do visokih vrijednosti, a posljedica je utjecaja mnogih gena. Za razliku od monogenih bolesti, kod hipertenzije ti geni nisu izravan uzrok bolesti, nego samo pridonose "osjetljivosti na bolest" te kao takvi nužno ne dovode do fenotipa ako nema ostalih uzročnih gena ili izvanjskih čimbenika (slika 4.).

Glavne metode koje se koriste za otkrivanje gena uzročnika poligenih bolesti slične su metodama koje se koriste pri pozicijskom kloniranju gena uzročnika monogenih bolesti, a to su analiza povezanosti, neravnoteža povezanosti te studije na genima kandidatima. Ove posljednje temelje se na pretpostavci kako je navedeni gen kandidat uključen u patogenezu bolesti pa se testira njegova povezanost u populaciji ili unutar obitelji.

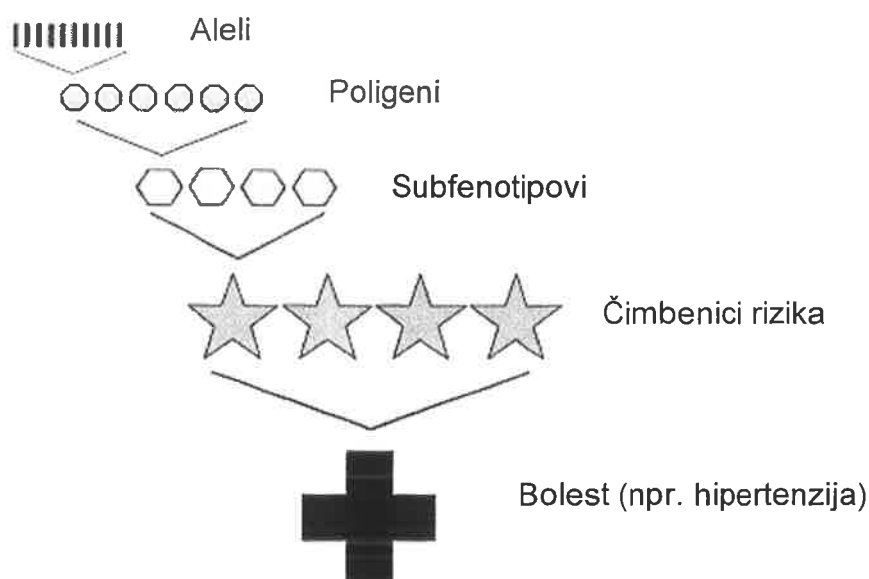
Široko korišteni parametar za procjenu stupnja nasljednosti unutar obitelji jest  $\lambda_R$ , tj. **rizik** za krvnog srodnika oboljele osobe podijeljen s rizikom za opću populaciju (28). Poznato je da fenotip unutar jedne obitelji može biti posljedica djelovanja

zajedničkih gena, zajedničkih izvanjskih čimbenika ili obojeg. Ako je  $\lambda_R$  veći kod jednojajčanih nego kod dvojajčanih blizanaca ili drugih rođaka, odnosno veći u prvih nego u drugih rođaka, vrlo je vjerojatno kako je bolest genski uvjetovana. Kratko rečeno, što je veći  $\lambda_R$ , to je vjerojatnije da je bolest genski uzrokovana.

Osobito popularan način proučavanja utjecaja gena na fenotip jesu studije na blizancima (29). Osim toga, ostali često korišteni resursi za proučavanje genskog utjecaja na pojedinu bolest su imigranti, posvojena djeca, genski izolirane populacije, odnosno populacije koje nemaju neke od rizičnih izvanjskih čimbenika.

**Slika 4. Moguća hijerarhija u genezi hipertenzije. Modificirano prema Harrapu i sur. (30)**

*Nepoznati broj alela pridonosi pojedinom poligenu, nepoznati broj poligena subfenotipu, a nekoliko subfenotipova svakom od čimbenika rizika. Posljedično, bolest znači iznimno kompliciranu interakciju brojnih alela, poligena, subfenotipova i čimbenika rizika.*



### 1.2.3. Teorije o nasljednosti hipertenzije

O genezi hipertenzije počelo se intenzivnije razmišljati pedesetih i šezdesetih godina XX. stoljeća. Ubrzo su se formirale dvije škole: Plattova i Pickeringova. Plattova je grupa nastojala objasniti hipertenziju kao jednostavan autosomno dominantan model bolesti, uzrokovan jednim «glavnim» genom koji slijedi osnovne Mendelove principe nasljeđivanja (31). Ako je to stvarno istina, onda bi bilo logično očekivati bimodalnu distribuciju arterijskog (skupina s hipertenzijom i bez nje). Međutim, epidemiološke studije hipertenzije pokazale su kontinuiranu unimodalnu distribuciju arterijskog tlaka.

Za razliku od Plattove, Pickeringova je grupa opisala kontinuiranu distribuciju arterijskog tlaka u populaciji s pomakom prema većim vrijednostima tlaka kod starije populacije. Oni nisu uspjeli utvrditi točnu vrijednost koja bi podijelila distribuciju arterijskog tlaka na hipertenziju i na normalan arterijski tlak. Pickering opisuje bolesnika s esencijalnom hipertenzijom kao jedinku koja je naslijedila neke od gena, ali je tijekom života bila izložena odgovarajućim egzogenim čimbenicima koji pospješuju hipertenziju (32).

Postoje pojedinci koji su genski osjetljiviji na neke od izvanjskih čimbenika, npr. na unos soli (33) te kao takvi razvijaju hipertenziju samo ako su izloženi čimbeniku rizika. Tako je studija na populaciji iz Utaha (izolirana populacija bijelaca uz česte brakove između rođaka) pokazala veću korelaciju za unos soli, kave, količinu vježbanja i zadovoljstva radom kod jednojajčanih blizanaca nego kod njihove braće ili rodbine, što može sugerirati kako i izvanjski čimbenici također imaju gensku podlogu (34).

Podaci o nasljednosti hipertenzije variraju od studije do studije, a obično je manja kod obiteljskih studija zbog dobne razlike roditelja i potomaka. Ispitivanja na 289 švedskih blizanaca navode indeks nasljednosti od 0,44 za sistolički i 0,34 za



dijastolički arterijski tlak (35). Genetičke studije na finskoj populaciji pokazale su kako su za učestalost infarkta miokarda i moždanog udara odgovorni neovisni rizični čimbenici (36), dok su istraživanja provedena u Švedskoj pokazala kako je smrtnost od koronarne srčane bolesti u mlađoj dobi pod utjecajem genskih čimbenika u oba spola (37).

Unatoč svim navedenim studijama, još ne postoji konsenzus o tome kolika je ukupna uloga gena, odnosno nasljedni rizik hipertenzije. U biti možemo zaključiti, kad uzmemo u obzir složenu multifaktorijsku etiologiju bolesti, kako genska komponenta poprilično varira čak između članova iste obitelji.

#### 1.2.4. Monogeniski oblici hipertenzije

Najzanimljiviji podaci o genezi hipertenzije dobiveni su proučavanjem gena čija je mutacija dovela do pojave hipertenzije. Prvi među njima je bio *Liddleov sindrom*, koji je 1963. prvi opisao Liddle kad je otkrio hipertenzivnu djevojčicu s hipokalijemijom, alkalozom i niskim aldosteronom (38). Njezin arterijski tlak nije odgovarao na spironolakton, a neki od njezinih rođaka također su imali sličnih problema. On je točno opisao kako se radi o defektu transporta iona u bubregu, a sindrom se unutar obitelji nasljeđivao autosomno dominantno. Tek je 1994. godine otkriven gen za Liddleov sindrom, *EnaC* (gen za beta-podjedinicu bubrežnog epitelnog natrijskog kanala) ali je nekoliko sljedećih studija pokazalo više različitih mutacija tog gena (39). Normalno je broj  $\text{Na}^+$  kanala u bubregu reguliran unutarstaničnom koncentracijom  $\text{Na}^+$  iona. Mutacija gena remeti funkciju kanala što dovodi do znatnog porasta  $\text{Na}^+$  u stanici. Valja napomenuti kako mutacija koja dovodi do potpunog gubitka funkcije kanala pretvara Liddleov sindrom u stanje karakterizirano smanjenjem volumena plazme, hiperkalijemijom te acidozom, tj. simptomima koji su karakteristični za pacijente s pseudohipoaldosteronizmom (40).

Drugi monogeniski oblik hipertenzije je *prividni mineralokortikoidni višak* (engl. apparent mineralocorticoid excess, AME). To je autosomna recesivna bolest karakterizirana ranim početkom hipertenzije. Bolest ima dva oblika, AME1 i AME2 (41, 42). Kod AME1 nema pretvorbe kortizola u kortizon jer mutacija zahvaća ključni enzim, 11 hidroksteroidnu dehidrogenazu, koja je potpuno inaktivna (41). AME2 zahvaća isti enzim, ali je mutacija na drugom mjestu tako da enzim nije potpuno inaktivan, nego mu je samo smanjena koncentracija (42). U oba navedena sindroma, Liddleovu i AME-ovu, koncentracija aldosterona je niska.

Postoji i treći sindrom, *hiperaldosteronizam ovisan o glukokortikoidima* (engl. glucocorticoid remediable aldosteronism, GRA). Taj se sindrom razlikuje od Connova sindroma po tome što se pojačana sekrecija aldosterona može smanjiti glukokortikoidima. Genska pozadina tog sindroma je slijedeća: dva gena, 11-hidroksteroidna dehidrogenaza (11B-HSD) i aldosteronska sintetaza (AS) su jedna blizu druge na ljudskom kromosomu 8. Kod zahvaćenih pojedinaca dolazi do izmjene dijelova kromatida (engl. crossing over) te stvaranja novog gena. Novi gen ima regulacijski dio koji potječe od 11B-HSD (koji je pod kontrolom ACTH) koji regulira izražaj gena AS te posljedično sekreciju aldosterona. Budući da je ACTH regulator izražaja gena, sekrecija aldosterona se može paradoksalno blokirati glukokortikoidima. Smatra se kako takvo stanje vrlo često ostaje neotkriveno (43). Polimorfizam gena AS povezan je i s esencijalnom hipertenzijom, dok je mutacija T594 u *ENaC* genu povezana s hipertenzijom u crnaca (44).

Jesu li spomenuti geni uistinu važni u hipertenziji potrebno je dodatno ispitati, ali bi prethodno trebalo odrediti stvarnu prevalenciju tih bolesti zbog visokog stupnja heterogenosti pronađenog u svim navedenim sindromima.

### 1.2.5. Geni kandidati

**Gen za angiotenzinogen (ANG).** Renin-angiotenzin-aldosteronski sustav je bio predmet brojnih genetičkih studija koje su nažalost često davale proturječne rezultate. Unatoč njima, jedan od najkonzistentnijih "pozitivnih" nalaza jest gen za angiotenzinogen na kromosomu 1q. Miševi kojima je eksperimentalnim putem „isključen“ gen ANG (engl. „knock-out“) su hipotenzivni (45), dok su životinje koje imaju dodatne kopije tog gena (transgenične životinje) hipertenzivne (46).

*M235T varijanta* jest varijanta gena kod koje je treonin na položaju 235 zamijenjen metioninom. Ta je varijanta pokazala povezanost s hipertenzijom unutar obitelji, ali to nije potvrđeno asocijacijskim studijama (47). Povezanost je potvrđena i kod Afrikanaca s Kariba (48) te meksičkih Amerikanca (49). Jedno od posljednjih istraživanja, koje je uključilo 350 europskih obitelji, nije pokazalo povezanost hipertenzije s ANG-om (50), kao ni slična studija provedena na populaciji iz Kine (51). Kuntz i suradnici su pokazali kako je alel 235 T odgovoran za otprilike 20-postotno povišenje rizika od hipertenzije (52).

**Gen za konvertazu angiotenzina (ACE).** S hipertenzijom je povezan i gen ACE, točnije *insercijsko-delecijski (I/D) polimorfizam* na položaju 287. ponavljajuće sekvencije unutar introna 16 (53). Povezanost je utvrđena i u multicentričnoj retrospektivnoj studiji između alela ACE D te akutnog infarkta miokarda (54). Biološka osnova hipoteze je vrlo interesantna. Vrijednosti ACE-a u plazmi su različite kod pojedinaca, ali su iznimno konstantne tijekom života. Otprilike 50% te varijabilnosti genski je uvjetovano (55). *Polimorfizam I/D* je usko povezan s biološkim efektom, tako da pojedinci s genotipom DD (delecija na oba introna 16) imaju dva puta više vrijednosti ACE-a u plazmi nego pojedinci s genotipom II (insercija na oba introna 16), dok je vrijednost ACE-a kod pojedinaca ID (imaju jednu inserciju i jednu deleciju, tj. heterozigoti) negdje u sredini (56). Unatoč brojnim radovima, još je

nepoznanica koliki je stvarni doprinos te varijante u razvoju hipertenzije. Metaanaliza je potvrdila povećan rizik od akutnog infarkta miokarda, iako je iznosio samo 1,26 (57). ACE nije limitirajući čimbenik u formiranju ANG-a II što je pokazano u pokusima s transgeničnim miševima koji nisu hipertenzivni (58). U većini istraživanja nije pronađena veza između gena ACE i hipertenzije, ali je nedavno, kada je Framinghamski uzorak stratificiran prema spolu, ipak utvrđena povezanost tog gena s hipertenzijom u muškaraca (59).

**Renin.** Prva povezanost hipertenzije s genom za renin opisana je u štakora Dahl SS (60), ali ponovljeni pokusi nisu uspjeli to potvrditi (61). Nakon tih rezultata, interes za reninom kao genom kandidatom je splasnulo. Međutim, nedavni rezultati projekta PGA (engl. Program for genomic application; <http://pga.mcw.edu>) dobiveni fenotipiziranjem konsomičnih štakora SS<sup>BN13</sup> (imaju BN kromosom 13 na genskoj pozadini štakora SS) pokazali su odsutnost hipertenzije i proteinurije, što nedvojbeno upućuje na važnost gena lociranih u okolini gena za renin na kromosmu 13 u etiologiji hipertenzije kod štakora SS (62).

**Receptor za angiotenzin 1 (AT1).** AT 1 gen zauzima važno mjesto među genima kandidatima. Bonnardeaux i sur. su opisali povezanost između varijante tog gena A1166C i humane hipertenzije, ali nisu uspjeli potvrditi povezanost između biljega na tom lokusu i hipertenzije u studijama unutar obitelji (63). Varijanta A1166C čvršće je povezana s hipertenzijom u pojedinaca s pozitivnom obiteljskom anamnezom (64). Smatra se da ta varijanta može uzrokovati zadebljanje aorte i gubitak elastičnosti te smanjen odgovor na davanje inhibitora konvertaze angiotenzina i blokatora kalcijevih kanala, ali samo kod hipertoničara (65). Dokaz epistaze pružili su Tiret i suradnici studijom u kojoj je polimorfizam A1166C povećao rizik akutnog infarkta miokarda u pojedinaca sa specifičnim ACE genotipom DD (66). Castellano i suradnici, međutim,

nisu pronašli povezanost ovog polimorfizma s rizikom obolijevanja od kardiovaskulnih bolesti (67).

**Ostali.** Brojne su studije obuhvatile i druge gene kandidate. Sve su doživjele brojna ponavljanja, a rezultati ponovljenih istraživanja često su bili kontradiktorni ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim)). Ostali geni kandidati su:

- područje *HLA* na kromosomu 6
- *gen SA* (gen nepoznate funkcije povezan s hipertenzijom ) na kromosomu 16
- *Lipoprotein lipaza* na kromosomu 8p
- *Alfa aducin* na 4p16.3
- *Fibrilin 1* na 15q21.1
- *Metiltetrahidrofolat reduktaza* (MTHFR). MTHFR metilira homocistein u metionin, a pad aktivnosti tog enzima dovodi do hiperhomocisteinemije, koja se smatra neovisnim rizičnim čimbenikom ateroskleroze (68). Nedavno je upozoreno na vezu između termolabilne forme tog enzima (točkasta mutacija na 677. nukleotidu) i povišenih vrijednosti homocisteina u plazmi (69).
- *Inhibitor 1 aktivatora plazminogena* (PAI 1) - povezan je s trombozom (70)
- *Apolipoprotein E4* (APO E4) - skupina finskih istraživača (Nikkila i sur.) opisala je kako osobe nosioci alela Apo E2 imaju visoke koncentracije Apo E-a te niske vrijednosti ukupnog kolesterola, kolesterola LDL i Apo B; dok osobe s alelom Apo E4 imaju suprotne osobine (71). Alel Apo E4 povezan je s težinom i letalitetom koronarne bolesti srca, ali u tome također važnu ulogu imaju spol, etnička pripadnost te način života (72).

### 1.2.6. Zaključci iz literature

Informacije dobivene pretraživanjem literature o genezi hipertenzije mogu se predočiti u nekoliko zaključaka:

- A) Esencijalna hipertenzija je vrlo heterogen poligeniski poremećaj, tj. različiti pacijenti imaju različite skupine gena koji mogu dovesti do povišenja arterijskog tlaka.
- B) Smatra se da je genska komponenta hipertenzije aditivna, odnosno da ovisi o interakciji između izvanjskih čimbenika i ravnoteže uzročnih i zaštitnih gena.
- C) Izvanjski su čimbenici vrlo važni te izravno utječu na pojedince, nosioce različitih genskih varijanti (33, 73).
- D) Hipertenzija je etiopatogenetski vrlo različita, od pojedinaca u kojih geni ne dolaze do izražaja do onih u kojih se hipertenzija može smatrati gotovo monogenском bolešću (43).
- E) Epistaza i "protektivne varijante" imaju važnu ulogu u ovoj bolesti (73).
- F) Postoje stanja i genske varijante koje predisponiraju nastanku drugih kardiovaskulnih bolesti poput AME-a ili GRE-a (74, 75).
- G) Ne obolijevaju svi pojedinci koji nose neke od predisponirajućih genskih varijanti (76).

### 1.3. Metodologija u genetici poligenских bolesti

#### 1.3.1. Metode za otkrivanje gena u humanoј genetici

Najbolji način za analiziranje pojedinih gena jest njihovo sekvencioniranje, tj. određivanje redoslijeda nukleotida kod zahvaćenih i kontrolnih pojedinaca, ali je primjena takve metodologije ograničena zbog velikih troškova, nepoznatog broja uključenih gena, njihove strukture te lokalizacije na genomu. Zbog toga se današnji istraživači koriste drugim, opće prihvaćenim metodama u detekciji uzročnih gena. To su (28):

**a) Parametarska analiza povezanosti** (engl. linkage analysis). Ta analiza zahtijeva poznavanje nekih od pokazatelja željenog fenotipa (bolesti) kao što su frekvencija gena u populaciji, način nasljeđivanja, penetracija fenotipa te opisane fenokopije. Procjena rekombinacijske frakcije između biljega dobivenog genotipiziranjem i lokusa koji nosi fenotip temelji se na kosegregaciji genskog biljega u obitelji te modela koji se temelji na osobitostima fenotipa. Analiza povezanosti je prilično učinkovita, ali je problematična kod složenih fenotipova zbog nepoznavanja svih potrebnih parametara. Takav je oblik analize idealan kod velikih obitelji za koje imamo podatke o više generacija, što se nažalost vrlo rijetko događa jer se većina takvih bolesti očituje kasno tijekom života, a prosudbu remete fenokopije.

**b) Metoda preklapajućih alela** (engl. allele sharing methods). Takav se oblik statističke analize često naziva i neparametarskom analizom jer ne zahtijeva poznavanje pokazatelja bolesti ili fenotipa. Ona se temelji na analizi genskih lokusa kod zahvaćenih članova obitelji koji imaju drukčiju frekvenciju alela na ciljnim lokusima od one koja bi se očekivala prema Mendelovim zakonima segregacije.

**c) Asocijacijske analize** (engl. association analysis). Takav je oblik analiza popularan kod izrazito heterogenih stanja. Jedini preduvjet je posjedovanje dovoljno

guste rekombinantne genske karte (77, 78). Analiza se provodi uspoređivanjem ciljanih alela (biljega) kod bolesnika (engl. cases) i zdrave, kontrolne populacije (engl. controls). Kontrolna skupina treba biti što sličnija ispitivanoj, tako da katkad obuhvaća i roditelje, odnosno njihove "neprenesene" alele.

Kod potrage za genima uzročnicima poligenskih bolesti, osim gena i njihove interakcije s izvanjskim čimbenicima, treba imati na umu i druga stanja koja mogu utjecati na izražaj fenotipa. To su:

**1.) Nepotpuna penetracija fenotipa** - bolesnik unatoč tomu što ima uzročnu mutaciju neće razviti fenotip odnosno bolest zbog nepoznatih razloga (osobito učestalo kod složenih bolesti).

**2.) Fenokopije** - izražaj sličnih fenotipova od kojih neki uopće nisu genski uzrokovani (npr. pretilost uzrokovana pretjeranim jelom i neaktivnošću kod jedinke koja nije genski predisponirana).

**3.) Lokusna heterogeničnost** - pojava kada dva ili više različitih lokusa na genomu mogu neovisno jedan o drugome uzrokovati istu bolest. To je čest slučaj u monogenskih bolesti (npr. tuberoznu sklerozu mogu uzrokovati dva različita lokusa, jedan na kromosomu 9, a drugi na kromosomu 16).

**4.) Epistaza** - specifična interakcija genotipa na dva ili više mjesta koja međusobno nisu povezana, a koja onda dovodi do pojave fenotipa. Epistaza uvelike otežava otkrivanje gena s pomoću tradicionalnih analiza povezanosti.

**5.) Pleotropija** - pojava kada jedno te isto područje genoma može uzrokovati dva različita fenotipa (npr. lokus NIDDM može predisponirati razvoj dijabetesa, ali i pretilosti). Posljedično, ako želimo otkriti pleotropni lokus moramo istodobno analizirati više fenotipa.

**6.) Mitohondrijska DNK** - DNK smještena unutar mitohondrija nasljeđuje se neovisno o genskom materijalu unutar stanične jezgre, a prenosi se isključivo s



majke na potomstvo. Proteini kodirani mitohondrijskom DNK uglavnom sudjeluju u oksidativnim procesima, dok su njihove mutacije povezane s nekim vrstama mišićnih distrofija te s pojedinim metaboličkim poremećajima (NIDDM).

**7.) Utisnuće (engl. imprinting)** – oblik nasljeđivanja gena kod kojeg je u potomstvu aktivna kopija gena naslijeđena samo od jednog roditelja (bilo oca, bilo majke), dok je kopija gena naslijeđena od drugog roditelja inaktivna (engl. imprinted). Do danas je opisano 80-ak gena u ljudi koji se nasljeđuju na taj način. Najpoznatiji primjer je gen za čimbenik rasta nalik na inzulin 2 (*IGF-2*). Aktivna je samo kopija gena naslijeđena od oca, dok je ona od majke inaktivna. U slučaju da je u stanici izražena i majčina kopija gena, stanica može maligno alterirati (što je opisano u Wilmsovu tumoru).

### 1.3.2. Životinjski modeli – rješenje za poligenske bolesti?

Polovinom prošlog stoljeća znanstvenici su križanjem uspjeli stvoriti brojne pokusne životinje, modele za složene bolesti. Najpopularniji i najbrojniji među njima su štakori jer su relativno jeftini, brzo se razmnožavaju te su zbog svojih tjelesnih karakteristika veoma pogodni za fiziološke, odnosno genetičke pokuse. Kod životinjskih modela mogu se kontrolirati i nadzirati pojedini pokazatelji što smanjuje varijabilnost te olakšava zaključivanje. Također, izvanjski se čimbenici mogu vrlo jednostavno proučavati jer se križanjem životinja s ekstremnim fenotipovima dobiva F1 populacija koja je genski potpuno identična (svi su heterozigoti), a sve su izmjerene razlike u ispitivanom fenotipu isključivo uvjetovane izvanjskim utjecajima. Kao prilog u korist životinjskih modela možemo spomenuti i nedavno objavljenu strukturu genoma čovjeka, miša i štakora koje su pokazale kako postoji gotovo 90 postotna evolucijska postojanost gena između te tri različite vrste, unatoč različitim veličinama genoma, i to u organizama koji su evolucijski udaljeni milijune godina. Uz pomoć modernih metoda i bioinformatičkih alata, ispitivano područje genoma jednog

organizma, pokusnog modela, može se vrlo jednostavno preslikati na odgovarajuće područje ljudskog genoma te na taj način olakšati i ubrzati humana genetička istraživanja.

Kod pojedinih životinjskih modela više od 60% varijacije u arterijskom tlaku posljedica je utjecaja genskih čimbenika, ali različiti hipertenzivni životinjski modeli nemaju iste skupine uzročnih gena. Samo za hipertenziju, do danas je stvoreno više štakorskih modela, jedan mišji te jedan model u zamorca (79). Tako postoje modeli poput štakora GH, SHR koji spontano razvijaju hipertenziju bez potrebe za dodatnim intervencijama. Hipertenzija u štakora GH, SHR te u Lyonskih hipertenzivnih štakora (LH) pokazuje normalne vrijednosti renina.

Drugi životinjski modeli, među kojima su najpopularniji Dahl SS i štakori Sabra, trebaju pojačanu koncentraciju NaCl u hrani kako bi razvili hipertenziju. Ti su modeli veoma popularni u istraživanjima genske preosjetljivosti na izvanjske čimbenike rizika.

Brojna su istraživanja na životinjskim modelima pokazala kako je hipertenzija u najmanju ruku oligogenski fenotip te kako su različiti geni i genski efekti unikatni za pojedine sojeve. Takve i slične studije potvrdile su iznimnu kompleksnost hipertenzije čak i u pojednostavnjenim čistim sojevima pokusnih životinja s kontroliranim izvanjskim čimbenicima.

### *1.3.3. Štakori s genski uvjetovanom hipertenzijom*

Prvi stvoreni hipertenzivni model štakora jest genski hipertenzivni soj štakora (GH/Omr) koji potječe od soja Wistar, a koji je 1930. godine iz Engleske uvezen u Novi Zeland. Njihovo je križanje započeo Smirk 1955. godine na Sveučilištu u Otagu. GH je čisti soj štakora (eng. inbreed strain) koji je dobiven sistematskim križanjem braće i sestara (onih s najvišim vrijednostima tlaka) tijekom nekoliko desetaka

generacija, čime su se fiksirali željeni aleli, odnosno željena područja genoma GH. Taj hipertenzivni model odlikuje se vrlo ranim početkom hipertenzije (u dobi od 4 do 6 tjedana) koja nije osjetljiva na unos NaCl, povišenim kolesterolom, hipertrofijom srčanog mišića (do 50% većom nego u kontrolnih normotenzivnih štakora), povećanom srčanom frekvencijom (do 20%), povećanom tjelesnom masom unatoč sporijem rastu te hipertrofijom žilne medije, osobito izražene u krvnim žilama mezenterija. Hipertrofija lijeve klijetke u GH nije samo posljedica hipertenzije nego je uvjetovana i neovisnim genskim čimbenicima (80). Nasljednost hipertenzije u ovom modelu je oko 50%.

GH štakori također imaju oštećenu bubrežnu autoregulaciju protoka, a pojačana žilna otpornost u bubrezima (koja je gotovo dvostruko viša nego u normotenzivnih štakora) posljedica je aktivne vazokonstrikcije koja se može ukloniti infuzijom nitroprusida. Pokusi s ANG-om II i saralazinom (blokator ANG II receptora) pokazali su 50-postotno smanjenje žilnog otpora nakon blokade receptora ANG II (80). Vrijednosti renina u GH štakora su normalne pa se smatra kako poremećaj RAAS-a ipak nije glavni pokretač hipertenzije. Poremećaj autonomnog živčanog sustava ima stanovitu ulogu u razvoju hipertenzije kod GH štakora, ali se ne smatra nužnim etiološkim čimbenikom (80). Na temelju rezultata pokusa s vazopresorima, smatra se da je ključni mehanizam hipertenzije u štakora GH poremećaj žilnih glatkih mišića (80).

Iako su prvi stvoreni, GH nažalost nisu uspjeli postići popularnost među istraživačima kao npr. štakori Dahl SS ili SHR. Soj GH stvoren je nakon više godina križanja (oko petanest generacija) uz porast arterijskog tlaka oko 2-3 mmHg po generaciji, za razliku od štakora SS ili SHR koji su postali hipertenzivni unutar prvih 4-5 generacija (<http://rgd.mcw.edu>). Zbog toga se pretpostavlja da hipertenzija u štakora GH nije uzrokovana poremećajem jednog „velikog“ gena, nego je posljedica

zajedničkog djelovanja više gena (između 10 i 100) pa su štakori GH vjerojatno kompliciraniji nego ostali hipertenzivni modeli.

Lyonski soj hipertenzivnih štakora (LH) je karakteriziran povišenom razinom kolesterola, fosfolipida i triglicerida, povišenim omjerom glukoze i inzulina, hipertenzijom sa sniženim razinama renina, hipertrofijom miokarda te kraćim životnim vijekom (81). Nadalje, LH model je porijeklom i fenotipski sličan GH modelu o čemu će više riječi biti nešto kasnije u ovoj disertaciji.

Unatoč složenosti, štakori GH su dobar hipertenzivni model jer vjernije prikazuju humanu hipertenziju za koju se također pretpostavlja da je prije posljedica niza promjena u većem broju „manjih“ gena, nego velikih promjena u jednom ili nekoliko gena.

#### *1.3.4. Pozicijsko kloniranje gena*

U procesu pozicijskog kloniranja (eng. positional cloning) postoji detaljno razrađena strategija (82). Ukratko, prvi je korak detekcija odnosno kartiranje QTL-a (eng. quantitative trait locus – područje kvalitativnog obilježja) nakon izrade rekombinantne genske karte. Genska karta se dobije na temelju rezultata genotipiziranja i fenotipiziranja F2 životinja nastalih križanjem normalnih (zdravih) i onih s ekstremnim, željenim fenotipom (npr. hipertenzijom). Životinje se fenotipiziraju i genotipiziraju velikim brojem polimorfnih genskih biljega na jednakim udaljenostima u cijelom genomu. Taj se postupak naziva skeniranje genoma. Prednost takvog pristupa je u tome što se pretražuje cijeli genom te se smanjuje mogućnost preskakanja nekog dijela genoma koji može nositi važan gen.

Detekcija QTL-a sastoji se u upisivanju fenotipa na rekombinantnu gensku kartu, što je prvi korak u procesu otkrivanja gena. Mjerna jedinica za rekombinantne genske karte je 1 cM (centiMorgan), a odgovara jednoj rekombinaciji na 1000

promatranih mejoza. 1cM veličinom odgovara otprilike 2 Mbp ( $10^6$  nukleotida) u štakorskom, odnosno 1Mbp u humanom genomu, zbog različite učestalosti rekombinacija. Izračunana ukupna veličina štakorskog genoma malo varira, ovisno o soju štakora te se kreće oko  $3,0 \times 10^9$  nukleotida ili 1800 cM. Veličina humane genske karte je oko  $3,2 \times 10^9$  nukleotida ili oko 3000 cM (83).

Kako bi rezultati upisivanja QTL-a bili što točniji i precizniji, nužno je dobiti rekombinantnu gensku kartu sa što gušće postavljenim biljezima. To se postiže genotipiziranjem velike populacije F2 ( $N \sim 300$ ) genskim biljezima raspoređenim na svakih 5 do 10 cM (84). Kad se područje QTL-a dovoljno suzi (obično na 10-ak cM) i potvrdi ponovljenim analizama povezanosti, slijedi kreiranje konsomičnih ili kongeničnih životinja.

Kongenične i konsomične životinje su novi sojevi genetički modificiranih životinja dobivenih posebnom strategijom križanja. Rekombinantne životinje (generacija F1) dobivene križanjem dvaju čistih sojeva (najčešće „bolesni“ i „zdravi“) ponovno se križaju s roditeljem (obično muški potomci s majkom – eng. backcross) u svrhu dobivanja soja koji ima ciljani dio genoma jedne vrste na genomu druge, odnosno umetnut „bolesni“ segment na „zdravom“ genomu ili obrnuto (85-87). Kod kongenične životinje, obično odabrani segment sadržava QTL (88), dok je kod konsomičnih životinja odabrani segment cijeli kromosom (89). Ako odabrani dio genoma sadržava gen(e) odgovoran za ciljani fenotip, kongenični ili konsomični štakori trebali bi imati željeni fenotip.

U idealnim uvjetima trebalo bi kreirati kongenične ili konsomične životinje na dva načina: „bolesni“ QTL na zdravoj genskoj pozadini te „zdravi“ QTL na bolesnoj pozadini. U ovom potonjem slučaju, zdravi QTL trebao bi „izliječiti“ ciljani fenotip. Sljedeći je korak sužavanje intervala QTL-a, tj. stvaranje preklapajućih supkongeničnih štakora u svrhu identifikacije najmanjeg dijela genoma koji uzrokuje

željeni fenotip. Obično je to oko 1cM, no u nedavnim pokusima Garrett i Rapp (90) uspjeli su smanjiti kongeničnu regiju na samo 200 kb. Posljednji je korak analiza genomske sekvencije kongeničnog područja uz pomoć genomskih pretraživača. Nastoji se otkriti nekoliko gena kandidata kojima se određuje struktura i sekvencija, razina izražaja te se nastoje pronaći moguće interakcije s drugim genima unutar genoma.

Na kraju procesa pozicijskog kloniranja formira se transgenični štakor ili miš koji mora pokazati biološku aktivnost željenoga gena. Taj se proces naziva fenotipsko oslobađanje (engl. phenotype rescue).

## 2. CILJ DISERTACIJE

Ciljevi disertacije su:

- a) Otkriti područja genoma odgovorna za hipertenziju i pridružene fenotipove kod štakora GH.
- b) Stvoriti kongenične sojeve zamjenom dijela genoma zdravog soja (BN) dijelom genoma bolesnog (u ovom slučaju QTL-a za hipertenziju) kao temeljni korak u pozicijskom kloniranju gena.
- c) Procijeniti nadzor arterijskog tlaka, eventualni razvoj hipertenzije te prohipertenzivne subfenotipove kod novostvorenih kongeničnih životinja.

Temeljni je cilj istraživanja odrediti kako odabrani dio genoma štakora GH na zdravoj pozadini utječe na bazalne vrijednosti arterijskog tlaka, biokemijske i hormonske pokazatelje, reakciju organizma na potentne vazopresorne lijekove (angiotenzin II- ANG II i noradrenalin - NA) te na blokadu sinteze dušičnog oksida s N-nitro L-arginin metil esterom (L-NAME), kod novostvorenih, genetički modificiranih sojeva štakora.

Pokušaj rasvjetljavanja etiologije hipertenzije temelji se na općeprihvaćenim strategijama pozicijskog kloniranja, s posebnim naglaskom na stvaranje i karakteriziranje kongeničnih štakora BN.GH, genetički modificiranih pokusnih životinja. Može se pretpostaviti da će, ako geni smješteni unutar željenih QTL-a imaju važan utjecaj na arterijski tlak, novostvoreni sojevi imati povišen tlak u odnosu na normotenzivne prethodnike BN te da će i prohipertenzivni subfenotipovi, ako ključni geni prebivaju u istom QTL-u, biti promijenjeni i ići prema vrijednostima u štakora GH.

Iako su novonastali štakori više od 99% genski identični s normalnim štakorima BN, može se pretpostaviti da će neki od subfenotipova biti drukčiji te da će opažene razlike pomoći u otkrivanju ključnih gena. Na taj bi se način mogle dodatno pojednostaviti genske interakcije unutar hipertenzivnog modela, identificirati ograničen broj gena kandidata te se primaknuti rješenju genske etiologije hipertenzije.



### 3. TVORIVA I POSTUPCI

#### 3.1. Otkrivanje QTL-a za hipertenziju u štakora GH

**Fenotipiziranje.** Štakori korišteni za upisivanje QTL-a dobiveni su križanjem triju parova mužjaka GH i ženki BN te dvaju parova mužjaka BN i ženki GH (recipročno križanje). Unutar generacije F1 slučajnim su odabirom križani braća i sestre (engl. intercross) da bi se u konačnici dobilo ukupno 205 štakora F2 obaju spolova. Fenotipiziranje je provedeno na 107 mužjaka u dobi od 17 do 19 tjedana. Korištena je indirektna metoda mjerenja arterijskog tlaka s pomoću manšete. Tlak se mjerio tri puta na tjedan te su na kraju izračunane njegove srednje vrijednosti. Nakon toga, operativnim je zahvatom uveden intraarterijski kateter, te je kod svakog štakora određena vrijednost direktnog arterijskog tlaka i srčane frekvencije. Nakon završetka pokusa štakori su eutanazirani te je kod svih izmjerena tjelesna masa i masa lijeve klijetke.

**Genotipiziranje.** DNK je ekstrahirana iz vrhova repa kod svih životinja standardnom metodom (91). Zatim je razrijeđena na radnu koncentraciju od 5 ng/ $\mu$ l u sterilnoj, destiliranoj vodi. Genotipiziranje je obavljeno P<sup>32</sup> genskim biljezima kao što je prije opisano (92).

**Stvaranje rekombinantne genske karte i upisivanje QTL-a.** Genom štakora GH je skeniran uz pomoć 260 SSLP biljega (engl. simple sequence length polymorphism) s prosječnom gustoćom 5,6 cM između biljega, kod 68 biološki najraznolikijih F2 životinja (štakori s oba kraja Gaussove distribucije arterijskog tlaka). Inicijalnom analizom određena su mjesta mogućih QTL-a, koja su onda potvrđena genotipiziranjem preostalih 39 životinja dodatnim biljezima u područjima interesa. Prije analize povezanosti, Komogorov-Smirnovljevim testom testirana je distribucija fenotipova (93). Fenotipovi koji nisu bili normalno distribuirani transformirani su

logaritamski radi postizanja normalne distribucije. Fenotipovi s normalnom distribucijom inicijalno ili nakon transformiranja analizirani su parametarskom analizom povezanosti (85, 94). Fenotipovi koji nisu bili normalno distribuirani i nakon transformacije, podvrgnuti su neparametarskoj analizi povezanosti pri čemu su korišteni početni, netransformirani podaci (95). Tako se smanjuje rizik lažno pozitivnih rezultata udruženih s analizom povezanosti, kako su predložili Kruglyak i sur. (94, 95). Od osam fenotipova, koliko ih je mjereno u populaciji F2, jedino je hipertrofija lijeve klijetke analizirana neparametarski.

Analiza povezanosti i detekcija QTL-a napravljena je kompjutorskim programom MapMaker/EXP s pomoću kojeg su prvo složene genske karte, a nakon toga je korišten MapMaker/QTL za povezivanje fenotipova s genskim biljezima, tj. za detekciju QTL-a kako je prethodno opisano (96, 97).

Za parametarsku analizu povezanosti određen je sugestivni prag povezanosti ( $LOD > 2,8$ ) te značajni prag povezanosti ( $LOD > 4,3$ ) (85, 94). Kod neparametarske analize prihvaćene su kao značajne vrijednosti  $Z > 3,5$  (85). U prethodnim je studijama, uz sličan broj populacije F2 i 20 puta više fenotipova, rađeno permutacijsko testiranje koje je potvrdilo da su navedene značajnosti odgovarajuće i točne (93). Web QTL, bioinformatički alat razvijen za potrebe laboratorija, korišten je za vizualizaciju i sumiranje rezultata povezanosti.

### **3.2. Kongenični štakori BN.GH**

Stvaranje kongeničnih štakora započelo je u Novom Zelandu da bi se u toku procesa, a zbog finansijskih problema, radovi prebacili u Sjedinjene Američke Države. Prvo su štakori uvezeni u Charles River Laboratories, radi embrijske

rederivacije carskim rezom, a zatim na Medical College of Wisconsin u Milwaukeeju, gdje i danas obitavaju.

U stvaranju kongeničnih životinja korištena je standardna strategija genotipiziranjem potpomognutog križanja (87) tako da su genotipiziranjem određivani genski biljezi koji su pokrivali 99-postotni interval pouzdanosti svakog od hipertenzivnih QTL-a, a kako bi se obuhvatili svi geni odgovorni za hipertenziju u svakom QTL-u. Kongenični štakori su derivirani od jedne generacije F1 dobivene križanjem štakora GH/Omr i BN/EIh, odabirući za buduće križanje sa ženkom BN samo one mužjake F1 koji su bili heterozigotni u području QTL-a i uz to su imali najveći broj homozigotnih alela u preostalom dijelu genoma. Taj se postupak ponavljao tijekom 10 generacija dok se nije potpuno fiksirao ostatak genoma i postao BN u svemu osim umetnutog segmenta. Na kraju su križani braća i sestre iz zadnje generacije (F10) kako bi željeni segment genoma postao homozigotan.

Veličina ubačenih segmenata na kraju je određena uz pomoć dodatnih 112 genskih biljega pravilno distribuiranih duž genoma. Nakon završetka procesa, kongenični su štakori održavani križanjem između braće i sestara tijekom 6 do 8 generacija prije fenotipiziranja.

Tim su procesom selekcije stvorena tri nova soja kongeničnih štakora, i to GH.BN2, GH.BN6 i GH.BN18. Ti štakori imaju ciljana područja genoma hipertenzivnih štakora GH za koja se pretpostavlja da sadržavaju ključne gene odgovorne za nastanak hipertenzije, dok je cjelokupan ostatak genoma BN, tj. normotenzivan. Tako BN.GH2 sadržava QTL na kromosomu 2, BN.GH6 QTL na kromosomu 6, a BN.GH18 QTL na kromosomu 18 štakora GH.

### 3.3. Protokol za određivanje fenotipa kongeničnih štakora BN.GH

Svi su pokusi izvedeni na pet skupina u kojima je bilo 10-12 mužjaka u dobi od 18 tjedana i mase 250-350 g. Štakori su bili hranjeni standardiziranom komercijalnom hranom za štakore s normalnom koncentracijom NaCl (Teklad, kataloški broj 3075S, 0.4% NaCl, Indianapolis, SAD) bez ikakvih restrikcija.

Štakori su podijeljeni u skupine ovisno o pasmini, i to kako slijedi: **skupina 1** = štakori BN (normotenzivna kontrola), **skupina 2** = štakori GH (hipertenzivna kontrola) te **skupine 3, 4 i 5** = kongenični štakori BN.GH2, BN.GH6 i BN.GH18. Sve navedene pokuse odobrio je Animal Care Committee of Medical College of Wisconsin, Milwaukee, SAD.

Štakori su bili anestezirani mješavinom ketamina (Ketaject 40 mg/kg), ksilazina (Xyla-Ject 2,5 mg/kg) i acepromazina (Acepromazine Maleate Injection 0,6 mg/kg). Svi navedeni lijekovi proizvedeni su u tvrtki Phoenix Scientific Inc., St. Joseph, MO, SAD. Cijelo vrijeme operacije električnim im je grijačem održavana tjelesna temperatura od 37°C. Preparacijom lijeve femoralne arterije uveden je mikrorenatanski kateter u abdominalnu aortu za mjerenje arterijskog tlaka. Drugi mikrorenatanski kateter je postavljen u donju šuplju venu preko desne femoralne vene za iv. injiciranje i testiranje vazoaktivnim lijekovima. Nakon zatvaranja rane veterinarskim ljepilom i šavovima, kateteri su potkožno provučeni do stražnjeg područja vrata kroz metalnu oprugu koja ih je štitila od trganja ili lomljenja. Opruga je zatim učvršćena za metalni rotor koji je životinjama omogućavao neometano kretanje.

Svim je štakorima poslije operacije dan enrofloksacin (Baytril 10 mg/kg sc.) u svrhu prevencije infekcije te buprenorfin (Buprenex 0,1 mg/kg sc.) za prevenciju postoperacijskih bolova. Nakon operacije, slijedio je sedmodnevni oporavak štakora uz njihov svakodnevni nadzor. U slučaju bolova ili infekcije štakorima su davane

dodatne doze analgetika ili antibiotika. Za vrijeme oporavka štakora, kateteri su svakodnevno nadzirani te ispirani heparinom razrijeđenim u fiziološkoj otopini (1000 ij/100 ml).

Nakon oporavka, štakorima je arterijski tlak mjereno prema sljedećem protokolu :

1. prva tri dana mjerio se sistolički (SBP), dijastolički (DBP) i srednji arterijski tlak (MAP) te srčana frekvencija (HR) tijekom 4 uzastopna sata dok su se štakori slobodno kretali u svojim kavezima.
2. četvrti dan mjerio se SBP, DBP, MAP i HR tijekom kontinuirane infuzije otopine ANG II, i to s 4 različite koncentracije, svaka u trajanju od 15 minuta (D1 = 5 ng/kg/min, D2 = 10 ng/kg/min, D3 = 25 ng/kg/min i D4 = 50 ng/kg/min).
3. peti dan mjerio se SBP, DBP, MAP i HR tijekom kontinuirane infuzije otopine NA, i to s 4 različite koncentracije, svaka u trajanju od 15 minuta (D1 = 0,1 µg/kg/min, D2 = 0,2 µg/kg/min, D3 = 0,5 µg/kg/min i D4 = 1,0 µg/kg/min).
4. šesti dan mjerio se SBP, DBP, MAP i HR nakon iv. bolusa fenilefrina u 4 različite doze, dajući novu dozu iv. svakih 10 minuta, a u svrhu procjene osjetljivosti barorefleksa (D1 = 0,5 µg/kg, D2 = 1 µg/kg, D3 = 2 µg/kg i D4 = 4 µg/kg).
5. sedmi dan mjerio se SBP, DBP, MAP i HR nakon iv. bolusa L-NAME (blokator sinteze NO) u 4 različite doze, dajući novu dozu iv. svakih 30 minuta (D1 = 0,5 mg/kg, D2 = 1 mg/kg, D3 = 5 mg/kg i D4 = 10 mg/kg). Nakon zadnje doze, arterijski tlak se pratio dodatnih 2,5 sati.

Svi su lijekovi (ANG II, NE, L-NAME, fenilefrin) nabavljeni od tvrtke Sigma (Sigma Inc., St. Louis, MO, SAD) i primijenjeni pomoću infuzijskih pumpi tvrtke Harvard Apparatus Inc. (Holliston, MA, SAD). Na kraju pokusa životinje su eutanazirane

ugljičnim dioksidom, a njihovo tkivo i krv uzeti su za dodatne analize. Tkivo (srce, bubrezi i aorta) je uklopljeno u parafin i obojeno hematoksilinom za histološke pretrage. Prije uklapanja u parafin, tkivo je izmjereno radi dobivanja podataka o masi pojedinih organa. Bilježeni su:

1. tjelesna masa (g)
2. masa bubrega (g)
3. masa srca (g)
4. relativna masa bubrega (masa bubrega podijeljena s tjelesnom masom)
5. relativna masa srca (masa srca podijeljena s tjelesnom masom)

### **3.4. Mjerenje arterijskog tlaka**

Kateteri su bili spojeni na kompjutorizirane preobličivače podražaja (engl. transducers) tvrtke Argon Medical Technologies, Athens, TX, SAD) i podaci su skupljani na frekvenciji od 300 Hz tijekom 4 sata na dan, snimajući tražene pokazatelje svake sekunde. Iz tih je podataka naknadno izračunana dnevna srednja vrijednost za svaku pojedinu životinju.

### **3.5. Mjerenje učinka ANG II, NA i L-NAME-a**

Mjerenje promjene arterijskog tlaka pri infuziji vazoaktivnih lijekova (ANG II i NA) provodilo se na sličan način, kontinuirano tijekom infuzije, s tim da se uzelo u obzir samo zadnjih 5 minuta primjene svake pojedinačne doze lijeka kako bi se eliminirale moguće pogreške zbog mrtvog prostora, različite duljine katetera te brzog metaboliziranja lijekova.

Snimanje arterijskog tlaka tijekom primjene svakog bolusa L-NAME-a bilo je nakratko prekinuto, a iz rezultata mjerenja arterijskog tlaka preostalih pola sata do idućeg bolusa izračunane su srednje petominutne vrijednosti.

### **3.6. Procjena osjetljivosti baroreceptora**

Procjena osjetljivosti baroreceptora temeljila se na mjerenju promjene srčane frekvencije uzrokovane naglim porastom arterijskog tlaka. Nakon preliminarnih rezultata dobivenih ANG-om II, za dodatnu su procjenu korišteni bolusi fenilefrina. Bilježene su vrijednosti arterijskog tlaka i srčane frekvencije svake sekunde tijekom pet minuta nakon svakog bolusa fenilefrina, odnosno sve dok se vrijednosti arterijskog tlaka i srčane frekvencije nisu vratile na početne vrijednosti. Iz rezultata mjerenja izračunani su  $\beta$ -koeficijenti za svaku promatranu životinju.

### **3.7. Mjerenje biokemijskih pokazatelja i tireoidnih hormona u krvi**

U epruvete je uzeto 2 ml krvi i centrifugirano 20 min na 2800 okretaja u minuti s pomoću centrifuge tvrtke Beckman (Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA, SAD). Serum je poslan na određivanje biokemijskih parametara na uređaju Hitachi 911. Za određivanje vrijednosti T3 korištena je metoda radioimunoeseja (engl. RIA), dok su vrijednosti T4 određene s pomoću enzimskog imunoeseja (engl. ELISA) u Marshfield Laboratories, Marshfield, WI, SAD.

### **3.8. Statistička analiza**

Sve su vrijednosti izražene kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna greška aritmetičke sredine. Bazalne vrijednosti parametara arterijskog tlaka kao i vrijednosti dobivene stimulacijom vazoaktivnim lijekovima provjerene su testom ANOVA za ponovljene vrijednosti te Bonferronijevom korekcijom t-testa (multiple usporedbe s kontrolnom skupinom) (SigmaStat Inc, verzija 2.03; SPSS Inc., Chicago, IL, SAD).

Iz podataka dobivenih primjenom NA, ANG-a II, L-NAME-a i fenilefrina izračunani su jednadžbama linearne regresije  $\beta$ -koeficijenti nagiba pravca (engl. slope coefficients) za svaku pojedinu životinju kao što je prethodno opisano (98, 99),

uz izračun srednje vrijednosti  $\beta$ -koeficijenta za svaku pojedinu skupinu. Razlike među skupinama testirane su testom ANOVA za ponovljena mjerenja te Bonferronijevom korekcijom t-testa.

Statistička značajnost razlika vrijednosti biokemijskih pretraga i hormona štitnjače testirana je Studentovim t-testom. Signifikantnim su smatrane vrijednosti  $p < 0,05$ .



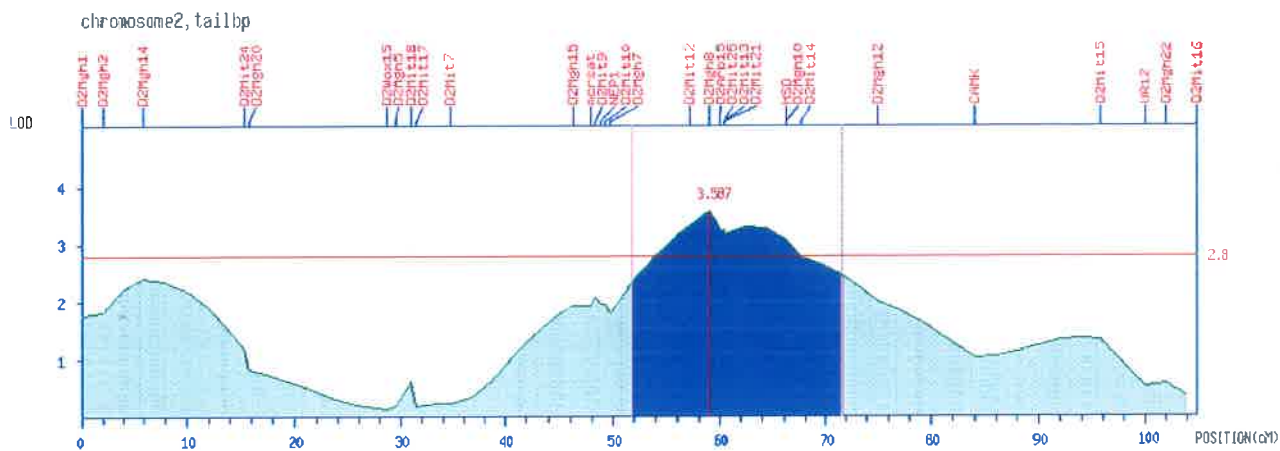
## 4. REZULTATI

### 4.1. Rezultati kartiranja QTL-a kod štakora GH

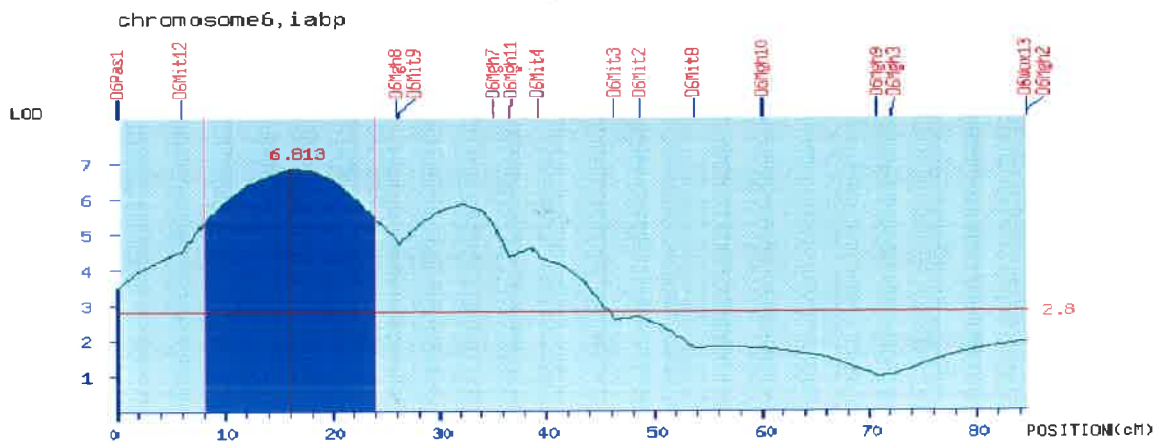
U analizama povezanosti lokalizirana su tri važna područja genoma (QTL) kod štakora GH na kromosomima 2, 6 i 18 za koja se smatra da su uključeni u regulaciju arterijskog tlaka. Osim toga, otkriveno je i sedam različitih QTL-a, i to za tjelesnu masu (na kromosomu 3), za masu lijeve klijetke (na kromosomima 3 i 13), za masu lijeve klijetke korigirane s tjelesnom masom (na kromosomu 10), za masu cijelog srca (na kromosomu 10) te za srčanu hipertrofiju (na kromosomu 10). Na slici 5. prikazan je QTL na kromosomima 2, 6 i 18, a u tablici 2. utvrđeni QTL-i u muškoj populaciji štakora GH.

Slika 5. QTL za arterijski tlak na kromosomima 2, 6 i 18.

#### Kromosom 2 QTL



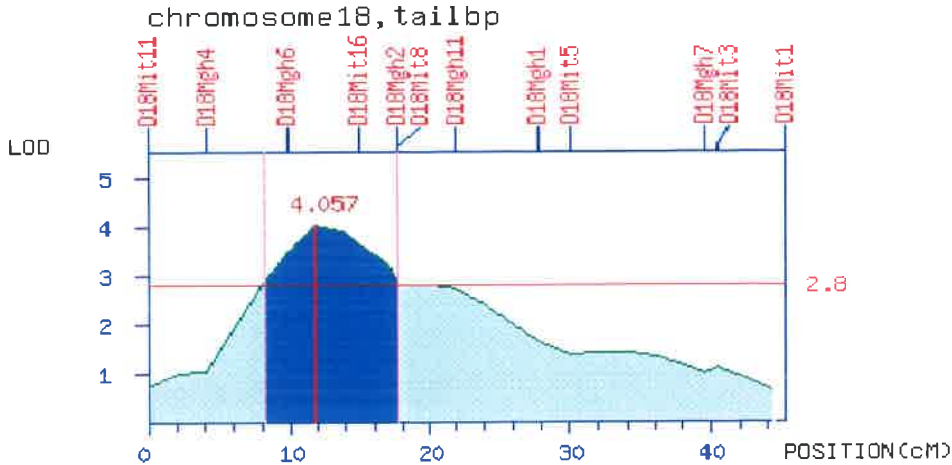
## Kromosom 6 QTL



QTL ANNOTATOR V1.1  
Copyright 1998, 1999, Informatic Research Center  
Medical College of Wisconsin

Sun Nov 21 12:34:30 CST 2004

## Kromosom 18 QTL



QTL ANNOTATOR V1.1  
Copyright 1998, 1999, Informatic Research Center  
Medical College of Wisconsin

Sun Nov 21 12:34:48 CST 2004

*Apscisa označava udaljenost na kromosomu izraženu u cM, a ordinata vrijednost*

*LOD. Značajnim su uzete vrijednosti LOD > 2,8. Područje ograničeno okomitim*

*crtama i tamnije obojeno je 99-postotni interval pouzdanosti.*

Tablica 2. QTL-i dobiveni analizom populacije F2 štakora GH i BN

QTL	Fenotip	Krom.	Granični biljeg 1	Granični biljeg 2	LOD*	Vršni biljeg
1.	Arterijski tlak – indirektni (mmHg)	2	D2Mgh7	D2Mgh12	3,58	D2Mgh8
2.	Arterijski tlak – indirektni (mmHg)	6	D6Mit12	D6Mit3	4,30	D6Mit9
3.	Arterijski tlak – indirektni (mmHg)	18	D18Mgh4	D18Mgh2	4,05	D18Mgh6
4.	Masa lijeve klijetke (mg)	3	D3Mgh21	D3Mgh2	4,63	D3Mit4
5.	Masa lijeve klijetke (mg)	13	D13Mgh13	D13Kid1	4,12	D13Arb7
6.	Arterijski tlak - direktni (mmHg)	6	D6Pas1	D6Mit3	4,80	D6Mit9
7.	Tjelesna masa (g)	3	D3Mgh21	D3Mgh2	5,19	D3Mit4
8.	Masa lijeve klijetke korigirana s tjelesnom masom (mg/g)	10	D10Mit6	D10Mgh11	3,03	D10Mit5
9.	Masa cijelog srca (mg)	10	D10Mit6	D10Mgh8	2,95	D10Mit5
10.	Hipertrofija lijevog srca**	10	D10Mit6	D10Mit7	4,55	D10Mgh8

\* najveća izračunana vrijednost LOD

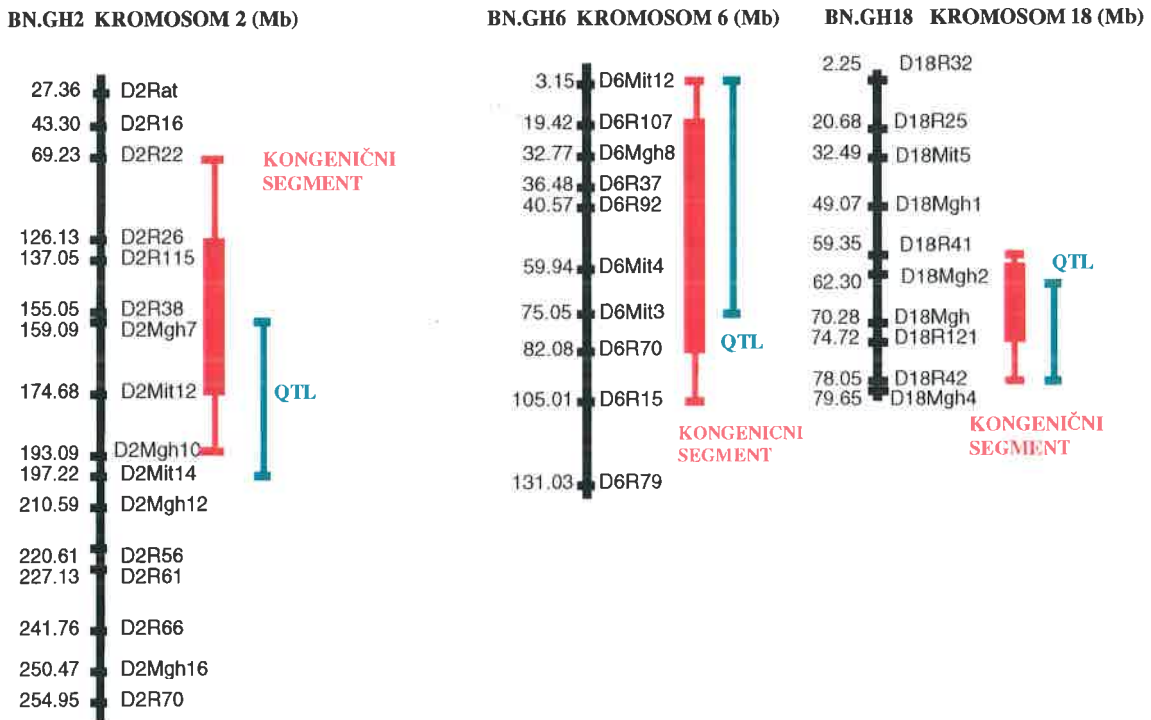
\*\*masa lijeve klijetke podijeljena s masom cijelog srca

#### 4.2. Rezultati genotipiziranja kongeničnih štakora BN.GH

Kako bi se potvrdilo da su kongenični štakori izogenični, tj. da sadržavaju cijeli genom, uz pomoć 112 polimorfni biljega (otprilike 1 biljeg svakih 20 cM) skeniran je cijeli genom kongeničnih životinja. Niti jedan biljeg nije pokazao alel GH u nekongeničnom dijelu, potvrđujući da pozadinski genom kongeničnih sojeva u najvećem dijelu potječe od štakora BN. Kongenične regije su genotipizirane uz pomoć biljega na svakih 8-10 cM. Na temelju genotipiziranja te identifikacije pozicije svakog od pojedinih biljega na genomu štakora uz pomoć dostupne sekvencije cjelokupnog štakorskog genoma (100), veličine regija QTL-a na kromosomima 2, 6 i 18 približno su procijenjene na 127,7 Mb, 101,9 Mb te 20,3 Mb (slika 6.).

Kod svih kongeničnih štakora "uhvaćen" je kompletan 99-postotni interval pouzdanosti QTL-a (osim u BN.GH2 zbog krivog položaja jednog od graničnih biljega u prethodnim, starijim i manje točnim genskim kartama). Područje QTL-a koje nije obuhvaćeno u štakoru BN.GH2 iznosi oko 14 Mb.

**Slika 6. Rekombinantne genske karte modificiranih kromosoma.**



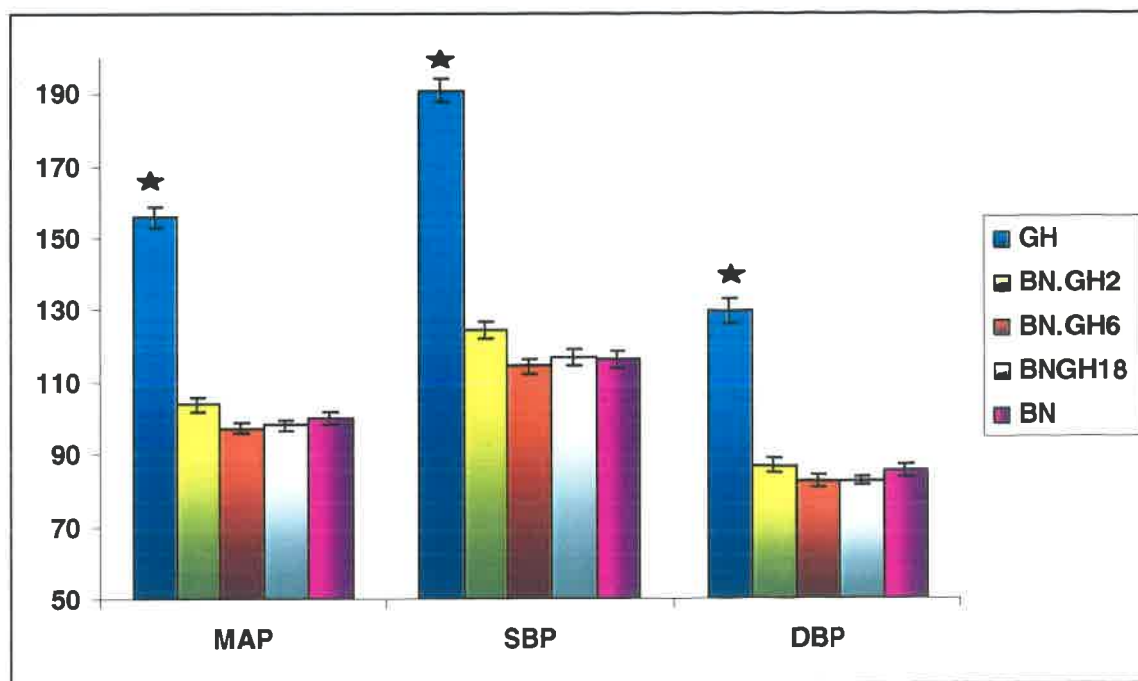
*Kromosom 2 kod BN.GH2, kromosom 6 kod BN.GH6 i kromosom 18 kod BN.GH18 s pripadajućim QTL-om te umetnutim područjima genoma GH. Pravokutnici označavaju potvrđena kongenična područja, a crtama su označena moguća kongenična područja. Brojevi označavaju udaljenost biljega u Mb.*

### 4.3. Rezultati mjerenja arterijskog tlaka

Bazalni arterijski tlak je mjereno u svim skupinama, a rezultati su predočeni na slici 7. Ni jedan od tri kongenična soja nije pokazao različite pokazatelje arterijskog tlaka (SBP, DBP, MAP) u odnosu na normotenzivne štakore BN, mada su svi imali „umetnuti“ QTL za hipertenziju.

Štakori GH, kao što se moglo i očekivati, imaju statistički značajno povišene vrijednosti arterijskog tlaka u odnosu na kontrolne štakore BN. Za razliku od arterijskog tlaka, srčana frekvencija je bila slična u svih promatranih sojeva.

**Slika 7. Srednji (MAP), sistolički (SBP) i dijastolički arterijski tlak (DBP) u ispitivanih i kontrolnih štakora**



Sve vrijednosti tlaka dobivene su direktnim mjerenjem, a izražene su u mmHg. Svaka skupina ima 10 -12 štakora.

★ $p < 0,05$  GH prema BN.

#### 4.4. Biometrijska mjerenja

Kako bi se procijenila oštećenja ciljanih organa u ispitivanih i kontrolnih štakora, mjerena je masa srca i bubrega (apsolutna te relativna masa, dobivena preračunavanjem na 100 g tjelesne mase), a rezultati tih mjerenja dani su u tablici 3.

Masa bubrega i relativna masa bubrega nije pokazala nikakvu razliku između kongeničnih skupina te kontrolnih štakora BN, što ne začuđuje jer se ti fenotipovi nisu ni kartirali u generaciji F2, niti su detektirani pripadajući QTL-i.

Štakori GH imaju značajno veću srčanu masu te relativnu srčanu masu u odnosu na štakore BN. Kongenične pasmine nisu ni ovim mjerenjima pokazale značajne razlike.

Tablica 3. Rezultati biometrijskih mjerenja

FENOTIP	GH	BN.GH2	BN.GH6	BN.GH18	BN
Masa bubrega	1,26 ± 0,02	1,28 ± 0,04	1,26 ± 0,02	1,26 ± 0,04	1,13 ± 0,03
Relativna masa bubrega	0,36 ± 0,1	0,40 ± 0,17	0,38 ± 0,12	0,40 ± 0,33	0,36 ± 0,16
Masa lijeve klijetke (LV)	1,68 ± 0,02*	1,22 ± 0,05	1,26 ± 0,03	1,14 ± 0,04	1,17 ± 0,03
Relativna masa LV	0,48 ± 0,14*	0,39 ± 0,2	0,34 ± 0,11	0,42 ± 0,16	0,38 ± 0,17
Tjelesna masa	356,4 ± 6,6	333,5 ± 8.1	298,4 ± 14,7	316,8 ± 9,5	313,9 ± 7,4

*Masa bubrega, masa lijeve klijetke i tjelesna masa izražene su u g, relativna masa bubrega te relativna masa srca izračunane su na 100 g tjelesne mase (g/100g).*

*\*p < 0,05 prema BN.*

#### 4.5. Rezultati biokemijskih i hormonalnih pretraga

Fenotipiziranje je uključilo mjerenje tireoidnih hormona te 18 rutinskih biokemijskih parametara krvi koji su bili sastavni dio panela pretraga ANP1. Pronađena je značajna razlika u nekih kongeničnih sojeva u nekoliko parametara, a što je predočeno u tablici 4.

*BN.GH2* imaju značajno povišene vrijednosti albumina, ureje te T3. Vrijednosti albumina i T3 su fenotipski bliže vrijednostima kod štakora GH, ali je ureja viša nego u obje kontrolne skupine.

*BN.GH6* štakori imaju značajno više vrijednosti ukupnih proteina i globulina nego kontrolni štakori BN.

Štakori *BN.GH18* imaju značajno više vrijednosti fosfora u odnosu na BN te višu koncentraciju ureje i kalija u odnosu na štakore BN i GH.



**Tablica 4. Izvod iz vrijednosti biokemijskih i hormonskih pokazatelja**

<b>POKAZATELJ</b>	<b>GH</b>	<b>BN.GH2</b>	<b>BN.GH6</b>	<b>BN.GH18</b>	<b>BN</b>
<b>Ukupni proteini g/l</b>	61,9 ± 0,9	63,0 ± 0,8	64,6 ± 1,7 *	58,9 ± 0,8	59,6 ± 0,9
<b>Albumini g/l</b>	34,0 ± 0,7	34,6 ± 0,5**	33,3 ± 0,4	32,4 ± 0,6	31,8 ± 0,5
<b>Globulini g/l</b>	27,9 ± 1,3	28,3 ± 0,4	31,3 ± 1,5 *	26,5 ± 0,6	27,8 ± 0,9
<b>Urea mmol/l</b>	5,96 ± 0,65	9,26 ± 0,25**	6,9 ± 0,42	6,96 ± 0,21 #	6,43 ± 0,5
<b>Fosfor mmol/l</b>	2,38 ± 0,04	1,92 ± 0,06	1,81 ± 0,05	2,13 ± 0,05 #	1,8 ± 0,06
<b>Kalij mmol/l</b>	4,94 ± 0,06	5,43 ± 0,12	5,11 ± 0,14	5,90 ± 0,09 #	5,35 ± 0,2
<b>T3 ng/l</b>	1094 ± 65	1193 ± 76**	767 ± 30,5	1038 ± 36	845 ± 80,4

*Predočene su samo osobitosti koje se razlikuju u kongeničnim životinja.*

*\*p < 0,05 BN.GH6 prema BN*

*\*\*p < 0,05 BN.GH2 prema BN*

*#p < 0,05 BN.GH18 prema BN.*

#### 4.6. Učinci L-NAME-a

Kako bi se procijenili učinci blokade dušikova oksida (NO) na arterijski tlak, kongeničnim i kontrolnim životinjama davane su četiri različite doze L-NAME-a i nakon toga im je izmjeren arterijski tlak. Rezultati su dani u tablici 5. i na slici 8. Iz rezultata su izračunani beta-koeficijenti uz pomoć linearne regresije kao što je prethodno opisano (98, 99).

Davanje L-NAME-a (inhibitor sinteze NO) uzrokovalo je značajan porast arterijskog tlaka u svih skupina, ali nije primijećena razlika između kongeničnih životinja i kontrole BN.

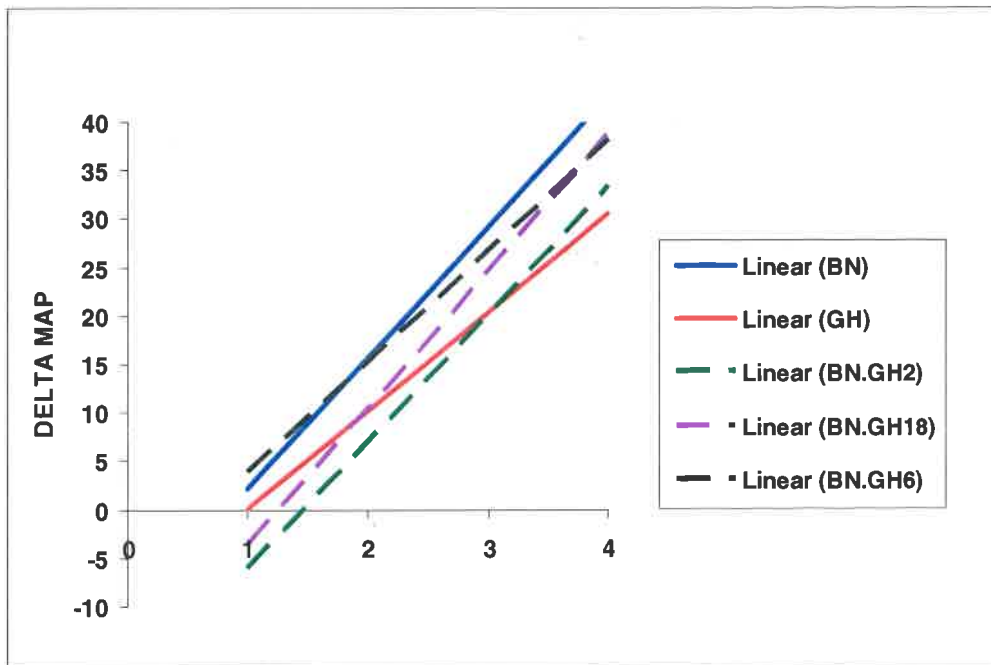
Tablica 5.  $\beta$ -koeficijenti uz NA, ANG II te L-NAME kod štakora BN, GH.BN2, GH.BN6 te GH.BN18

SOJ	NA	ANGII	L-NAME
BN.GH2	32,38 ± 3,03	0,37 ± 0,03 *	4,18 ± 0,32
BN.GH6	19,09 ± 2,86	0,44 ± 0,02	3,32 ± 0,40
BN.GH18	31,09 ± 3,27	0,38 ± 0,02 #	4,25 ± 0,42
BN	31,38 ± 3,74	0,51 ± 0,04	4,60 ± 0,19

\* $p = 0,001$  prema BN

# $p < 0,006$  prema BN.

**Slika 8. Učinci L-NAME-a**



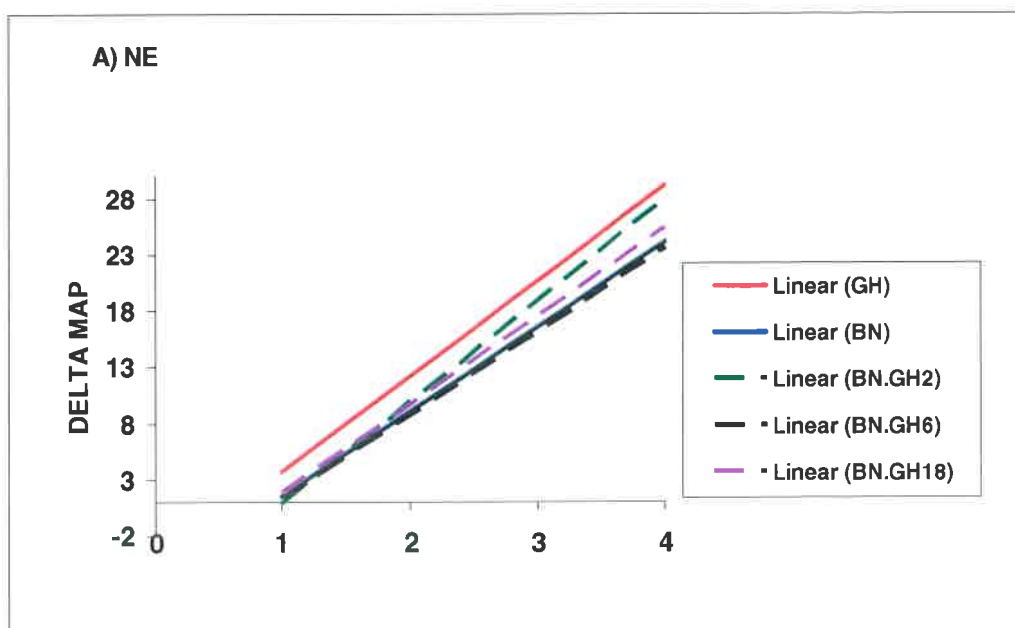
Slika prikazuje pravce linearne regresije za svaku od ispitivanih skupina. Apocisa označava različite koncentracije primijenjenog lijeka kako slijedi: 1 = 0,5 mg/kg, 2 = 1 mg/kg, 3 = 5 mg/kg, 4 = 10 mg/kg L-NAME-a. Ordinata označava promjenu vrijednosti srednjeg arterijskog tlaka nakon iv. primjene L-NAME-a.

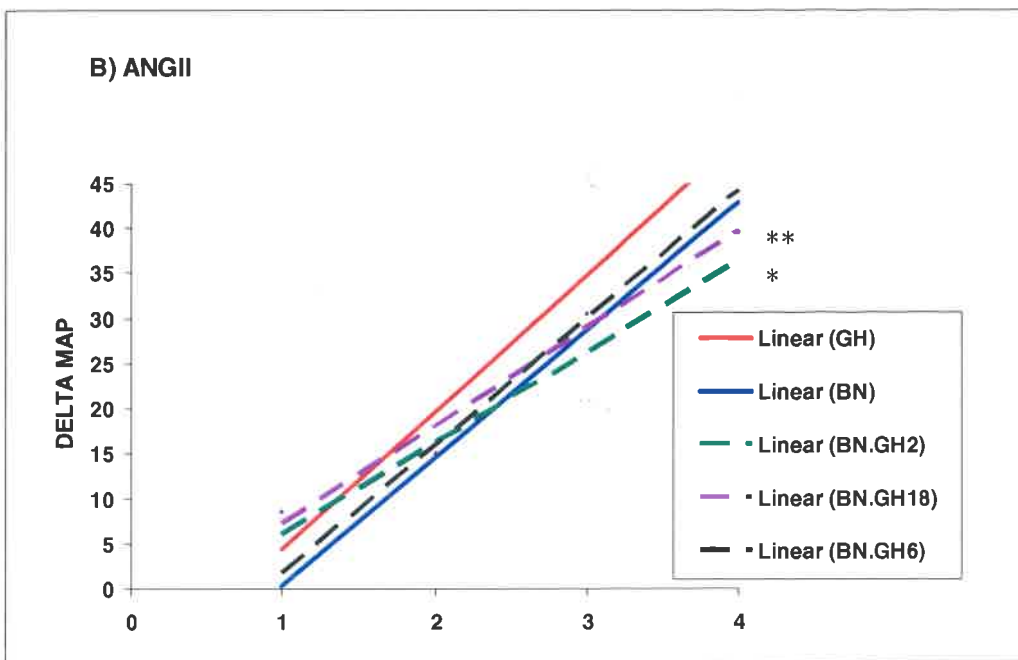
#### 4.7. Rezultati primjene NA i ANG-a II

Promjene u srednjem arterijskom tlaku za vrijeme davanja NA i ANG-a II analizirane su linearnom regresijom uz izračun vrijednosti  $\beta$ -koeficijenata, a predočene su u tablici 5. i na slikama 9.A (NA) i 9.B (ANG II).

Niti jedna od ispitivanih skupina nije pokazala značajnu razliku u odgovoru na NA, no dvije od tri kongenične pasmine, i to BN.GH2 i BN.GH18, pokazale su značajno različit  $\beta$ -koeficijent nakon primjene ANG-a II u usporedbi s kontrolom BN.

Slika 9. Promjene srednjeg arterijskog tlaka primjenom NA (A) i ANG-a II (B)





Na slikama su prikazani pravci linearne regresije za svaku od ispitivanih skupina životinja. Apscisa označava koncentracije primijenjenog lijeka kako slijedi: **A) NA:** 1= 0,1  $\mu\text{g/kg/min}$ , 2 = 0,2  $\mu\text{g/kg/min}$ , 3 = 0,5  $\mu\text{g/kg/min}$  i 4 = 1,0  $\mu\text{g/kg/min}$ . **B) ANGI II:** 1= 5  $\text{ng/kg/min}$ , 2 = 10  $\text{ng/kg/min}$ , 3 = 25  $\text{ng/kg/min}$  i 4 = 50  $\text{ng/kg/min}$ . Ordinata označava promjene srednjeg arterijskog tlaka između 10. i 15. minute infuzije. Promjena srednjeg arterijskog tlaka je značajno različita kod štakora BN.GH2 i BN.GH18 u usporedbi s kontrolom BN nakon primjene ANGI II.

\* $p < 0,05$  BN.GH2 prema BN

\*\* $p < 0,05$  BN.GH18 prema BN

#### 4.8. Osjetljivost baroreceptorskog refleksa

Nakon analize preliminarnih rezultata uočeno je kako štakori BN.GH18 imaju odgođeno refleksno smanjenje srčane frekvencije na nagli porast arterijskog tlaka, osobito nakon infuzije ANG-a II (slika 10.). To je potaknulo dodatna ispitivanja osjetljivosti baroreceptorskog refleksa bolusima fenilefrina u štakora BN.GH18, BN i GH. Odgovor srca na nagle promjene sistoličkog tlaka procjenjivan je mjerenjem srčane frekvencije kao indirektni pokazatelj osjetljivosti baroreceptorskog luka. Na kraju mjerenja izračunani su  $\beta$ -koeficijenti za svaku pojedinu životinju te za svaku skupinu (tablica 6.)

Objema je metodama nedvojbeno potvrđeno kako štakori BN.GH18 imaju značajno smanjenu osjetljivost baroreceptorskog refleksa na nagli porast arterijskog tlaka u odnosu na kontrolu BN.

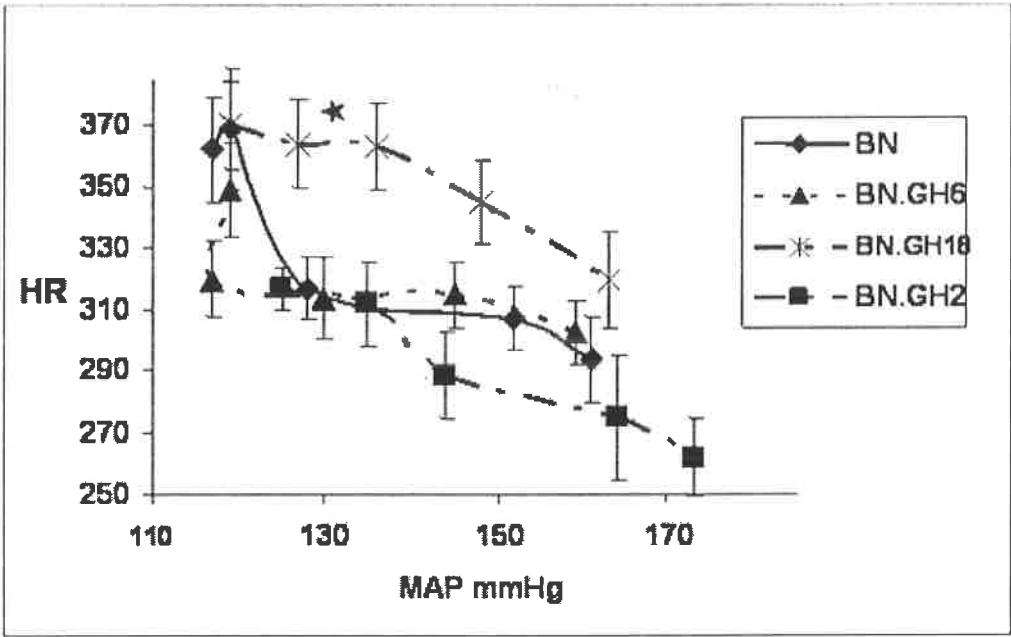
Tablica 6.  $\beta$ -koeficijenti baroreceptorskog odgovora na boluse fenilefrina

SOJ	FENILEFRIN
GH	$-0,87 \pm 0,25$ **
BN.GH18	$-1,25 \pm 0,17$ *
BN	$-2,28 \pm 0,26$

\*p < 0,005 prema BN.

\*\*p < 0,001 prema BN.

Slika 10. Krivulja osjetljivosti baroreceptora (odnos srčane frekvencije i srednjeg arterijskog tlaka nakon primjene ANG-a II kod kongeničnih štakora i kontrole BN)



Apscisa označava vrijednosti MAP, a ordinata promjene HR uzrokovane promjenama arterijskog tlaka nakon infuzije ANG-a II. Vidljiv je pomak krivulje osjetljivosti barorefleksa udesno uz promjenu nagiba u štakora BN.GH18.

\* $p < 0.05$  BN.GH18 prema BN

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Dosadašnji rezultati potrage za „hipertenzivnim“ genima

Dosadašnji rezultati potrage za genima, uzročnicima hipertenzije daleko su od priželjkivanih. Analize povezanosti unutar obitelji i među populacijama otkrile su brojne QTL-e locirane na gotovo svakom ljudskom kromosomu osim na 13 i 20, ali do danas, nažalost, nije uspješno pozicijski kloniran ni jedan „hipertenzivni“ gen. Slični su rezultati pokusa s hipertenzivnim modelima (opisani su QTL-i za hipertenziju na svakom kromosomu štakora i miša), koji iako pojednostavnjeni, nisu uspjeli dovesti do otkrića i pozicijskog kloniranja gena za hipertenziju.

FBPP, unatoč velikom broju uključenih ispitanika (njih više od 6200), nije uspio čak ni lokalizirati područje genoma odgovorno za hipertenziju. Vjerojatno je razlog negativnih rezultata u položaju, broju i ponašanju alela odgovornih za arterijski tlak jer su neravnomjerno raspoređeni unutar pojedinih rasa i etničkih skupina. Tako je FBPP uključio rezultate svih etničkih skupina u svrhu podizanja statističke moći, ali se time povećala heterogeničnost te reducirala biološka moć detekcije.

Trenutačno postoje dvije oprečne hipoteze o genskoj pozadini hipertenzije (30):

1.) *Hipertenzija je posljedica djelovanja čestih alela* (koji su evolucijski stariji, relativno učestali unutar populacije i sa značajnim utjecajem na arterijski tlak). Ta hipoteza sugerira relativno malu gensku heterogeničnost te omogućava korištenje analiza haplotipa i disekvilibrira povezanosti.

2.) *Hipertenzija je uzrokovana rijetkim alelima* (koji su evolucijski mlađi te su više specifični za pojedine etničke skupine).



Većina studija povezanosti, a osobito BRIGHT i FBPP, podupire drugu hipotezu. Naime, postoji oko 15 milijuna SNP-a u genomu čovjeka, a njih 50.000-100.000 locirano je unutar gena ili u njegovoj okolini tako da utječu na njihove funkcije odnosno izražaje (101). Gotovo 70% takvih alela ima u populaciji frekvenciju manju od 5% te se smatraju rijetkim i specifični su samo za etničke i rasne skupine (102). Halushka i sur. su u studiji na 75 gena kandidata za hipertenziju pronašli ukupno 874 SNP-a od kojih je 209 uzrokovalo promjenu redoslijeda aminokiselina u kodiranom proteinu. Svih 209 SNP-a imalo je obilježja evolucijski mlađih, rjeđih te populacijsko specifičnih SNP-a (103), što ide u korist drugoj hipotezi.

## 5.2. Lyonski hipertenzivni soj štakora

LH štakori su po svojim evolucijskom porijeklu, fenotipskim te genotipskim obilježjima slični GH štakorima (<http://rgd.mcw.edu/>). Oni imaju neke od karakteristika metaboličkog sindroma uključujući povšenu razinu kolesterola, fosfolipida i triglicerida, povšen omjer glukoze i inzulina, hipertenziju sa sniženim razinama renina, hipertofiju miokarda te kraći životni vijek (81). Zbog toga je odlučeno da se na njima provede pozadinsko istraživanje s ciljem dodatnog pojašnjenja geneze hipertenzije, određivanja sličnosti s GH modelom, identificiranja preklapajućih hipertenzivnih i biometrijskih QTL-a, određivanja prioritetnih područja genoma u oba modela radi stvaranja kongeničnih životinja te u svrhu otkrivanja zajedničkih gena kandidata.

Učinjena je kompletna analiza povezanosti i skeniranje genoma u F2 populaciji dobivenoj križanjem LH i LN štakora te su locirana područja odgovorna za 61 od 71 praćenih kardiovaskulnih, biometrijskih te hormonskih fenotipova na osam različitih kromosoma (1, 2, 3, 5, 7, 10, 13 i 17). Opisana su i tri ključna kromosoma s genima za regulaciju arterijskog tlaka u LH štakora, a to su 2, 13 i 17. Kromosom 17

je pokazao velike nakupine QTL uključenih u homeostazu arterijskog tlaka i metabolizma (81).

Usporedbom upisanih QTL-a kod LH štakora s rezultatima u GH štakora, nedvojbeno je ustanovljeno postojanje preklapajućih QTL-a odgovornih za regulaciju arterijskog tlaka na kromosomu 2. Isto tako je opaženo preklapanje drugih kardiovaskulnih QTL-a na kromosomima 10, 13 te tjelesne mase na kromosomu 3. Navedeni rezultati su potvrdili očekivanu sličnost oba modela.

Upisivanje QTL-a za hipertenziju na rekombinantnu genomsku kartu kromosoma 2 i njeno preklapanje s QTL-om u GH štakora, dovelo je do prioritiziranja te regije u daljnim istraživanjima. Kako su se upisani QTL-i kod GH štakora ipak nešto bolje preklapali s preliminarnim rezultatima analiza povezanosti hipertenzije i skeniranja genoma kod FBPP populacije bijelaca, odlučeno je da će prioritet imati stvaranje kongeničnih BN.GH štakora (posebice BN.GH2), nakon čega će se pristupiti stvaranju kongeničnih LH.LN štakora.

Određeni su i mogući geni kandidati na kromosomu 2 koji će se pratiti u daljnjim studijama. Ti geni su: *Npr1* (receptor natriuričnog peptida1), *Mme* (membranska metaloendopeptidaza) te *Agtr1b* (angiotenzinski receptor, tip1b).

Ukratko, rezultati navedenog pozadinskog istaživanja, koristeći sličan životinjski model, nedvojbeno su pomogli u potvrđivanju točnosti rezultata analiza povezanosti kod GH modela, u procesu identifikacije prioriternih regija na genomu GH štakora te pri odabiru gena kandidata.

### 5.3. Rezultati pokusa s kongeničnim štakorima BN.GH

#### 5.3.1. Analiza QTL-a za hipertenziju u štakora GH

Analiza povezanosti (engl. linkage analysis) nakon skeniranja genoma u populaciji štakora F2 dobivenih križanjem štakora GH i BN pokazala je nekoliko osobito važnih regija genoma štakora GH povezanih s hipertenzijom (QTL) na kromosomima 2, 6 i 18. Regije na kromosomima 3, 10 i 13 su pak pokazale povezanost sa srčanom masom/hipertrofijom te s tjelesnom težinom. Samo je kromosom 6 pokazao QTL za oba fenotipa arterijskog tlaka (arterijski tlak mjereno izravnom i neizravnom metodom) sa zajedničkim vršnim biljegom *D6Mit9*, dok su kromosomi 2 i 18 pokazali samo QTL za indirektno izmjereno arterijski tlak. Postoje najmanje dva obrazloženja za taj fenomen:

1.) vrlo je vjerojatno da različitim načinima mjerenja slične, ali ne potpuno iste fenotipove te da različiti dijelovi genoma imaju ključnu ulogu u homeostazi arterijskog tlaka pod različitim uvjetima (izravnim mjerenjem određujemo arterijski tlak pod relativno normalnim, fiziološkim uvjetima, dok posrednim načinom mjerenja vjerojatno utvrđujemo odgovor arterijskog tlaka na stres) te

2.) selekcija štakora za vrijeme stvaranja hipertenzivnih sojeva, kako GH tako i ostalih, temeljila se na neizravnim mjerenjima tlaka, što je dodatni razlog da je većina QTL-a povezana s posredno ustanovljenom hipertenzijom, umjesto izravnom ili objema metodama mjerenja.

U literaturi se može pronaći dosta QTL-a za hipertenziju koji se preklapaju s regijama opisanim kod štakora GH, pogotovo onih na kromosomima 2 i 18, što dodatno može poduprijeti hipotezu kako se u tim područjima ipak nalaze geni koji su odgovorni za hipertenziju jer su prisutni u više od jednog hipertenzivnog modela. Npr., kongenična regija kod BN.GH2 preklapa se s QTL-om pronađenim u drugim

životinjskim modelima, i to kod generacije F2 dobivene križanjem sljedećih sojeva: SHR x WKY; SHR x BN, SS x BN; LN x LH, SHR x BN; SHRSP x WKY; S x WKY te S x MNS (79). Kao što je već prethodno napomenuto, unutar kongenične regije nalazi se nekoliko interesantnih gena kandidata kao što su *Npr1* (receptor natriuričnog peptida 1), *Mme* (membranska metaloendopeptidaza) te *Agtr1b* (angiotenzinski receptor, tip 1b), a čija se moguća uloga u patogenezi hipertenzije treba još potvrditi (79).

Kongenična regija u BN.GH6 preklapa se s QTL-om otkrivenim u dva križanja: LEW/Nlco x SHR/Nlco (<http://rgd.mcg.edu>). Ta regija također sadržava nekoliko gena kandidata kao što su *Esr2* - estrogenski receptor beta te *RVCH* - štakorska žilna kimaza. Miš *Esr2* „knock out“ pokazuje značajnu arterijsku hipertenziju te oštećenu reprodukciju (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=601663>), dok je kod više sojeva hipertenzivnih štakora otkrivena pojačana aktivnost štakorske žilne kimaze. Kako su žilne kimaze odgovorne za stvaranje oko 80% ANG-a II u srcu te oko 60% ANG-a II u arterijama, za taj se gen opravdano može pretpostaviti da je važan u patogenezi hipertenzije (104).

Treća kongenična regija (kod BN.GH18) duga je oko 20,3 Mb te se preklapa s kardiovaskulnim QTL-om u dva različita križanja: SHR x BB/OK te BN x SS (93, 105). Osim brojnih kardiovaskulnih QTL-a koji su se kartirali na kromosomu 18, posebice QTL-i za hipertenziju osjetljivu na unos soli u štakora Dahl SS, Stoll i suradnici (93) opisali su i područje genoma odgovorno za osjetljivost baroreceptorskog refleksa koje se preklapa s navedenom kongeničnom regijom kod štakora BN.GH18.

### 5.3.2. Stvaranje kongeničnih sojeva

Nakon detekcije navedenih regija genoma štakora GH, pokrenut je proces kreiranja kongeničnih životinja. U idealnim uvjetima trebalo bi stvoriti obje vrste

životinja (kongenične i recipročno kongenične), tj. imati „bolesni“ QTL na zdravoj genskoj pozadini te „zdravi“ QTL na bolesnoj pozadini. U slučaju recipročno kongeničnih štakora, zdravi QTL trebao bi „izliječiti“ ciljani fenotip. Ako se uzme u obzir da je prosječno trajanje jedne generacije štakora tri do četiri mjeseca, lako se može izračunati da je potrebno dvije i pol do tri godine križanja (deset generacija) za stvaranje kongeničnih životinja, odnosno da je za svaki kongenični soj potrebno generirati i genotipizirati nekoliko tisuća štakora. Sve to čini proces križanja kongeničnih životinja veoma skupim i zahtjevnim, tako da se istraživači obično odlučuju za jednu vrstu kongeničnih ili konsomičnih životinja, ovisno o hipotezi i cilju istraživanja. U ovom je slučaju odabrana prva varijanta, tj. kreiranje životinja koje imaju dio hipertenzivnog genoma na zdravoj pozadini, a s ciljem isključenja učinka genomske pozadine, pojednostavnjenja složenog modela hipertenzije GH te otkrivanja i testiranja prohipertenzivnih subfenotipova (intermedijarnih fenotipova) sa svrhom ubrzanja procesa traženja gena.

Ukratko, navedenim procesima selektivnog križanja, stvorena su tri nova genetički modificirana soja: BN.GH-(D2Rat22-D2Mgh11)/Mcwi (**BN.GH2**); BN.GH-(D6Mit12-D6Rat15)/Mcwi (**BN.GH6**) te BN.GH-(D18Rat41-D18Mgh4)/Mcwi (**BN.GH18**) koja su korištena u svim daljnjim pokusima.

### *5.3.3. Arterijski tlak kod kongeničnih životinja*

Nakon analize rezultata mjerenja arterijskog tlaka kod kontrolnih i kongeničnih životinja, pronađeno je kako ni jedan od sojeva nema značajnijih promjena u vrijednostima arterijskog tlaka, što nedvojbeno upućuje na to da transfer samo jednog QTL-a iz štakora GH na genom BN ipak nije dostatan da samostalno uzrokuje hipertenziju. Razlozi negativnih rezultata mogu biti:

1.) *lažno pozitivna analiza povezanosti za sva tri QTL-a* (što je vrlo malo vjerojatno jer su za sva navedena područja genoma štakora GH opisani i preklapajući QTL-i u drugim hipertenzivnim modelima te je vrlo vjerojatno postojanje sličnih, zajedničkih gena/alela koji bi se onda trebali identificirati kod kongeničnih sojeva),

2.) *nije napravljen kompletan transfer QTL-a za vrijeme križanja* (što je isto vrlo malo vjerojatno jer je nakon završetka procesa stvaranja kongeničnih štakora ponovno određena veličina ubačenih segmenata uz pomoć dodatnih 112 genskih biljega pravilno distribuirana duž genoma. Nakon analize rezultata završnog genotipiziranja, nedvojbeno je potvrđeno kako je „uhvaćen“ 99-postotni interval pouzdanosti kod svih triju područja QTL),

3.) *nužnost postojanja nekog nepoznatog izvanjskog stresora za razvoj hipertenzija* (moguće; manje je vjerojatno jer hipertenzija kod štakora GH ne ovisi o količini soli u hrani i drugim poznatim čimbenicima rizika te se pojavljuje vrlo rano s nasljeđem većim od 50%),

4.) *prisutnost „učinka praga“ ili epistaze*, tj. potrebe više od jednog lokusa kako bi se manifestirao fenotip (najvjerojatniji razlog; rezultati mjerenja arterijskog tlaka nedvojbeno su pokazali kako samo jedna regija hipertenzivnog genoma nije dostatna za remećenje homeostaze arterijskog tlaka u normalnim uvjetima kod štakora GH i za pojavu bolesti).

I druge studije životinjskih modela za hipertenziju, pogotovo one u kojima su korišteni kongenični štakori sa zdravom genskom pozadinom, pokazale su slične rezultate, tj. također nisu ostvarile ciljani fenotip (106, 107), što govori u prilog prisutnosti epistaze i u tim hipertenzivnim modelima.

Vrlo je vjerojatno da hipertenzija kod GH zahtijeva više od jednog QTL-a, tj. područja genoma zbog „učinka praga podražaja“ ili zbog interakcije s drugim QTL-om ili pak s nekim neodređenim dijelom genoma GH. U kongeničnih štakora BN.GH

prisutnost zdrave genske pozadine spriječila je razvoj bolesti zato jer su drugi kompenzacijski mehanizmi bili dostatni za održavanje arterijskog tlaka unutar željenih granica. Samo križanje štakorskog modela hipertenzije GH trajalo je više godina pa GH štakori vjerojatno nemaju „glavni“ gen za hipertenziju, za razliku od štakora SS i SHR koji su dobili povišen arterijski tlak već unutar prvih nekoliko generacija selekcije (<http://rgd.mcw.edu>). Pretpostavlja se kako je za hipertenziju u GH odgovorno između 10 i 100 poligena. Ta je pretpostavka u skladu s prihvaćenom hipotezom kako hipertenzija u ljudi ipak nije uzrokovana djelovanjem jednog ili nekoliko glavnih gena; ona je posljedica djelovanja većeg broja evolucijski mlađih alela koji su populacijsko specifični. Zbog toga je hipertenzija u ovih štakora sličnija ljudskoj hipertenziji te je posljedično GH, unatoč tomu što je kompliciraniji, vjerojatno bolji model za ljudsku hipertenziju.

#### *5.3.4. Određivanje biokemijskih i hormonskih osobitosti u kongeničnih životinja*

Pokusima koji su uslijedili nakon mjerenja arterijskog tlaka, pronađene su značajne razlike u vrijednostima nekih biokemijskih pokazatelja kod kongeničnih životinja. Mjereno je ukupno 18 osnovnih biokemijskih parametara (glukoza, AST, ALT, GGT, alkalna fosfataza, bilirubin, kolesterol, ukupni proteini, albumini, globulini, ureja, kreatinin, fosfor, kalcij, natrij, kalij, kloridi i bikarbonati) koji su bili sastavni dio ponuđene palete pretraga Marshfield laboratorija, Marshfield, WI, SAD. Vrijednosti navedenih biokemijskih osobitosti su prethodno određivane i kod svih konsomičnih sojeva štakora u sklopu projekta PGA (<http://pga.mcw.edu>), tako da je odlučeno da se i BN.GH štakori podvrgnu istoj paleti testova u svrhu usporedbe rezultata s drugim sojevima.

BN.GH2 štakori imaju značajno više vrijednosti albumina ( $34.6 \pm 0,5$  g/l) i ureje ( $24,8 \pm 7,7$ ), a BN.GH6 više vrijednosti ukupnih proteina i globulina nego kontrolni

BN. BN.GH 18 se očituju značajno višim razinama ureje, fosfora i kalija nego BN štakori.

Tireoidni hormoni, koji su uzeti za indirektne pokazatelje bazalnog metabolizma, također su pokazali interesantne varijacije. Nisu primijećene razlike u vrijednostima T4, dok su vrijednosti T3 varirale od  $766,7 \pm 30,5$  ng/l kod BN.GH6 do  $1192,9 \pm 75,8$  ng/l u BN.GH2, što je značajno različito ( $p < 0,05$ ) od vrijednosti u štakora BN ( $845 \pm 80,4$  ng/l). Iz tih se rezultata može procijeniti da štakori BN.GH2 imaju povišene vrijednosti bazalnog metabolizma, unatoč sličnoj tjelesnoj težini.

Navedeni rezultati nedvojbeno su pokazali su da unatoč 99-postotnoj genskoj identičnosti, kongenične životinje ipak imaju različite kompenzacijske razine regulacijskih mehanizama koje su posljedično dovele do različitih razina biokemijskih i hormonskih parametara. To je vjerojatno dodatno potpomognuto i učincima genske pozadine, čija se važnost obično zanemaruje. Isto tako ne može se isključiti mogućnost da su neki od gena prisutnih u QTL regijama direktno odgovorni za opažene razlike. Ti podaci svakako zahtijevaju dodatne pokuse i praćenja u svrhu dobivanja potpunijih objašnjenja.

### *5.3.5. Određivanje prohipertenzivnih subfenotipova u kongeničnih životinja*

Kao što je već rečeno, osim mjerenju arterijskog tlaka, kongenične su životinje bile podvrgnute mjerenju dodatnih, intermedijarnih fenotipova. Naime, zbog same složenosti modela GH, pokušalo se dodatno pojednostaviti model definiranjem mogućih prohipertenzivnih subfenotipova (intermedijarni fenotipovi). Kako bi se hipertenzivni subfenotip mogao proglasiti intermedijarnim, moraju se zadovoljiti tri osnovna kriterija koja su nedavno postavili Moreno i suradnici (108). Prvo, navedeni fenotip mora biti lokaliziran na istome mjestu u genomu kao i arterijski tlak. Drugo, fenotip mora biti u korelaciji s hipertenzijom unutar proučavane populacije, bilo da se



radi o ljudima ili o životinjama. Treće, fenotip mora biti povezan s primarnom aktivnosti gena koja izravno može pridonijeti hipertenziji. Osim toga, intermedijarni fenotipovi/prohipertenzivni fenotipovi trebali bi se vrlo lako mjeriti te bi kao takvi trebali imati i prognostičku vrijednost u hipertenziji.

Zbog svega navedenog, odlučeno je da se u kongeničnih životinja ispituju mogući prohipertenzivni subfenotipovi, a to su reakcija na blokadu sinteze dušičnog oksida L-NAME-om te na dva vazopresora: noradrenalin (NA) i angiotenzin II (ANGII). Navedeni spojevi podižu arterijski tlak, ali je mehanizam njihova djelovanja dosta različit. L-NAME je blokator sinteze dušičnog oksida (NO), važnog vazodilatatora i natriuretske tvari s nizom učinaka na različita tkiva. Akutna i kronična primjena L-NAME-a dovodi do znatnog porasta arterijskog tlaka. NA je agonist  $\beta$  1,  $\beta$  2,  $\alpha$  1 i  $\alpha$  2 adrenergičkih receptora (109). Uloga je tih receptora regulacija srčane frekvencije i kontraktilnosti, reguliranje žilnog tonusa, mobilizacija lipida lipolizom u masnim stanicama te kontrola izlučivanja renina u bubregu (110). ANG II je snažan vazopresor i ima ključnu ulogu u renin-angiotenzin-aldosteronskom sistemu. Djeluje preko angiotenzinskih 1 (AT1) i 2 (AT2) receptora i ključni je čimbenik dugoročne kontrole arterijskog tlaka te baroreceptorskog refleksa. Stimulacija receptora AT1 dovodi do vazokonstrukcije i smanjenja natriureze, do rasta i proliferacije stanica, a stimulacija receptora AT2 do suprotnih učinaka, tj. do vazodilatacije i porasta natriureze te zaustavlja rast i diferencijaciju stanica. Također, stimulacija receptora AT1 dovodi do stvaranja slobodnih radikala te do indukcije inhibitor 1 aktivatora plazminogena (*PAI-1*) i ostalih faktora rasta, dok stimulacija AT2 dovodi do porasta dušičnog oksida (NO) koji može neutralizirati slobodne radikale (111, 112).

Niti jedna od kongeničnih skupina nije pokazala drukčiji odgovor na primjenu L-NAME-a, što se moglo i očekivati jer navedeni fenotip nije bilo kartiran u populaciji

F2, odnosno preneseni segmenti genoma GH nisu sadržavali poznate gene odgovorne za metabolizam dušičnog oksida.

ANG II i NA primijenjeni su u četiri različite doze; svaka je iduća doza bila dva puta viša od prethodne radi dobivanja krivulje doze i odgovora (engl. dose response curve). Korištena je metoda izračuna  $\beta$ -koeficijenta (nagiba krivulje) linearnom regresijom za svaku pojedinu životinju, a iz njihovih je vrijednosti izračunana vrijednost  $\beta$ -koeficijenta za svaku skupinu kako je opisano (98, 99).

Unatoč sličnom odgovoru ispitanika na NA, žilna reaktivnost na ANG II pokazala je različite odgovore kod štakora BN.GH2 i BN.GH18 u usporedbi s kontrolom. Tim je pokusima utvrđen značajno viši porast sistoličkog tlaka uz promjenu  $\beta$ -koeficijenta, što nedvojbeno upućuje na pojačanu žilnu reaktivnost i/ili oštećenje regulacijskih mehanizama perifernog otpora (vidi tablicu 5.). Ti su podaci posebno interesantni uzmu li se u obzir već poznati podaci o poremećenom perifernom otporu te promjenama u glatkim mišićima krvnih žila kao mogućem mehanizmu hipertenzije u štakora GH. Analizom genske sekvencije kongenične regije štakora BN.GH2, a uz pomoć pretraživača genoma (<http://www.rgd.mcw.edu> te <http://www.genome.ucsc.edu>), utvrđeno je kako se unutar te regije nalazi *Agtr1b*, a koji je osobito interesantan gen kandidat za daljnje praćenje jer je možda odgovoran za opisane subfenotipove. Sličnom analizom nisu se uspjeli identificirati mogući geni kandidati u kongeničnoj regiji štakora BN.GH 18.

Ti rezultati nedvojbeno upućuju na to da te dvije pasmine životinja, unatoč sličnoj žilnoj osjetljivosti na NA, imaju statistički značajnu razliku u odgovoru na ANGII te vjerojatno i različite gen(e). Navedeni rezultati ne začuđuju jer se radi o različitom mehanizmu djelovanja i odgovornim genima, čija će detekcija zahtijevati stvaranje preklapajućih kongeničnih životinja, ekspresijske studije i sekvencioniranje gena kandidata.

### 5.3.6. *Određivanje osjetljivosti barorefleksa u kongeničnih životinja BN.GH18*

Nakon analize krivulja osjetljivosti baroreceptora (krivulja odnosa HR i MAP) primijećen je značajno različit odgovor barorefleksa na infuziju ANG II u BN.GH18, što je predočeno na slici 10. Poznato je kako metode procjene funkcije, odnosno osjetljivosti baroreceptorskog refleksa, mogu uključiti bilo koje fiziološke ili farmakološke zahvate koji uzrokuju nagli porast ili pad arterijskog tlaka. Tako aortni barorefleks aktiviraju pritisak na vrat, Valsavin manevar, ANG II i fenilefrin, dok ga deaktiviraju nitroglicerina, amil nitrit ili nitroprusid (25).

Kod pacijenata se obično bilježi promjena frekvencije srca za vrijeme Valsavina manevra tijekom 15 sekundi. Kod zdravih ljudi za vrijeme takvog manevra, frekvencija srca se smanji za 10 do 30 otkucaja u minuti. Budući da se osjetljivost baroreceptorskog refleksa smanjuje sa starošću, pri usporedbi refleksa treba koristiti zdrave ispitanike slične dobne skupine (25).

Kako bi se potvrdilo da su opaženi rezultati smanjene osjetljivosti barorefleksa BN.GH18 štakora uistinu točni, odlučeno je da se oni podvrgnu dodatnom mjerenju osjetljivosti barorefleksa, ali različitom metodom (fenilefrin). I pokusi s fenilefrinom (tablica 6.) potvrdili su rezultate dobivene s ANG-om II koji pokazuju kako štakori BN.GH18, unatoč normalnim razinama arterijskog tlaka imaju oštećen baroreceptorski refleks. Navedeni rezultati pokazuju da ta promjena ima snažnu gensku pozadinu te da nije sama po sebi uzrokovana hipertenzijom. Već je prethodno opisano da GH štakori imaju oštećen baroreceptorski refleks, a slično je zapaženo i kod ostalih hipertenzivnih sojeva kao što su SHR (113), Lyonski soj hipertenzivnih štakora (114), ili pak Dahl SS (115). Nadalje, Stoll i sur. (93) locirali su QTL za baroreceptorski refleks baš na kromosomu 18 kod Dahl SS, koji se preklapa s kongeničnom regijom kod BN.GH18, što je dodatno potvrdilo hipotezu o postojanju

genskog čimbenika odgovornog za osjetljivost barorefleksa na štakorskom kormosomu 18.

Poznato je kako mnoge bolesti mogu dovesti do oštećenja funkcije baroreceptora. Osim hipertenzije, to su i zatajenje srca, razni lijekovi ( $\alpha$  i  $\beta$ -blokatori), pušenje, dijabetes, hipertireoza, panični poremećaj i slično. Smatra se kako oštećena funkcija endotela, oksidacijski stres, aktivacija trombocita i ANG II pridonose smanjenoj osjetljivosti barorefleksa u pacijenata s hipertenzijom. Pronađena su oštećenja u barorefleksnoj aktivnosti simpatičkog sustava u normotenzivnih ljudi s obiteljskom anamnezom hipertenzije. Više je studija nedvojbeno pokazalo kako je funkcija barorefleksa genski predodređena, ali razina genskog utjecaja nije posve poznata. Pokusi na blizancima koje su proveli Tank i sur. pokazali su kako je nasljednost ( $h^2$ ) osjetljivosti barorefleksa 34 - 44%, nakon korekcije za BMI i arterijski tlak, što potvrđuje postojanje različitih genskih čimbenika odgovornih za njihovu osjetljivost (116). Navedeni rezultati nedvojbeno sugeriraju da genski čimbenici uvjetuju osjetljivost baroreceptora neovisno o hipertenziji (23).

Oštećenje aferentnog dijela refleksnog luka (zatajenje baroreceptora) ili pak eferentnog refleksnog luka (zatajenje autonomnog živčanog sustava) očituje se vrlo promjenjivim, nestabilnim arterijskim tlakom i srčanom frekvencijom. Posljedično, i blaga oštećenja funkcije baroreceptora mogu rezultirati značajnim promjenama homeostaze kardiovaskulnog sustava (117, 118). Više je studija potvrdilo mogućnost da je poremećaj baroreceptora važan čimbenik koji pridonosi razvoju hipertenzije (119-121), a La Rovere i sur. pokazali su kako je smanjena osjetljivost barorefleksa značajno povezana s povišenom smrtnošću nakon infarkta miokarda, te da kao takva ima znatnu prognostičku vrijednost (122).

Oštećenje barorefleksnog luka u sisavaca dovodi do nestabilnosti i veće varijabilnosti arterijskog tlaka (engl. blood pressure variability) (123). Arterijski tlak

pokazuje tipična dnevna osciliranja i u hipertenzivnih i u normotenzivnih ljudi, ali je varijabilnost oscilacija značajno veća u hipertoničara (124, 125). Klinička su ispitivanja pokazala da oni s višim oscilacijama arterijskog tlaka tijekom 24 sata imaju izraženija oštećenja ciljnih organa (srca i bubrega), što se smatra važnim dodatnim čimbenikom u razvoju hipertenzije (124). Sleight je ukazao da rezultati mjerenja osjetljivosti barorefleksa mogu pridonijeti boljem prognoziranju ishoda koronarne srčane bolesti kad se koriste zajedno s drugim kliničkim pokazateljima (126).

Na temelju navedenoga jasno se može zaključiti kako je oštećenje barorefleksa jedan od ključnih čimbenika u patofiziologiji hipertenzije te kako će daljnji pokusi s BN.GH18 sojem štakora doprinijeti otkriću genske podloge poremećaja barorefleksa. Točan učinak poremećene funkcionalnosti i osjetljivosti barorefleksa na sam početak i razvoj hipertenzije još je uvijek nepoznat.

#### **5.4. Budućnost genetičkih istraživanja humane hipertenzije**

Malo je vjerojatno da se samo genskim analizama povezanosti unutar obitelji ili populacije može pozicijski klonirati gen-uzročnik hipertenzije jer navedeni pristupi ipak zahtijevaju prisutnost jednog „glavnog“ gena sa specifičnim načinom nasljeđivanja. Iako su se navedenim metodama uspjeli klonirati neki od gena za kvalitativne fenotipove, kao što su boja i oblik kod rajčice (127) te za ulcerozni kolitis (128), navedena metodologija ipak nije dala priželjkivane rezultate kod bolesti kod kojih se pretpostavlja da su uzrokovane većim brojem gena s manjim učinkom na fenotip. Ukratko, primjenom samo tih metoda vjerojatno se neće uspjeti pozicijski klonirati gen(i) za hipertenziju, zbog iznimne složenosti i velikog broja odgovornih alela. Kako bi se mogao razumjeti poligeniski fenotip, trebat će dodatno pojednostaviti fenotip, ili analizu, ili oboje. Jedan od načina kako identificirati gen možda leži u

zanemarivanju kvantitativnih razlika i njihovoj zamjeni s dihotomnim kvalitativnim kriterijima.

Vrlo je vjerojatno da će, ako se želi otkriti gen za hipertenziju, trebati slijediti smjernice koje je postavio NHLBI (<http://www.nhlbi.nih.gov>):

- a) razviti interdisciplinarni pristup problemu jer su dosadašnji rezultati pokazali kako genetika hipertenzije pokazuje golemu složenost te da genetičari ili biostatističari ne mogu sami pronaći odgovore,
- b) identificirati subfenotipove (intermedijarne fenotipove) hipertenzije, tj. patofiziološke mehanizme koji mogu dovesti do bolesti,
- c) nastaviti genotipsko karakteriziranje hipertenzije primjenom novih, naprednijih metoda genotipiziranja (gušće genotipiziranje korištenjem novih biljega SNP) uz pronalazak načina za daljnje reduciranje genske heterogeničnosti,
- d) razviti nove matematičke modele za integraciju poznatih bioloških sustava,
- e) utvrditi biološke mehanizme za poznate čimbenike koji su udruženi s hipertenzijom (npr. osjetljivost na unos NaCl),
- f) otkriti prehipertenzivne fenotipove i njihove biološke biljege (ako se dovoljno rano prepoznaju prohipertenzivni fenotipovi, možda se može prevenirati ili značajno odgoditi pojava hipertenzije),
- g) razviti nove oblike farmakološkog pristupa hipertenziji kroz otkrivanje funkcionalnih genskih polimorfizama koji su odgovorni za različite odgovore na antihipertenzivnu terapiju,
- h) i dalje se koristiti životinjskim modelima, uz unaprjeđenje tehnologija za genetičku manipulaciju (knock out ili transgenične životinje).

## 5.5. Budućnost kongeničnih štakora BN.GH

Rezultate navedenih pokusa s kongeničnim BN.GH štakorima trebalo bi promatrati u širem kontekstu, tj. u kontekstu rezultata drugih sličnih studija s hipertenzivnim modelima te rezultata humanih studija, s posebnim osvrtom na FBPP jer su ovi pokusi njezin temeljni dio.

Niti jedan od kongeničnih štakora BN.GH nije pokazao povišene vrijednosti arterijskog tlaka, ali je u potrazi za genskim determinantama i za prohipertenzivnim subfenotipovima nedvojbeno pronađeno kako neki kongenični sojevi (BN.GH2 i BN.GH18), unatoč normalnim vrijednostima glavnog fenotipa (arterijskog tlaka), ipak imaju prohipertenzivne subfenotipove koji udovoljavaju kriterijima intermedijarnog fenotipa. Jedan od glavnih razloga zbog čega je odlučeno da se kongenične životinje križaju uz transfer samo jednog QTL-a iz GH na zdravu pozadinu BN štakora upravo je bio omogućavanje testiranja koncepta intermedijarnih fenotipova jer njihova detekcija i testiranje svakako znače novitet u rješavanju problematike hipertenzije i ostalih složenih bolesti. Raščlambom složenog fenotipa hipertenzije na nekoliko intermedijarnih fenotipova, dodatno je pojednostavljen model te će to vjerojatno dovesti do otkrića genskih čimbenika intermedijarnog fenotipa. Poznavanje uzroka intermedijarnog fenotipa trebalo bi olakšati pronalazak uzroka glavnog, složenog fenotipa.

Jedan od najinteresantnijih prohipertenzivnih subfenotipova jest smanjena osjetljivost barorefleksa u BN.GH18, a ispitivanjima je potvrđeno kako je to važan intermedijarni fenotip hipertenzije za koji su odgovorni geni unutar QTL-a na kromosomu 18. Ti rezultati otvaraju novo pitanje: je li poremećeni barorefleks jedan od genskih uzroka, rizični čimbenik ili samo slučajan nalaz kod hipertenzivnih GH štakora? Odgovore na to bi trebali dati idući pokusi u procesu pozicijskog kloniranja

gena za barorefleks (stvaranje preklapajućih kongeničnih štakora za regiju na kromosomu 18 te studije na genima kandidatima).

Rezultati pokusa u ovoj disertaciji doveli su do stvaranja nove hipoteze prema kojoj je hipertenzija kod životinjskog modela GH posljedica epistatskog djelovanja više regija na genomu te kako je to hipertenzivni model s pragom podražaja.

Ukratko, BN.GH kongenični štakori će koristiti za stvaranje dvostruko i trostruko kongeničnih životinja koje će imati dva ili sve QTL-e za hipertenziju na zdravoj genskoj pozadini radi potvrde nove hipoteze. Na taj bi se način trebale otkriti i detaljnije proučavati moguće epistatske interakcije u novom modelu.



## 6. ZAKLJUČCI

U ovoj se disertaciji pokušalo primjenom modernih genetičkih tehnika i metodologija rasvijetliti etiologiju hipertenzije te pronaći odgovorne gene, odnosno patofiziološke procese s pomoću GH štakora te novostvorenih kongeničnih BN.GH životinja. Navedenim pokusima došlo se do novih spoznaja, što se može predočiti u nekoliko zaključaka:

- A) Po prvi put je učinjena kompletna analiza povezanosti i skeniranje genoma u populaciji F2 dobivenih križanjem GH i BN štakora te su locirana područja odgovorna za osam od devet praćenih kardiovaskulnih fenotipova i to na šest različitih kromosoma (2, 3, 6, 10, 13 i 18).
- B) Opisana su tri ključna kromosoma s genima za regulaciju arterijskog tlaka u GH štakora (2, 6, i 18).
- C) Stvorena su tri nova soja kongeničnih životinja s hipertenzivnim QTL-ima na zdravoj pozadini s ciljem isključenja učinka genomske pozadine te otkrivanja prohipertenzivnih subfenotipova (intermedijarnih fenotipova).
- D) Pojedinačni transfer svake od navedenih regija na kromosomu 2, 6 i 18 nije bio dostatan da samostalno inducira pojavu hipertenzije.
- E) BN.GH18 štakori imaju povećanu žilnu osjetljivost na ANG II te oštećenu aktivnost baroreceptorskog refleksa unatoč normotenziji.
- F) BN.GH2 štakori imaju povišenu razinu bazalnog metabolizma te povećanu žilnu osjetljivost na ANG II.
- G) Prikazana je korisnost metodologije „rastavljanja“ ciljanog složenog fenotipa na jednostavnije subfenotipove te identifikacije intermedijarnih fenotipova.

Posljedično, navedeni rezultati doveli su do stvaranja nekoliko novih hipoteza o hipertenziji u GH štakora:

- A) Kromosom 18 sadrži gen(e) uključene u funkciju baroreceptorskog refleksa čija je poremećena aktivnost jedan od mogućih mehanizama u nastanku hipertenzije.
- B) Geni odgovornih za pojačanu osjetljivost na ANG II se nalaze na kromosomima 2 i 18 (npr. *Agtr1b*) te su odgovorni u patofiziologiji hipertenzije
- C) Hipertenzija kod GH štakora je posljedica epistatskog djelovanja više regija na genomu odnosno GH je hipertenzivni model s „učinkom praga podražaja“.

Kako bi se potvrdile navedene hipoteze biti će potrebno učiniti slijedeće pokuse:

- 1.) Stvoriti nove, preklapajuće subkongenične sojeve s manjim djelovima umetnutog genoma kao korak bliže pronalaženju gena odgovornih za osjetljivost baroreceptorskog refleksa (kromosom 18) te za pojačanu osjetljivost na ANG II (kromosom 2), nakon čega bi trebalo identificirati gene kandidate te odrediti razinu njihova izražaja te sekvenciju.
- 2.) Odrediti osjetljivost baroreceptora u sličnom hipertenzivnom modelu (npr. Lyon štakori) te potvrditi iste gene kandidate.
- 3.) Stvoriti dvostruko ili trostruko kongenične životinje križanjem svih kongeničnih BN.GH sojeva. Tim bi se pristupom trebale objasniti interakcije između gena u različitim QTL-ima, odnosno mehanizam epistaze te „činak praga podražaja“ u genezi hipertenzije.

Ukratko, rezultati transfera hipertenzivnih QTL regija na kromosomima 2, 6 i 18 na pojavu hipertenzije u BN.GH kongeničnih životinja, iako negativni, ipak su

urodili novim i interesantnim spoznajama o ulozi pojedinih segmenata genoma. Još jednom je potvrđena je spoznaja kako za složene bolesti kao što je hipertenzija, geni iz jednog područja genoma (QTL) na zdravoj genetskoj pozadini ipak nisu dostatni da samostalno uzrokuju pojavu fenotipa/bolesti. Nadalje je pokazano da genska pozadina i njezine interakcije imaju vrlo važnu, često zanemarenu ulogu. Isto tako je potvrđena je nužnost identifikacije i proučavanja intermedijarnih prohipertenzivnih fenotipova, njihovih interakcija te detekcija njihovih genskih determinanti koje svakako mogu pomoći u razumijevanju nekih od mehanizama uključenih u homeostazu arterijskog tlaka.

Pokusi koji će uslijediti u svrhu potvrđivanja novih hipoteza dodatno bi trebali objasniti interakcije između gena u različitim QTL-ima, regulaciju uzročno-posljedičnih ili kompenzacijskih mehanizama. Ukoliko se dvostruko ili trostruko kongenični sojevi pokažu hipertenzivnima, to će nedvojbeno potvrditi postojanje epistaze i modela praga podražaja. Nakon toga će uslijediti stvaranje novih subkongeničnih sojeva sa manjim djelovima umetnutog genoma te identifikacija gena kandidata. Uz pomoć modernih bioinformatičkih alata slični i isti geni mogu se jednostavno identificirati i u ljudskoj populaciji.

Otkrića jednog ili više gena i mehanizama odgovornih za nastanak hipertenzije u eksperimentalnih životinja, odnosno u ljudskoj populaciji, trebala bi dovesti do boljeg razumijevanja patogeneze te otvoriti vrata novim, učinkovitijim terapijskim smjericama ove problematične bolesti.

## 7. SAŽETAK

U ovoj je disertaciji opisan pokušaj rasvjetljavanja etiologije hipertenzije s pomoću kongeničnih štakora BN.GH, genetički modificiranih pokusnih životinja. Navedeni su pokusi dio multicentrične studije Family Blood Pressure Program (FBPP) Nacionalnog instituta za bolesti srca, pluća i krvi Sjedinjenih Američkih Država (NHLBI), kojoj je temeljni cilj pozicijski klonirati gen(e) za hipertenziju koristeći se, među ostalim, i životinjskim (GH) modelom hipertenzije.

Glavni je cilj disertacije bio odrediti kako odabrani dio genoma štakora GH na zdravoj genskoj pozadini utječe na vrijednosti arterijskog tlaka, biokemijske i hormonske pokazatelje, reakciju organizma na stres ispitivanu s pomoću potentnih vazopresora (angiotenzin II – ANG II i noradrenalin - NA) te na blokadu sinteze dušičnog oksida s N-nitro L-arginin metil esterom (L-NAME), kod svih novostvorenih, genetički modificiranih sojeva štakora.

Najprije je genskim analizama s pomoću F2 generacije dobivene križanjem genski hipertenzivnih (GH) i Brown Norway (BN) štakora otkriveno više važnih područja na genomu od kojih su tri, i to na kromosomima 2, 6 i 18, povezana s hipertenzijom. Nakon toga, kao sljedeći korak u procesu pozicijskog kloniranja, selektivnim su križanjem stvorena trinova kongenična soja koja imaju ciljani dio genoma bolesnog štakora (GH) na genskoj podlozi zdravog štakora (BN). Ta tri novostvorena soja su: BN.GH-(*D2Rat22-D2Mgh11*)/Mcwi (u daljnjem tekstu **BN.GH2**); BN.GH-(*D6Mit12-D6Rat15*)/Mcwi (**BN.GH6**) te BN.GH-(*D18Rat41-D18Mgh4*)/Mcwi (**BN.GH18**).

Nažalost, niti jedan od navedenih kongeničnih sojeva nije pokazao statistički značajno povišenje arterijskog tlaka u odnosu na normotenzivne štakore BN. Budući da je vrlo vjerojatno kako hipertenzija nastaje kao posljedica poremećaja u jednom ili

više regulatornih mehanizama, dodatnim je pokusima, koji su među ostalim uključili i primjenu vazopresora, biokemijske pretrage te biometrijska mjerenja, pokušano utvrditi imaju li novostvoreni štakori neke od subfenotipova hipertenzije (engl. intermediate phenotypes) koji su možda manjkavi, ali sami po sebi ne dovode do porasta arterijskog tlaka zbog aktivnosti ostalih kompenzacijskih mehanizama. Takvim se pristupom pokušao ubrzati proces otkrivanja odgovornih gena, i to "rastavlajući" glavni, složeni fenotip (u ovom slučaju hipertenzija) na više jednostavnijih prohipertenzivnih subfenotipova za koje se vjeruje da su pod kontrolom ograničenog, manjeg broja gena. Naši podaci sugeriraju kako dva od tri novostvorena soja imaju značajno različite prohipertenzivne subfenotipove kao što su pojačana žilna reakcija na angiotenzin II (BN.GH2 i BN.GH18) te smanjenu osjetljivost baroreceptorskog refleksa (BN.GH18) u odnosu na kontrolne štakore BN. Navedeni subfenotipovi su genski uvjetovani jer je sama zamjena zdravog dijela genoma bolesnim znatno promijenila žilnu reakciju na angiotenzin II te osjetljivost barorefleksa.

Na temelju rezultata ovog istraživanja može se zaključiti da hipertenzija kod štakora GH nije uzrokovana učinkom jednog «glavnog» gena, odnosno da je potrebna prisutnost više od jednog disfunkcionalnog dijela genoma kako bi se pokrenuo patofiziološki proces odgovoran za nastanak ili održavanje hipertenzije. Hipertenzija u štakora GH vjerojatno je posljedica epistaze (aditivnog učinka više gena), odnosno posljedica „učinka praga“ (engl. threshold model), a što će trebati utvrditi dodatnim pokusima. Jedan od načina provjere te nove hipoteze jest stvaranje novih kongeničnih sojeva koji će sadržavati više od jednog, odnosno sva područja genoma odgovorna za hipertenziju kod štakora GH na normotenzivnoj genskoj pozadini. S ovim pristupom biti će moguće detaljnije objasniti epistatske interakcije među genima kao i regulaciju uzročnih i/ili kompenzatornih mehanizama.

## 8. SUMMARY

### The role of BN.GH congenic rat strains in genetic dissection of hypertension

This dissertation represents an attempt to dissect the genetic etiology of hypertension using a genetically modified experimental model: BN.GH congenic rats. All described experiments were a constitutive part of the NHLBI Family Blood Pressure Program. The objective was to positionally clone hypertension gene(s) and to accelerate genetic studies in humans using a GH model.

The aims of this study were to determine how selected regions of the GH genome on the healthy genomic background, affect blood pressure regulation, blood biochemistry, thyroid hormone levels and vasoactive responses to challenge with L-NAME, NA and ANG II.

We mapped three quantitative trait loci (QTL) contributing to hypertension on chromosomes 2, 6 and 18, using an F2 intercross between the GH/Omr (GH) and normotensive BN/EIh (BN) strains. Congenic strains for each of the three hypertension loci were generated, introgressing each QTL from the hypertensive GH onto the normotensive BN background as follows: BN.GH-(*D2Rat22-D2Mgh11*)/Mcowi (**BN.GH2**); BN.GH-(*D6Mit12-D6Rat15*)/Mcowi (**BN.GH6**) and BN.GH-(*D18Rat41-D18Mgh4*)/Mcowi (**BN.GH18**).

None of the congenics showed a significant increase in basal blood pressure; given the likelihood that hypertension results from variation in a number of pathways, we investigated the possibility that underlying intermediate phenotypes were dysfunctional but did not independently lead to increased blood pressure. Consequently, the effects of pharmacological challenges on blood pressure regulation, biometric measurements and blood biochemistry were studied. With this

approach we tried to speed up the gene discovery process by dissecting the main, complex phenotype (in this case hypertension) into prohypertensive sub-phenotypes, which are under the control of a limited number of genes.

Our findings suggest that BN.GH2 and BN.GH18 congenic rats do have significantly different blood pressure sub-phenotypes (phenotypes hypothesized to be intermediate phenotypes) and decreased baroreceptor sensitivity (only BN.GH18) compared to BN. These phenotypes are strongly genetically determined since single QTL introgression significantly changed vasoreactivity and baroreflex sensitivity.

These data suggest that the development of hypertension in GH rats is not under the control of a single “main” gene and that is necessary to have more than one dysfunctional part of the genome to initiate onset of hypertension.

Furthermore, hypertension in this model is probably induced by an epistatic effect of more than one part of the genome, which when combined, may exceed a threshold effect leading to hypertension. One possible approach to determine a threshold or background effect would be to construct double or triple congenic animals by crossing all existing congenic BN.GH lines. This may permit the elucidation of gene – gene interactions and the regulation of causative and/or compensatory pathways.

## 9. LITERATURA

1. Vasan RS, Beiser A, Seshadri S, Larson MG, Kannel WB, D'Agostino RB i sur. Residual lifetime risk for developing hypertension in middle-aged women and men: The Framingham Heart Study. *JAMA* 2002;287:1003-10.
2. Vasan RS, Larson MG, Leip EP, Evans JC, O'Donnell CJ, Kannel WB i sur. Impact of high-normal blood pressure on the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med* 2001;345:1291-7.
3. Burt VL, Whelton P, Roccella EJ, Brown C, Cutler JA, Higgins M i sur. Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. *Hypertension* 1995;25:305-13.
4. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr i sur. Seventh report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *Hypertension* 2003;42:1206-52.
5. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 2002;360:1903-13.
6. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med* 1990;322:1561-6.
7. Willams G. Hypertensive vascular disease. U: Braunwald E, Fauci AS, Isselbacher KJ, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, ur. *Harrison's principles of internal medicine*. 15. izd. New York: McGraw-Hill, 2004:1414-30.
8. Kaplan NL, Neal W. *Kaplan's clinical hypertension*. 8. izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002:57-120.



9. Anonimno. 2003 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J Hypertens* 2003;21:1011-53.
10. Cusi D, Barlassina C, Taglietti MV. Genetics of human arterial hypertension. *J Nephrol* 2003;16:609-15.
11. Mein CA, Caulfield MJ, Dobson RJ, Munroe PB. Genetics of essential hypertension. *Hum Mol Genet* 2004;13:169-75.
12. Caulfield M, Munroe P, Pembroke J, Samani N, Dominiczak A, Brown M i sur. Genome-wide mapping of human loci for essential hypertension. *Lancet* 2003;361:2118-23.
13. Province MA, Kardia SL, Ranade K, Rao DC, Thiel BA, Cooper RS i sur. A meta-analysis of genome-wide linkage scans for hypertension: the National Heart, Lung and Blood institute Family Blood Pressure Program. *Am J Hypertens* 2003;16:144-7.
14. Leitschuh M, Cupples LA, Kannel W, Gagnon D, Chobanian A. High-normal blood pressure progression to hypertension in the Framingham Heart Study. *Hypertension* 1991;17:22-7.
15. Garrison RJ, Kannel WB, Stokes J, Castelli WP. Incidence and precursors of hypertension in young adults: the Framingham offspring study. *Prev Med* 1987;16:235-51.
16. Nurminen ML, Korpela R, Vapaatalo H. Dietary factors in the pathogenesis and treatment of hypertension. *Ann Med* 1998;30:143-50.
17. Weinberger MH. Salt sensitivity of blood pressure in humans. *Hypertension* 1996;27:481-90.
18. Campese VM. Salt sensitivity in hypertension. Renal and cardiovascular implications. *Hypertension* 1994;23:531-50.

19. Karason K, Wallentin I, Larsson B, Sjostrom L. Effects of obesity and weight loss on left ventricular mass and relative wall thickness: survey and intervention study. *BMJ* 1997;315:912-6.
20. Hsueh WA, Buchanan TA. Obesity and hypertension. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1994;23:405-27.
21. Reaven GM, Lithell H, Landsberg L. Hypertension and associated metabolic abnormalities - the role of insulin resistance and the sympathoadrenal system. *N Engl J Med* 1996;334:374-81.
22. Schork NJ. Genetics of complex disease: approaches, problems, and solutions. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:103-9.
23. Chappleau M. Arterial baroreflexes. U: Izzo JL Jr, Black HR, ur. *Hypertension primer*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2003:103-6.
24. Dunlap M. Cardiopulmonary baroreflexes. U: Izzo JL Jr, Black HR, ur. *Hypertension primer*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2003:106-8.
25. Taylor A. Evaluation of aortocarotid baroreflexes. U: Izzo JL Jr, Black HR, ur. *Hypertension primer*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2003:355-8.
26. Carmelli D, Cardon LR, Fabsitz R. Clustering of hypertension, diabetes, and obesity in adult male twins: same genes or same environments? *Am J Hum Genet* 1994;55:566-73.
27. Weiss K. Genetic variation and human disease. Principles and evolutionary approaches. Cambridge: Cambridge University Press,1993:37-152.
28. Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science* 1994;265:2037-48.
29. Martin N, Boomsma D, Machin G. A twin-pronged attack on complex traits. *Nat Genet* 1997;17:387-92.
30. Harrap SB. Where are all the blood-pressure genes? *Lancet* 2003;361:2149-51.

31. Platt R. Heredity in hypertension. *Lancet* 1963;1:899-904.
32. Pickering G. Hypertension. Definitions, natural histories and consequences. *Am J Med* 1972;52:570-83.
33. Lifton RP, Hopkins PN, Williams RR, Hollenberg NK, Williams GH, Dluhy RG. Evidence for heritability of non-modulating essential hypertension. *Hypertension* 1989;13:884-9.
34. Hunt SC, Hasstedt SJ, Kuida H, Stults BM, Hopkins PN, Williams RR. Genetic heritability and common environmental components of resting and stressed blood pressures, lipids, and body mass index in Utah pedigrees and twins. *Am J Epidemiol* 1989;129:625-38.
35. Hong Y, de Faire U, Heller DA, McClearn GE, Pedersen N. Genetic and environmental influences on blood pressure in elderly twins. *Hypertension* 1994;24:663-70.
36. Jousilahti P, Puska P, Vartiainen E, Pekkanen J, Tuomilehto J. Parental history of premature coronary heart disease: an independent risk factor of myocardial infarction. *J Clin Epidemiol* 1996;49:497-503.
37. Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, de Faire U. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *N Engl J Med* 1994;330:1041-6.
38. Liddle GB, Coppage WS. A familial renal disorder simulating primary aldosteronism but with negligible aldosterone secretion. *Trans Assoc Am Phys* 1963;76:199-213.
39. Shimkets RA, Warnock DG, Bositis CM, Nelson-Williams C, Hansson JH, Schambelan M *in sur*. Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel. *Cell* 1994;79:407-14.

40. Chang SS, Grunder S, Hanukoglu A, Rosler A, Mathew PM, Hanukoglu I i sur. Mutations in subunits of the epithelial sodium channel cause salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudohypoaldosteronism type 1. *Nat Genet* 1996;12:248-53.
41. Wilson RC, Harbison MD, Krozowski ZS, Funder JW, Shackleton CH, Hanauske-Abel HM i sur. Several homozygous mutations in the gene for 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in patients with apparent mineralocorticoid excess. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3145-50.
42. Li A, Tedde R, Krozowski ZS, Pala A, Li KX, Shackleton CH i sur. Molecular basis for hypertension in the "type II variant" of apparent mineralocorticoid excess. *Am J Hum Genet* 1998;63:370-9.
43. Gates LJ, MacConnachie AA, Lifton RP, Haites NE, Benjamin N. Variation of phenotype in patients with glucocorticoid remediable aldosteronism. *J Med Genet* 1996;33:25-8.
44. Brand E, Chatelain N, Mulatero P, Fery I, Curnow K, Jeunemaitre X i sur. Structural analysis and evaluation of the aldosterone synthase gene in hypertension. *Hypertension* 1998;32:198-204.
45. Tanimoto K, Sugiyama F, Goto Y, Ishida J, Takimoto E, Yagami K i sur. Angiotensinogen-deficient mice with hypotension. *J Biol Chem* 1994;269:31334-7.
46. Kim HS, Krege JH, Kluckman KD, Hagan JR, Hodgin JB, Best CF i sur. Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:2735-9.
47. Caulfield M, Lavender P, Farrall M, Munroe P, Lawson M, Turner P i sur. Linkage of the angiotensinogen gene to essential hypertension. *N Engl J Med* 1994;330:1629-33.

48. Caulfield M, Lavender P, Newell-Price J, Farrall M, Kamdar S, Daniel H i sur. Linkage of the angiotensinogen gene locus to human essential hypertension in African Caribbeans. *J Clin Invest* 1995;96:687-92.
49. Atwood LD, Kammerer CM, Samollow PB, Hixson JE, Shade RE, MacCluer JW. Linkage of essential hypertension to the angiotensinogen locus in Mexican Americans. *Hypertension* 1997;30:326-30.
50. Brand E, Chatelain N, Keavney B, Caulfield M, Citterio L, Connell J i sur. Evaluation of the angiotensinogen locus in human essential hypertension: a European study. *Hypertension* 1998;31:725-9.
51. Niu T, Xu X, Rogus J, Zhou Y, Chen C, Yang J i sur. Angiotensinogen gene and hypertension in Chinese. *J Clin Invest* 1998;101:188-94.
52. Kunz R, Kreutz R, Beige J, Distler A, Sharma AM. Association between the angiotensinogen 235T-variant and essential hypertension in whites: a systematic review and methodological appraisal. *Hypertension* 1997;30:1331-7.
53. Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). *Nucleic Acids Res* 1992;20:1433.
54. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D i sur. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992;359:641-4.
55. Cambien F, Alhenc-Gelas F, Herbeth B, Andre JL, Rakotovo R, Gonzales MF i sur. Familial resemblance of plasma angiotensin-converting enzyme level: the Nancy Study. *Am J Hum Genet* 1988;43:774-80.
56. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene

- accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990;86:1343-6.
57. Samani NJ, Thompson JR, O'Toole L, Channer K, Woods KL. A meta-analysis of the association of the deletion allele of the angiotensin-converting enzyme gene with myocardial infarction. *Circulation* 1996;94:708-12.
58. Krege JH, Kim HS, Moyer JS, Jennette JC, Peng L, Hiller SK i sur. Angiotensin-converting enzyme gene mutations, blood pressures, and cardiovascular homeostasis. *Hypertension* 1997;29:150-7.
59. O'Donnell CJ, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, Ordovas JM, Schaefer EJ i sur. Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study. *Circulation* 1998;97:1766-72.
60. Rapp JP, Wang SM, Dene H. A genetic polymorphism in the renin gene of Dahl rats cosegregates with blood pressure. *Science* 1989;243:542-4.
61. Jeunemaitre X, Lifton RP, Hunt SC, Williams RR, Lalouel JM. Absence of linkage between the angiotensin converting enzyme locus and human essential hypertension. *Nat Genet* 1992;1:72-5.
62. Cowley AW Jr, Roman RJ, Kaldunski ML, Dumas P, Dickhout JG, Greene AS i sur. Brown Norway chromosome 13 confers protection from high salt to consomic Dahl S rat. *Hypertension* 2001;37:456-61.
63. Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X, Fery I, Charru A, Clauser E i sur. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension* 1994;24:63-9.
64. Wang WY, Zee RY, Morris BJ. Association of angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism with essential hypertension. *Clin Genet* 1997;51:31-4.

65. Benetos A, Gautier S, Ricard S, Topouchian J, Asmar R, Poirier O i sur. Influence of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms on aortic stiffness in normotensive and hypertensive patients. *Circulation* 1996;94:698-703.
66. Tiret L, Bonnardeaux A, Poirier O, Ricard S, Marques-Vidal P, Evans A i sur. Synergistic effects of angiotensin-converting enzyme and angiotensin-II type 1 receptor gene polymorphisms on risk of myocardial infarction. *Lancet* 1994;344:910-3.
67. Castellano M, Muiesan ML, Beschi M, Rizzoni D, Cinelli A, Salvetti M i sur. Angiotensin II type 1 receptor A/C1166 polymorphism. Relationships with blood pressure and cardiovascular structure. *Hypertension* 1996;28:1076-80.
68. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995;274:1049-57.
69. Fletcher O, Kessler AM. MTHFR association with arteriosclerotic vascular disease? *Hum Genet* 1998;103:11-21.
70. Margaglione M, Cappucci G, Colaizzo D, Giuliani N, Vecchione G, Grandone E i sur. The PAI-1 gene locus 4G/5G polymorphism is associated with a family history of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:152-6.
71. de Knijff P, Havekes LM. Apolipoprotein E as a risk factor for coronary heart disease: a genetic and molecular biology approach. *Curr Opin Lipidol* 1996;7:59-63.
72. Lehtinen S, Lehtimäki T, Sisto T, Salenius JP, Nikkila M, Jokela H i sur. Apolipoprotein E polymorphism, serum lipids, myocardial infarction and severity of angiographically verified coronary artery disease in men and women. *Atherosclerosis* 1995;114:83-91.

73. Kreutz R, Stock P, Struk B, Lindpaintner K. The Y chromosome. Epistatic and ecogenetic interactions in genetic hypertension. *Hypertension* 1996;28:895-7.
74. Pajukanta P, Terwilliger JD, Perola M, Hiekkalinna T, Nuotio I, Ellonen P i sur. Genomewide scan for familial combined hyperlipidemia genes in finnish families, suggesting multiple susceptibility loci influencing triglyceride, cholesterol, and apolipoprotein B levels. *Am J Hum Genet* 1999;64:1453-63.
75. Jeunemaitre X, Ledru F, Battaglia S, Guilanneuf MT, Courbon D, Dumont C i sur. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and angiographic extent and severity of coronary artery disease: the CORGENE study. *Hum Genet* 1997;99:66-73.
76. Wartiovaara U, Perola M, Mikkola H, Totterman K, Savolainen V, Penttila A i sur. Association of FXIII Val34Leu with decreased risk of myocardial infarction in Finnish males. *Atherosclerosis* 1999;142:295-300.
77. Chakravarti A. It's raining SNPs, hallelujah? *Nat Genet* 1998;19:216-7.
78. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 1996;273:1516-7.
79. Rapp JP. Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. *Physiol Rev* 2000;80:135-72.
80. Simpson F, Phelan EL, Ledingham JM, Millar JA. Hypertension in the genetically hypertensive (GH) strain. U: Ganten JW, ur. *Handbook of hypertension. Experimental and genetic models of hypertension.* Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier, 1994: 228-71.
81. Bilusic M, Bataillard A, Tschannen MR, Gao L, Barreto NE, Vincent M i sur. Mapping the genetic determinants of hypertension, metabolic diseases, and related phenotypes in the lyon hypertensive rat. *Hypertension* 2004;44:695-701.



82. Darvasi A. Experimental strategies for the genetic dissection of complex traits in animal models. *Nat Genet* 1998;18:19-24.
83. Brown DM, Matise TC, Koike G, Simon JS, Winer ES, Zangen S i sur. An integrated genetic linkage map of the laboratory rat. *Mamm Genome* 1998;9:521-30.
84. Darvasi A, Weinreb A, Minke V, Weller JI, Soller M. Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic map. *Genetics* 1993;134:943-51.
85. Lander E, Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet* 1995;11:241-7.
86. Rapp JP, Deng AY. Detection and positional cloning of blood pressure quantitative trait loci: is it possible? Identifying the genes for genetic hypertension. *Hypertension* 1995;25:1121-8.
87. Wakeland E, Morel L, Achey K, Yui M, Longmate J. Speed congenics: a classic technique in the fast lane (relatively speaking). *Immunol Today* 1997;18:472-7.
88. Jacob HJ, Kwitek AE. Rat genetics: attaching physiology and pharmacology to the genome. *Nat Rev Genet* 2002;3:33-42.
89. Nadeau JH, Singer JB, Matin A, Lander ES. Analysing complex genetic traits with chromosome substitution strains. *Nat Genet* 2000;24:221-5.
90. Garrett MR, Rapp JP. Defining the blood pressure QTL on chromosome 7 in Dahl rats by a 177-kb congenic segment containing *Cyp11b1*. *Mamm Genome* 2003;14:268-73.
91. Laird PW, Zijderveld A, Linders K, Rudnicki MA, Jaenisch R, Berns A. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res* 1991;19:4293.
92. Jacob HJ, Brown DM, Bunker RK, Daly MJ, Dzau VJ, Goodman A i sur. A genetic linkage map of the laboratory rat, *Rattus norvegicus*. *Nat Genet* 1995;9:63-9.

93. Stoll M, Cowley AW, Jr., Tonellato PJ, Greene AS, Kaldunski ML, Roman RJ i sur. A genomic-systems biology map for cardiovascular function. *Science* 2001;294:1723-6.
94. Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES. Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet* 1996;58:1347-63.
95. Kruglyak L, Lander ES. A nonparametric approach for mapping quantitative trait loci. *Genetics* 1995;139:1421-8.
96. Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE i sur. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1987;1:174-81.
97. Lincoln S, Daly M, Lander E. Mapping gene controlling quantitative traits with Mapmaker/QTL 1.1. U: Whitehead Institute Technical Report. 2. izd. Cambridge: Whitehead Institute, 1992:7-43.
98. Frisbee JC, Lombard JH. Development and reversibility of altered skeletal muscle arteriolar structure and reactivity with high salt diet and reduced renal mass hypertension. *Microcirculation* 1999;6:215-5.
99. Drenjancevic-Peric I, Frisbee JC, Lombard JH. Skeletal muscle arteriolar reactivity in SS.BN13 consomic rats and Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* 2003;41:1012-5.
100. Gibbs RA, Weinstock GM, Metzker ML, Muzny DM, Sodergren EJ, Scherer S i sur. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 2004;428:493-521.
101. Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet* 2003;33:228-37.

102. Stephens JC, Schneider JA, Tanguay DA, Choi J, Acharya T, Stanley SE i sur. Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. *Science* 2001;293:489-93.
103. Halushka MK, Fan JB, Bentley K, Hsie L, Shen N, Weder A i sur. Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nat Genet* 1999;22:239-47.
104. Guo C, Ju H, Leung D, Massaelli H, Shi M, Rabinovitch M. A novel vascular smooth muscle chymase is upregulated in hypertensive rats. *J Clin Invest* 2001;107:703-15.
105. Stoll M, Kwitek-Black AE, Cowley AW, Jr., Harris EL, Harrap SB, Krieger JE i sur. New target regions for human hypertension via comparative genomics. *Genome Res* 2000;10:473-82.
106. Monti J, Plehm R, Schulz H, Ganten D, Kreutz R, Hubner N. Interaction between blood pressure quantitative trait loci in rats in which trait variation at chromosome 1 is conditional upon a specific allele at chromosome 10. *Hum Mol Genet* 2003;12:435-9.
107. Kreutz R, Hubner N, Ganten D, Lindpaintner K. Genetic linkage of the ACE gene to plasma angiotensin-converting enzyme activity but not to blood pressure. A quantitative trait locus confers identical complex phenotypes in human and rat hypertension. *Circulation* 1995;92:2381-4.
108. Moreno C, Dumas P, Kaldunski ML, Tonellato PJ, Greene AS, Roman RJ i sur. Genomic map of cardiovascular phenotypes of hypertension in female Dahl S rats. *Physiol. Genomics* 2003;15:243-57.
109. Caron MG, Lefkowitz RJ. Catecholamine receptors: structure, function, and regulation. *Recent Prog Horm Res* 1993;48:277-90.
110. Hoffman B. Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptors antagonists. U: Hardman J, Limbird LE, Goodman Gilman A, ur. Goodman and

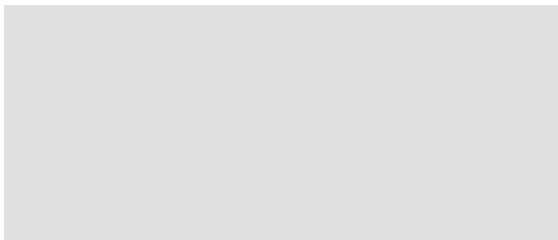
- Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 10. izd. New York: McGraw-Hill, 2001:215-69.
111. Korner PI. Cardiac baroreflex in hypertension: role of the heart and angiotensin II. *Clin Exp Hypertens* 1995;17:425-39.
112. Wong LF, Polson JW, Murphy D, Paton JF, Kasparov S. Genetic and pharmacological dissection of pathways involved in the angiotensin II-mediated depression of baroreflex function. *FASEB J* 2002;16:1595-601.
113. Shan ZZ, Dai SM, Su DF. Relationship between baroreceptor reflex function and end-organ damage in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 1999;277(Suppl 3):H1200-6.
114. Lantelme P, Cerutti C, Lo M, Paultre CZ, Ducher M. Mechanisms of spontaneous baroreflex impairment in Lyon hypertensive rats. *Am J Physiol* 1998;275(Suppl 3):R920-5.
115. Miyajima E, Bunag RD. Exacerbation of central baroreflex impairment in Dahl rats by high-salt diets. *Am J Physiol* 1987;252(Suppl 2):H402-9.
116. Tank J, Jordan J, Diedrich A, Stoffels M, Franke G, Faulhaber HD i sur. Genetic influences on baroreflex function in normal twins. *Hypertension* 2001;37:907-10.
117. Jordan J, Shannon JR, Black BK, Costa F, Ertl AC, Furlan R i sur. Malignant vagotonia due to selective baroreflex failure. *Hypertension* 1997;30:1072-7.
118. Robertson D, Hollister AS, Biaggioni I, Netterville JL, Mosqueda-Garcia R, Robertson RM. The diagnosis and treatment of baroreflex failure. *N Engl J Med* 1993;329:1449-55.
119. Imai Y, Aihara A, Ohkubo T, Nagai K, Tsuji I, Minami N i sur. Factors that affect blood pressure variability. A community-based study in Ohasama, Japan. *Am J Hypertens* 1997;10:1281-9.

120. Parmer RJ, Cervenka JH, Stone RA. Baroreflex sensitivity and heredity in essential hypertension. *Circulation* 1992;85:497-503.
121. Piccirillo G, Viola E, Nocco M, Durante M, Tarantini S, Marigliano V. Autonomic modulation of heart rate and blood pressure in normotensive offspring of hypertensive subjects. *J Lab Clin Med* 2000;135:145-52.
122. La Rovere MT, Bigger JT, Jr., Marcus FI, Mortara A, Schwartz PJ. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators. *Lancet* 1998;351:478-84.
123. Siche JP, Longere P, DeGaudemaris R, Riachi M, Comparat V, Mallion JM. Variability in arterial blood pressure at rest depends on the sensitivity of the baroreflex. *J Hypertens Suppl* 1993;11(Suppl 5):S176-7.
124. Mancia G, Frattola A, Parati G, Santucci C, Ulian L. Blood pressure variability and organ damage. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994;24(Suppl A):S6-11.
125. Mancia G. Blood pressure variability: mechanisms and clinical significance. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990;16(Suppl 6):S1-6.
126. Sleight P. The importance of the autonomic nervous system in health and disease. *Aust N Z J Med* 1997;27:467-73.
127. Frary A, Nesbitt TC, Grandillo S, Knaap E, Cong B, Liu J i sur. fw2.2: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* 2000;289:85-8.
128. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R i sur. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-6.

## 10. ŽIVOTOPIS

**Datum i mjesto rođenja:** 16. rujna 1971, Šibenik, Hrvatska

**Adresa:**



**Akadska titula:** 1996. Doktor medicine, Sveučiliste u Zagrebu

**Fakultetsko obrazovanje:** 2000 - Poslijediplomski znanstveni studij  
Temeljne i kliničke medicinske znanosti, smjer  
Klinička medicina, Medicinski fakultet Sveučilista u  
Splitu  
1990 - 1996. Medicinski fakultet Sveučilista u  
Zagrebu

**Radno iskustvo:** 2005 - Specijalizant interne medicine,  
Trinitas Hospital, Seaton Hill University, New  
Jersey, SAD  
2002 – 2005. Postdoctoral research fellow, Human  
and Molecular Genetic Center, Department of  
Physiology, Medical College of Wisconsin, SAD  
2000 – 2002. Senior product specialist, Johnson &  
Johnson S.E. Zagreb, Hrvatska  
1998 – 2000. Liječnik opće prakse, Dom zdravlja  
Šibenik i Knin, Hrvatska  
1997 – 1998. Pripravnik, Dom zdravlja Šibenik,  
Hrvatska

**Članstvo u profesionalnim organizacijama:**

1997 - Hrvatski liječnički zbor  
1999 - Hrvatska liječnička komora od 1999.  
2003 - World Association of Croatian  
Physician (WACP)

**Ostale aktivnosti:** 1996 - 1997. Predsjednik Studentske udruge  
Medicinskog fakulteta Zagreb - Hipokrat  
1994 - 1996. Studentski predstavnik u Vijeću godišta  
na Medicinskom fakultetu Zagreb

**Nagrade:**

1995 - 1996. Godišnje stipendije Sveučilišta u Zagrebu

**Publikacije i prezentacije na znanstvenim skupovima:**

1. Bilusic M, Barreto N, Tschannen M, Moreno Quinn C, Harris EL, Porteous WK, Thompson CM, Grigor MR i sur. Intermediate phenotyping of GH.BN congenics suggests traits underpinning hypertension (u pripremi za *Physiological Genomics*).
2. Bilusic M, Barreto N, Tschannen M, Harris J, Jacob HJ, and Kwitek EA: Double congenics BN.GH2.18 – an animal model for threshold effect in hypertension? Prezentacija na znanstvenom skupu The Biology of Genomes, svibanj 2005. Cold Spring Harbor, NY, SAD.
3. Bilusic M, Bataillard A, Tschannen M, Gao L, Barreto N, Vincent M, Tao W, Jacob HJ, Sassard J, Kwitek AE: Mapping the genetic determinants of hypertension, metabolic diseases and related phenotypes in the Lyon hypertensive rat. *Hypertension* 2004;44:695-701.
4. Bilusic M, Barreto N, Tschannen M, Harris J, Jene S, Jacob HJ, and Kwitek EA: Congenic BNGH2 – normotensive strain despite increased vasopressor sensitivity and T3 level. Prezentacija na znanstvenom skupu FASEB, travanj 2004. Washington, DC, SAD.
5. Bilusic M, Barreto N, Tschannen M, Harris J, Jene S, Jacob HJ, and Kwitek EA: Congenic BNGH18 rats – an animal model for impaired baroreceptor sensitivity? Prezentacija na znanstvenom skupu Physiological Genomics & Rat Models Meeting, prosinac 2003. Cold Spring Harbor, NY, SAD.
6. Bilusic M, Barreto N, Tschannen M, Harris J, Jene S, Jacob HJ, and Kwitek EA: BNGH6 rats for the genetic dissection of hypertension? Poster prezentacija na znanstvenom skupu FASEB, travanj 2003. San Diego, CA, SAD.
7. Bilusic M, Bataillard A, Gao L, Tschannen M, Kwitek EA, Jacob HJ, and Sassard J. Quantitative trait loci mapping for blood pressure and related phenotypes in a cross between Lyon hypertensive (LH) and Lyon normotensive (LN) rats. Poster prezentacija na znanstvenom skupu Council for High Blood Pressure Research, rujan 2002. Orlando, FL, SAD.
8. Mahovlic V, Audy-Jurkovic S, Ovanin-Rakic A, Bilusic M, Veldic M, Babic D, Bozikov J, Danilovic Z. Digital image analysis of silver-stained nucleolar organizer region-associated proteins in endometrial cytologic samples. *Analyt Quant Cytol Histol* 1999; 21: 47-53.