

# Određivanje obrasca lncRNA molekula PACER i ZEB1-AS1 u pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca

---

Pavlović, Nikola

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:147057>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-09**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

**Nikola Pavlović**

**ODREĐIVANJE OBRASCA lncRNA MOLEKULA PACER  
I ZEB1-AS1 U PACIJENATA S KALCIFICIRAJUĆOM  
STENOZOM AORTNIH ZALISTAKA SRCA**

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

«Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za epigenetiku i molekularnu medicinu, Zavoda za medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Frane Paića u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta „Karakterizacija biomarkerskog potencijala dugih nekodirajućih RNA molekula u bolestima aortnih zalistaka srca". Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar eksperimentalne biologije.»

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

### ODREĐIVANJE OBRASCA lncRNA MOLEKULA PACER I ZEB1-AS1 U PACIJENATA S KALCIFICIRAJUĆOM STENOZOM AORTNIH ZALISTAKA SRCA

Nikola Pavlović

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Novije spoznaje ukazuju na izuzetno važnu regulatornu ulogu dugih nekodirajućih RNA (lncRNA) molekula u intrauterinom i postnatalnom razvoju i homeostazi krvožilnog sustava. No unatoč tome, izuzetno malo se zna o ekspresijskom obrascu i funkciji molekula lncRNA u razvoju i progresiji kalcificirajuće stenozе aortnih zalistaka srca (CAVS). Cilj ovog diplomskog rada bio je odrediti ekspresijski obrazac lncRNA PACER i ZEB1-AS1 u perifernoj cirkulaciji pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca kao i zdravih kontrolnih ispitanika te odrediti povezanost ekspresije cirkulirajućih lncRNA PACER i ZEB1-AS1 s učestalošću kalcificirajuće stenozе aortnih zalistaka srca. Kvaliteta i kvantiteta ukupne RNA izolirane uporabom modificiranog reagensa Trizol iz uzoraka krvne plazme pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca i kontrolnih ispitanika odredila se pomoću spektrofotometra NanoDrop. Nakon reverzne transkripcije, analiza ekspresije ciljanih molekula lncRNA PACER i ZEB1-AS1 izvršila se metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu, uporabom CFX-96 qRT-PCR detekcijskog sustava. Statističkom analizom je utvrđeno da je ekspresija lncRNA PACER u perifernim uzorcima krvi pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca značajno veća u odnosu na ekspresijske vrijednosti detektirane u perifernoj krvi kontrolnih ispitanika, a lncRNA ZEB1-AS1 u perifernim uzorcima krvi pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca i kontrolnih ispitanika nije zabilježena.

(38 stranica, 11 slika, 4 tablice, 120 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: nekodirajuće RNA, aortna stenozа, ZEB1-AS1, PACER, qRT-PCR

Voditelj: doc. dr. sc. Frane Paić

Suvoditelj: prof. dr. sc. Vesna Benković

Ocjenitelji: izv. prof. dr. sc. Maja Matulić, izv. prof. dr. sc. Renata Šošarić, izv. prof. dr. sc.

Jasna Lajtner

Rad prihvaćen: 26.11.2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

### PROFILE OF PACER AND ZEB1-AS1 LONG NON-CODING RNAs IN PATIENTS WITH CALCIFIC AORTIC VALVE STENOSIS

Nikola Pavlović

Rooseveltova trg, 10000 Zagreb, Croatia

Recent studies suggest an extremely important regulatory role of long noncoding RNA (lncRNA) molecules in intrauterine and postnatal development and vascular homeostasis. Nevertheless, extremely little is known about the expression profile and function of lncRNA molecules in the development and progression of calcific aortic valve stenosis (CAVS). The aim of this thesis was to determine the expression profile of lncRNA PACER and ZEB1-AS1 in the peripheral circulation of CAVS patients as well as in healthy control subjects and compare the quantity of circulating cell-free lncRNA PACER and ZEB1-AS1 expression with the frequency of calcification. Total RNA was isolated using modified Trizol reagent from blood plasma samples of CAVS patients and control subjects, the quality and quantity of RNA was determined using a NanoDrop spectrophotometer. After reverse transcription, the expression analysis of the target lncRNA molecules PACER and ZEB1-AS1 was performed by quantitative PCR method. Statistical analysis showed that the expression of lncRNA PACER in peripheral blood samples of CAVS patients was significantly higher than the expression values detected in the peripheral blood of control subjects, and the expression of lncRNA ZEB1-AS1 in peripheral blood samples of CAVS patients and control subjects was not detected.

(38 pages, 11 figures, 4 tables, 120 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: lncRNAs, aortic stenosis, PACER, ZEB1-AS1, qRT-PCR

Supervisor: Dr. Frane Paić, Asst. Prof.

Cosupervisor: Dr. Vesna Benković, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Maja Matulić, Assoc. Prof., Dr. Renata Šoštarić, Assoc. Prof., Dr. Jasna

Lajtner, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 26.11.2020.

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Duge nekodirajuće regulatorne molekule lncRNA.....	8
1.2. lncRNA PACER i ZEB1-AS1.....	11
2. HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA.....	12
3. MATERIJALI I METODE.....	13
3.1. Ispitanici.....	13
3.2. Skupljanje uzoraka pune krvi.....	13
3.3. Izolacija krvne plazme.....	14
3.4. Kvantitativna analiza RNA metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu.....	14
3.5. Statistička obrada rezultata.....	17
4. REZULTATI.....	18
4.1. Analiza dobi i spola ispitanika.....	18
4.2. Izolacija i kvantifikacija RNA iz uzoraka krvi.....	19
4.3. qRT-PCR analiza lncRNA PACER I ZEB1-AS1.....	21
5. RASPRAVA.....	22
6. ZAKLJUČCI.....	25
7. LITERATURA.....	26
8. ŽIVOTOPIS.....	37

## POPIS KRATICA

AVEC - rezidencijalne endotelne stanice (engl. *aortic valve endothelial cells*)

AVIC - intersticijske stanice (engl. *aortic valve interstitial cells*)

AVS - aortna valvularna stenoza

CAVS - kalcificirajuća aortna stenoza (engl. *calcific aortic valve stenosis*)

BAVS - stenoza bikuspidalnog zalistka (engl. *bicuspid aortic valve stenosis*)

lncRNA – duge nekodirajuće RNA (engl. *long non-coding RNAs*)

ncRNA- nekodirajuće RNA (engl. *non-coding RNAs*)

PFP – plazma bez trombocita (engl. *platelet-free plasma*)

SAVR – kirurška implantacija aortnog zalistka (engl. *surgical aortic valve replacement*)

SD - standardna devijacija

TAVR - transkateterska implantacija aortnog zalistka (engl. *transcatheter aortic valve replacement*)

VIC - valvularne intersticijske stanice (engl. *valvular interstitial cells*)

## 1. UVOD

Stenoza aornih zalistaka srca predstavlja najučestalije oboljenje srčanih zalistaka u razvijenim zemljama svijeta [1-3]. Nakon sistemske arterijske hipertenzije i bolesti koronarnih arterija ova bolest čini treći vodeći uzrok kardiovaskularnih oboljenja. Ona je ujedno i glavna indikacija kirurške zamjene aornih zalistaka među odraslim stanovništvom svijeta te druga indikacija operativnih zahvata na srcu [4].

Poboljevanje (morbiditet) i smrtnost (mortalitet) povezani s ovom bolešću u stalnom su porastu te s povećanjem starosne dobi svjetskog stanovništva poprimaju karakteristike epidemije [5-7].

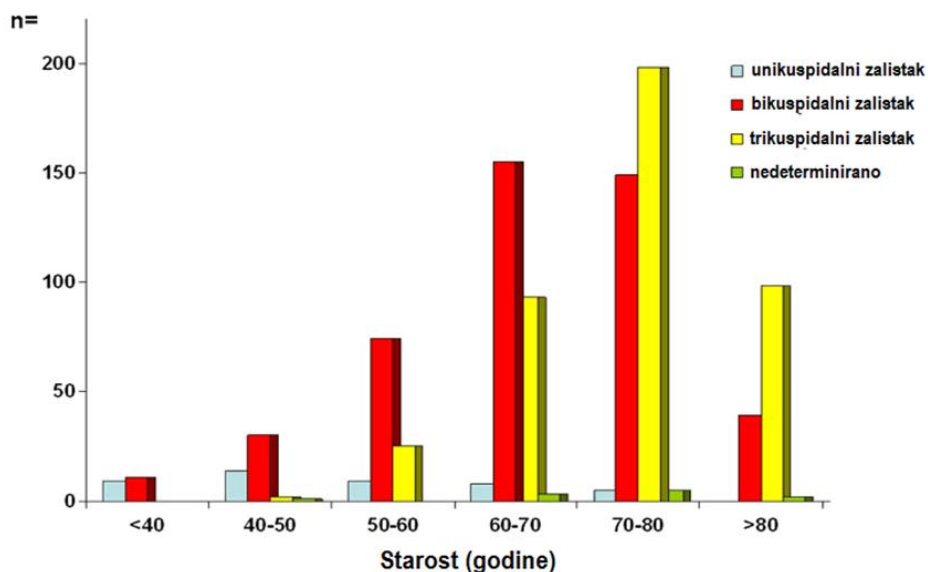
Glavni uzrok bolesti je zadebljanje, fibroza i degenerativna kalcifikacija prethodno normalnog trikuspidnog aornog zalistka (CAVS, engl. *calcific aortic valve stenosis*) ili urođenog bikuspidnog aornog zalistka (BAVS, engl. *bicuspid aortic valve stenosis*), dok reumatska groznica čini svega 10% ovog oboljenja [2,7,8].

U pozadini stenoze aornih zalistaka srca u rijetkim slučajevima (< 1%) također može biti urođena (kongenitalna), unikuspidalna (0,02% odrasle populacije) i kvadrikuspidalna (0,008-0,03% opće populacije) anomalija srca [7-11].

Premda se glavni patobiološki procesi koji stoje u pozadini kalcifikacije trikuspidnog i bikuspidnog aornog zalistka srca značajno preklapaju, bolest se kod pacijenata s bikuspidnim aornim zalistkom javlja jedan do dva desetljeća prije nego kod pacijenata s trikuspidnim aornim zalistkom [12-18].

Stoga kod pacijenata mlađih od 70 godina prevladava kalcifikacija kongenitalnih bikuspidalnih aornih zalistaka, a kod osoba starijih od 70 godina degenerativna (senilna) kalcificirajuća stenoza trikuspidnih aornih zalistaka srca (Slika 1).



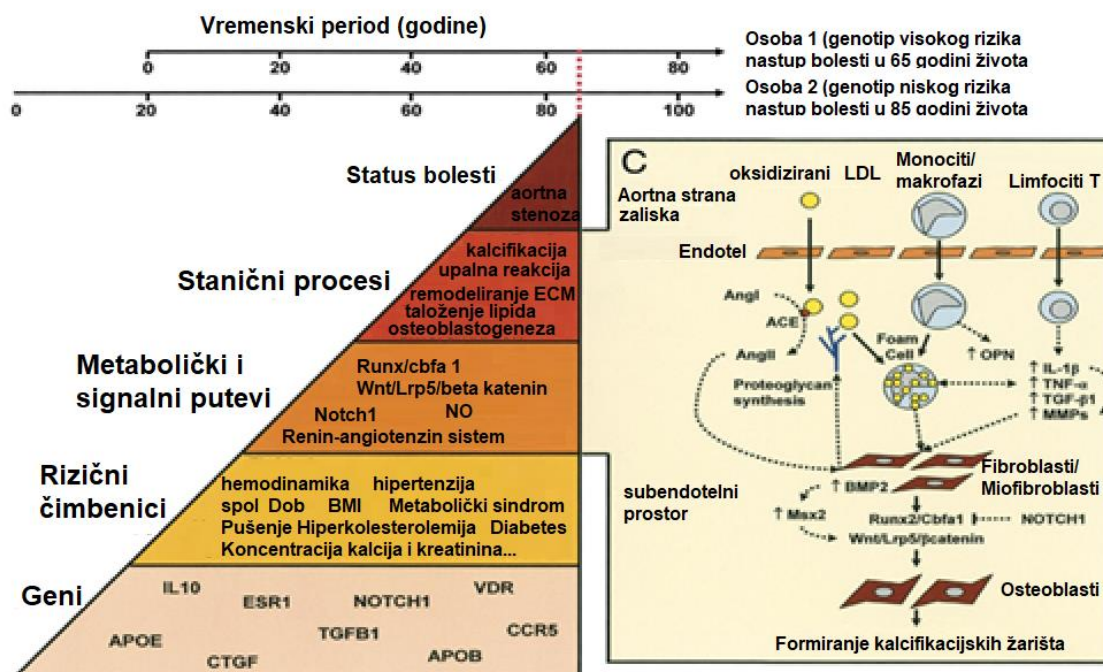


*Slika 1. Stratifikacija stenoze aortnih zalistaka srca prema starosnim grupama pacijenata. (Modificirano prema: [18].)*

Patohistološki razlikujemo dvije sukcesivne faze CAVS-a. U ranom stadiju bolest se manifestira u vidu aortne skleroze, odnosno blagim zadebljanjem aortnog zalistka koje ne dovodi do poremećaja srčane hemodinamike. Znatno kasnije dolazi do razvoja aortne stenoze koja se manifestira izraženom kalcifikacijom aortnog zalistka, njegovom sve manjom pokretljivošću te posljedično opstrukcijom protoka krvi iz lijeve srčane klijetke u aortu, što na kraju rezultira hipertrofijom srca, fibrozom miokarda te progresivnom disfunkcijom i zatajenjem srca [3, 12, 13, 19].

U osnovi se radi o aktivnom patobiološkom procesu za kojeg je moguće utvrditi inicijacijske, biokemijske, humoralne, genetičke i kliničke čimbenike rizika i predispozicije te stanične i molekularno biološke putove koji posreduju i upravljaju tijekom bolesti [3].

U rizične aterogene čimbenike inicijacije i progresije kalcificirajuće stenoze aortnih zalistaka srca ubrajaju se hiperhomocisteinemija, hiperlipidemija, poremećena koncentracija serumskog kalcija, fosfora i kreatina, pušenje, metabolički sindrom, šećerna bolest, hipertenzija, kronično zatajenje bubrega te muški spol i dob pacijenta (Slika 2) [20-26].



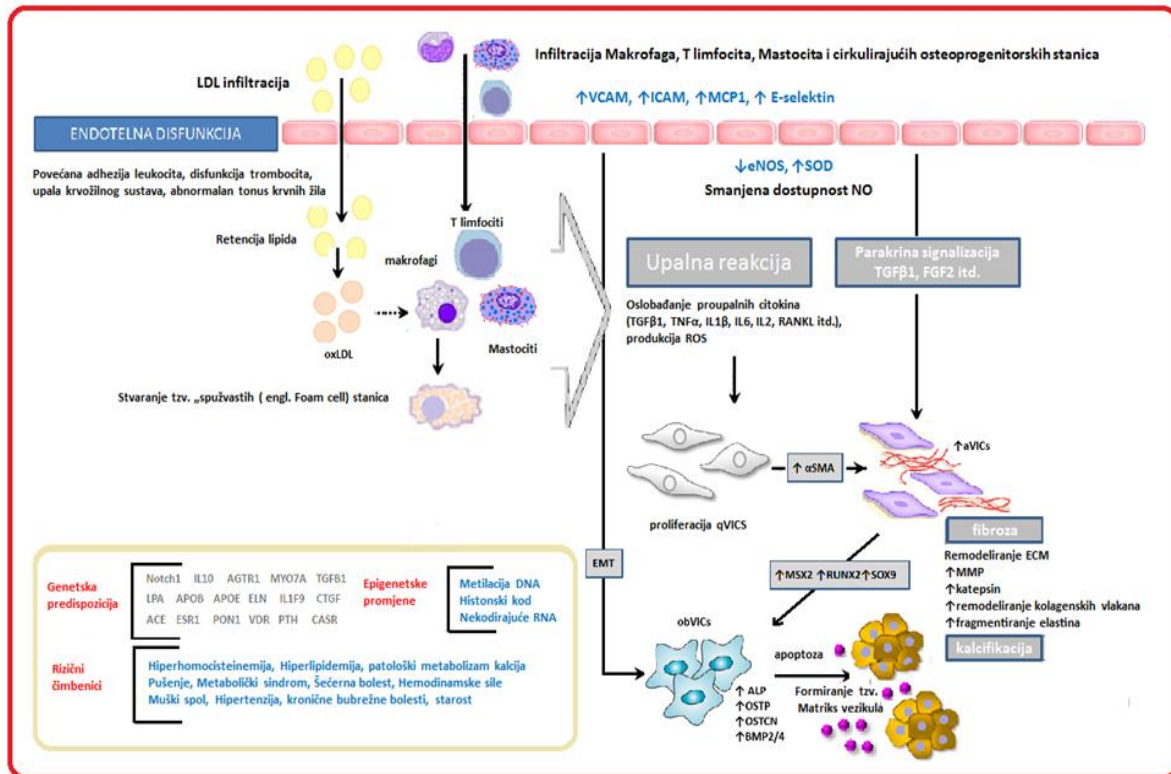
Slika 2. Shematski prikaz rizičnih čimbenika, genetske predispozicije i patohistološkog procesa odgovornog za nastanak i razvoj kalcificirajuće aortne stenoze. (Modificirano prema: [26].)

Osim toga poznati su i brojni genetički čimbenici koji stoje u pozadini razvoja kalcificirajuće stenoze bikuspidnog i trikuspidnog aortnog zaliska [26, 27-47].

Nadalje, kao i većina aktivnih bioloških procesa, kalcificirajuća stenoza aortnih zalistaka srca podložna je djelovanju složenih i međusobno preklapajućih signalnih putova te pozitivnim i negativnim regulatornim mrežama i povratnim petljama koje orkestriraju regrutaciju, diferencijaciju, funkciju i preživljavanje ključnih stanica uključenih u patogenezu CAVS-a (rezidencijalnih endotelnih (AVEC, engl. *aortic valve endothelial cells*) i intersticijskih stanica (AVIC, engl. *aortic valve interstitial cells*) aortnih zalistaka srca) te reguliraju njihovu interakciju s drugim, infiltrirajućim stanicama (npr. cirkulirajućim osteoprogenitorskim stanicama, monocitima/makrofazima, mastocitima, limfocitima T) ili proteinskim komponentama izvanstaničnog matriksa [3, 17, 18, 48-54].

Poznati su i svi bitni stanični mehanizmi nastanak CAVS-a: endotelna disfunkcija, subendotelna infiltracija inflamatornih i cirkulacijskih osteoprogenitorskih stanica, gomilanje lipida, oksidativni stres, neoangiogeneza, remodeliranje i biomineralizacija međustaničnog matriksa te aktivacija, proliferacija i osteogena diferencijacija stanica AVIC (Slika 3).

Endotelno-mezenhimska transformacija endotelnih stanica i cirkulirajuće osteoprogenitorske stanice također mogu pridonijeti osteogenoj transformaciji stanica VIC.



Slika 3. Molekularni mehanizmi bitni za nastanak i razvoj kalcificirajuće stenozе aortnih zalistaka srca: endotelna disfunkcija, infiltracija inflamatornih i cirkulacijskih osteoprogenitorskih stanica, gomilanje lipida, oksidacija, neoangiogeneza, remodeliranje i biomineralizacija međustaničnog matriksa te aktivacija, proliferacija i osteogena diferencijacija stanica AVIC (engl. aortic valve interstitial cells). Endotelno-mezenhimska transformacija endotelnih stanica i cirkulirajuće osteoprogenitorske stanice također mogu pridonijeti osteogenoj transformaciji stanica AVIC (autor slike: Paić F., nepublicirani podatci.).

Navedenim čimbenicima uzrokovane fibrozne i kalcifikacijske patohistološke promjene aortnog zalistka su obično koncentrirane na hemodinamski predisponiranoj strani aortnih zalistaka srca (*pars fibrosa*; sloj zalistka okrenut prema korijenu aorte) te su izraženije kod pacijenata s uznapredovalim stadijem bolesti [25].

Do sada je identificiran veći broj različitih biomarkera [npr. natriuretski peptid tipa B (BNP); prohormon N-terminalni natriuretski peptid tipa B (NTproBNP); H-FABP (engl. *Heart-type cytosolic fatty acid binding protein*); troponin visoke osjetljivosti, C-reaktivni protein visoke osjetljivosti (hsCRP); monocitni kemotaktički protein-1 (MCP-1); enzimi koji sudjeluju u remodeliranju izvanstaničnog matriksa: matriks metaloproteinaze (MMP), tkivni inhibitori matriks metaloproteinaza (TIMPs), transformirajući čimbenik rasta B1 (TGF-B1), interleukinski receptor sST2 i  $\beta$ -galaktozidazni protein galektin 3 (Gal-3); markeri kalcifikacije aortnog zalistka kao što je fosfolipaza A2 povezana s lipoproteinom (Lp-PLA2) i lipoprotein a (Lp [a]); markeri sistemskog stresa: poput faktora diferencijacije rasta 15 (GDF-15) i faktora diferencijacije rasta 11 (GDF-11); markeri oksidacije lipida i DNA: malondialdehid (MDA) i 8-hidroksi-2-deoksigvanozin (8-OHdG), itd] koji, korišteni pojedinačno ili u kombinaciji, odražavaju (u određenom stupnju) patofiziološku progresiju AVS-a, naknadnu hemodinamičku opstrukciju, remodeliranje, oksidativni stres i ozljede miokarda te razinu sistemske upale kao i krajnji ishod terapije prije ili nakon provedene kirurške implantacije aortnog zalistka (SAVRS, engl. *surgical aortic valve replacement*) ili transkateterske implantacije aortnog zalistka (TAVR, engl. *transcatheter aortic valve replacement*) (npr. srčana smrt, angina, infarkt miokarda, novonastalu fibrilaciju atrija i dekompenzacijsko zatajenje srca). Od svih navedenih NTproBNP i troponin su jedini koje se često određuje u kliničkoj praksi. No unatoč svemu, svi oni kao i ostali navedeni biomarkeri još uvijek zahtijevaju značajno prospektivno istraživanje i procjenu njihove korisnosti u kliničkoj skrbi pacijenta prije nego što se mogu ugraditi u glavne smjernice za rutinsko kliničko zbrinjavanje specifične populacije pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca (CAVS) [55-59].

Budući da je optimalan vremenski period za praćenje i odabir perioda intervencije kod pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca još uvijek kontroverzan i nedovoljno precizan, potpuniji uvidi u patofiziologiju i vremenski tijek bolesti pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca te razvoj specifičnih neinvazivnih biomarkera (selekcija pojedinaca s povećanim rizikom za razvoj CAVS-a, procjena brzine napretka patološkog procesa, prognoza disfunkcija bioprostetskog zalistka te detekcija pacijenata kod kojih postoji povećani rizik nepovoljnog kliničkog ishoda), zajedno s napretkom dijagnostičkih metoda oslikavanja od najvećeg su značaja za kliničko upravljanje i/ili prevenciju CAVS-a [19, 60-65].

Trenutno ne postoje učinkoviti farmakološki lijekovi za sprječavanje ili usporavanje napredovanja CAVS-a te je zamjena aortnog zalistka biološkom ili mehaničkom protezom, bilo standardnim kirurškim (SAVR) ili manje invazivnim transkateterskim (TAVR) pristupom još uvijek jedina klinička terapija koja nam stoji na raspolaganju za terapiju ovog oboljenja [19, 60-65].

Unatoč tome, zbog uznapredovale dobi ili više pridruženih komorbiditeta za više od 30% starijih bolesnika s CAVS-om, operativni zahvat nije indiciran, a njihova se skrb, posebno u zemljama s profesionalno i tehnički nerazvijenim medicinskim sustavom, svodi uglavnom na paliјativnu skrb.

Nažalost, bez operativnog pristupa, učestalost štetnog ishoda u ovoj populaciji bolesnika s teškim CAVS-om iznosi oko 2% mjesečno, s približnom stopom smrtnosti od ~ 50% u roku od dvije godine od pojave simptoma [56, 62]. Međutim, unatoč ozbiljnom kliničkom značaju, još uvijek vrlo malo razumijemo o patohistogenezi CAVS-a. Ublažavanje ovog sve većeg medicinskog i ekonomskog opterećenje zdravstvenog sustava, od početne dijagnoze do trenutka uspješne kliničke intervencije zahtijevat će između ostalog translacijske znanstvene inovacije u području neinvazivnih biomarkera i bolje, sveobuhvatnije razumijevanje molekularnih mehanizama i staničnih signalnih putova specifičnih za različite faze CAVS-a tako da se terapijski ciljevi za pravovremeni tretman pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca mogu identificirati prije nego što dođe do klinički relevantnog oštećenja tkiva aortnih zalistaka srca [18].

Novija zapažanja sugeriraju da se puni patološki spektar lezija kod kalcificirajuće stenozе aortnih zalistaka srca ne može u potpunosti objasniti nasljednom predispozicijom ili rastućim popisom različito izraženih gena. Štoviše, tradicionalni genetski pogledi ne objašnjavaju dovoljno poznatu vezu između CAVS-a, proaterogenih rizičnih čimbenika i utjecaja okoliša naklonjenih razvoju ove bolesti [22].

S vremenom je postalo jasno da su u cijeli proces uključeni i drugi regulatorni mehanizmi te su otkriveni uvjerljivi argumenti koji govore u prilog epigenetske regulacije navedenih procesa [22, 25, 66-82].

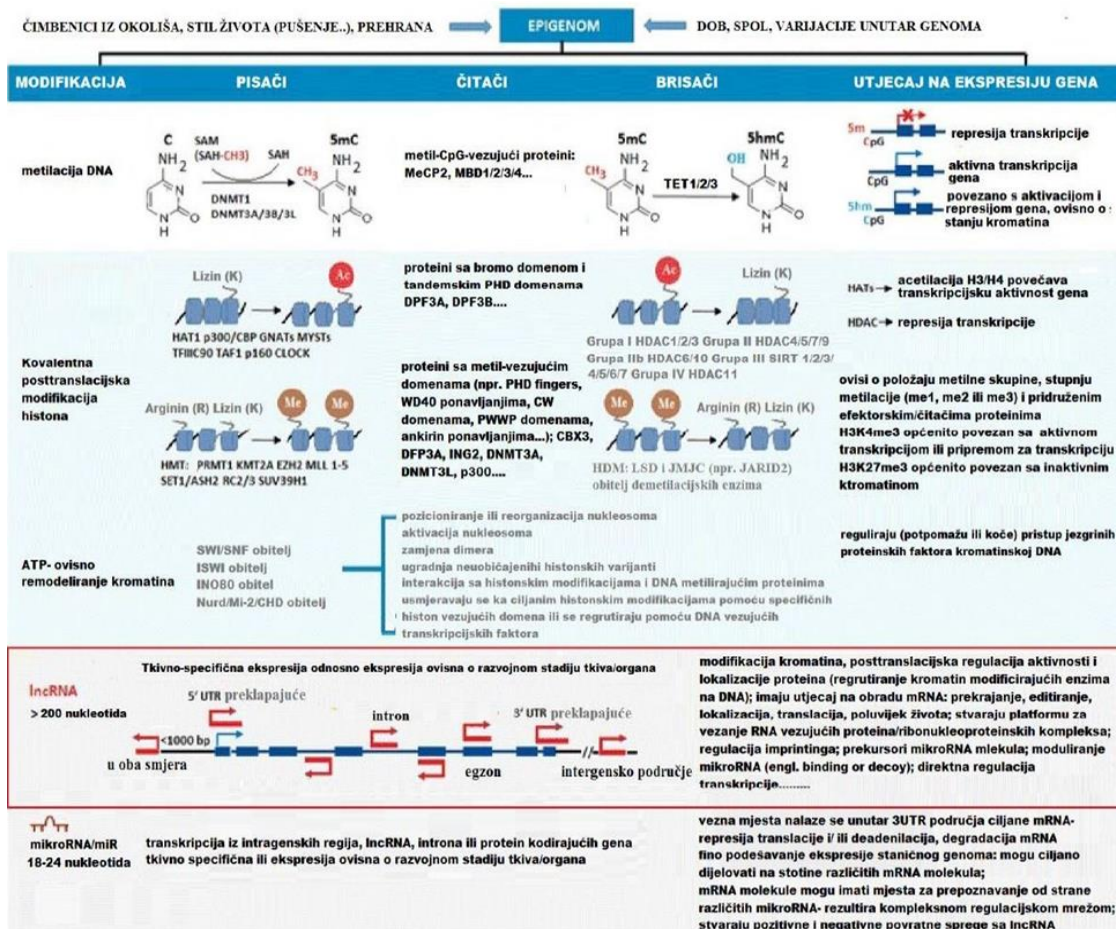
Pod tim pojmom podrazumijevamo mitotički i mejotički stabilne (nasljedne) i funkcionalno relevantne modifikacije DNA i kromatina koje nisu uzrokovane izmjenama (mutacijama) u primarnom/nukleotidnom slijedu DNA [22, 25, 66-82].



Opisana su četiri glavna epigenetska mehanizma (Slika 4):

- metilacija i hidroksimetilacija DNA,
- kovalentna post-translacijska modifikacija histona i ugrađivanje histonskih varijanti,
- remodeliranje kromatina i
- nekodirajuće regulatorne molekule RNA (ncRNA), uključujući tu male, mikro RNA (mikroRNA/miR; ~ 8-24 pb) i duge nekodirajuće molekule RNA (lncRNA; >200 pb) [66-82].

S obzirom na uključenost navedenih mehanizama u nastanak i razvoj kalcificirajuće stenozе aortnih zalistaka srca zasad se najviše zna o zastupljenosti i ulozi pojedinih regulatornih nekodirajućih molekula RNA dok su ostali epigenetički mehanizmi manje poznati.



*DNMT* - engl. DNA methyltransferase, *CBX3* - engl. Chromobox 3, *CLOCK* - engl. clock circadian regulator, *DPF3A* - engl. double PHD fingers 3a, *5hmC* - engl. 5 methyl cytosine, *HAT1* - engl. histone acetyltransferase 1, *HMT* - engl. histone methyltransferase, *ING2* - engl. inhibitor of growth family member 2, *KMT2A* - engl. lysine methyltransferase 2a, *MeCP2* - engl. methyl CpG binding protein 2, *MBD1* - engl. methyl-CpG-binding domain protein 1, *MLL 1-5* - engl. family of lysine methyltransferases, *MYST* - engl. family of histone acetyltransferase, *p300* - engl. histone acetyltransferase P300, *PRMT1* - engl. protein arginine methyltransferase 1, *p160* - engl. MYB binding protein 1a, *SAM* - engl. S-adenosyl methionine, *SET1/ASH2* - engl. histone methyltransferase complex, *SUV39* - engl. *H1* histone-lysine N-methyltransferase, *TET1/2/3* - engl. Tet Methylcytosine Dioxygenase 1/2/3, 3'UTR - engl. 3 untranslated region → smisljeni lanac, ← protusmljeni lanac

Slika 4. Shematski prikaz epigenetskih mehanizama. Modificirano prema: [67].

## 1.1. Duge nekodirajuće regulatorne molekule lncRNA

Općenito, ncRNA se mogu klasificirati u dvije skupine: „infrastrukturne“ ncRNA (npr. tRNA, rRNA, snRNA i snoRNA) koje su konstitutivno izražene i potrebne za provođenje osnovnih staničnih procesa te epigenetski relevantne regulatorne ncRNA koje su uglavnom izražene ovisno o razvojnem stadiju ili prema tkivno-specifičnom obrascu ili kao odgovor na različite stresne podražaje te s obzirom na inicijaciju/napredovanje bolesti [67, 86, 88].

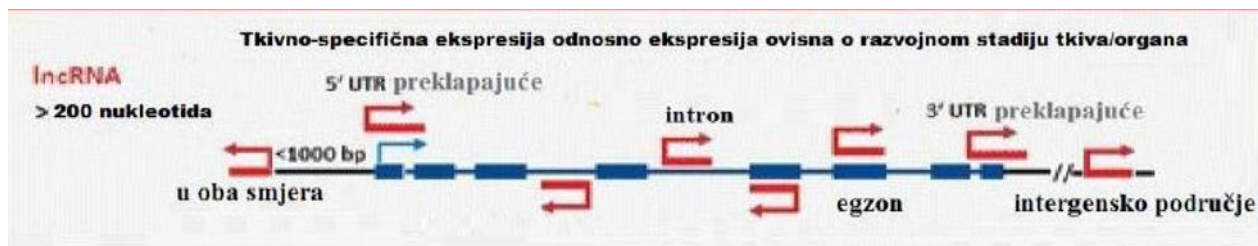
Postoji široka lepeza funkcionalno i strukturno različitih regulatornih ncRNA molekula koje se transkribiraju u stanicama sisavaca, a većina ih je još uvijek nedovoljno okarakterizirana.

Općenito se opisuju prema duljini zrelog transkripta te položaju i orijentaciji s obzirom na najbliži gen koji kodira proteine. Najveći dio nekodirajućeg transkriptoma sisavaca čini heterogena skupina dugih molekula lncRNA (> 200 nukleotida) te kratkih ncRNA kao što su različite siRNA (engl. *small interfering RNA*) i molekule mikro RNA [86, 93-95]. miRBase baza podataka poznatih i predviđenih endogenih mikro RNA u različitim životinjskim i biljnim vrstama dostupna na Fakultetu prirodnih znanosti Sveučilišta u Manchesteru (<http://www.mirbase.org>) navodi više od 1872 prekursora i 2578 zrelih ljudskih sekvenci mikro RNA, dok baza podataka za transkripte lncRNA, LNCipedia (<http://www.lncipedia.org>), uključuje više od 127802 transkripta humanih molekula lncRNA. Do sada je samo nekoliko lncRNA detaljno analizirano kod viših vrsta i pokazalo se da imaju funkcionalnu ulogu u regulaciji gena koji kodiraju proteine [93-96].

Molekule lncRNA čine heterogenu skupinu regulatornih molekula RNA koja pored ostalog obuhvaća intergenske lncRNA, protusmislene (engl. *antisens*) transkripte lncRNA i molekule eRNA (engl. *enhancer lncRNA*) [67, 93-96].

Većina lncRNA karakterizirana je lokalizacijom unutar stanične jezgre, niskom ekspresijom i niskom razinom očuvanja (evolucijske konzerviranosti) svog nukleotidnog slijeda. Prema svom položaju i orijentaciji s obzirom na najbliže gene koji kodiraju proteine lncRNA se mogu klasificirati u smislene (engl. *sense*), protusmislene (engl. *antisense*), dvosmjerne, intronske ili intergenske lncRNA (Slika 5) [67, 93-96].

Različite molekule lncRNA mogu također djelovati kao primarni transkripti za proizvodnju kratkih molekula ncRNA (npr. mikro RNA) [67, 93-96].

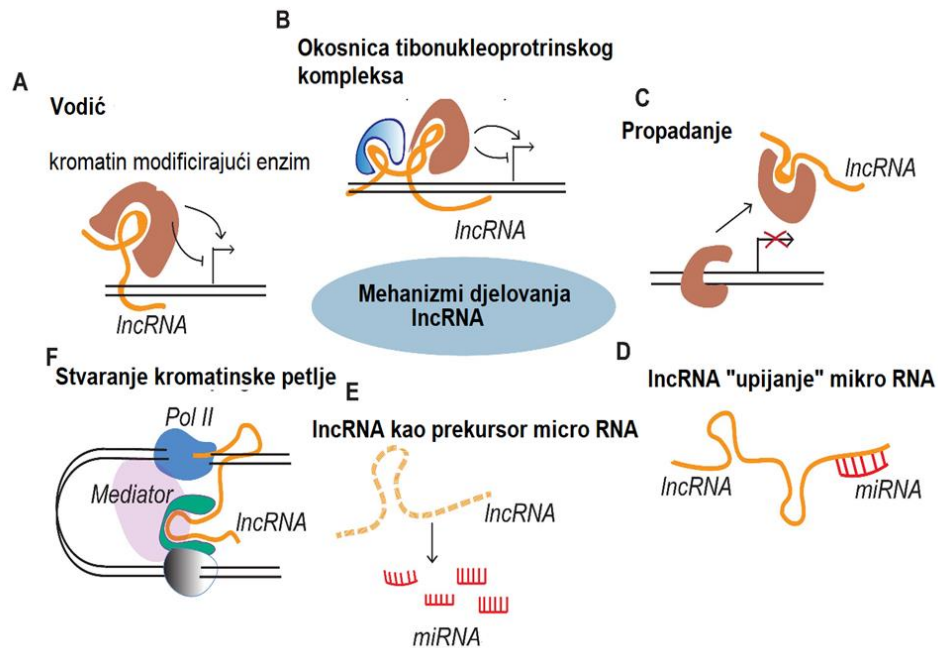


Slika 5. Genomska orijentacija i položaj različitih molekula lncRNA. Crvene strelice s lijeva na desno označavaju istosmislene (engl. *samesens*) transkripte lncRNA, dok u obrnutom smjeru predstavljaju protusmislene (engl. *antisense*) transkripte lncRNA. Preuzeto iz: [67].

Većina lncRNA transkribiraju se kao mreže preklapajućih smislenih i protusmislenih transkripata RNA. Naprimjer, u ljudskim stanicama više od polovice transkribiranih lokusa lncRNA imaju obrazac protusmislene transkripcije što sugerira njihovu ulogu u transkripcijskoj regulaciji komplementarnih molekula mRNA. Utvrđeno je da lncRNA reguliraju ekspresiju susjednih gena i neke udaljene genomske sekvence koje mogu posredovati u epigenetskoj modifikaciji DNA molekula regrutiranjem kompleksa zaduženih za remodeliranje kromatina djelujući tako kao modulatori dostupnosti DNA ili uspostavljajući epigenetske obrasce specifične za određeni tip stanica [67, 93-96].

Neke od molekula lncRNA potiču transkripcijsku represiju gena ili djeluju kroz sekundarne interakcije s transkripcijskim (ko)faktorima, modulirajući tako njihovu aktivnost (npr. sposobnost vezanja drugih koregulatora ili prepoznavanja veznih motiva) ili kontrolirajući njihovu unutarstaničnu lokalizaciju (Slika 6) [67, 93-96].





Slika 6. Shematski prikaz različitih funkcionalnih uloga molekula lncRNA. (A) Vodići (engl. guide) lncRNA aktiviraju ili potiskuju ekspresiju gena relokalizacijom regulatornih čimbenika. (B) Tzv. scaffold lncRNA pomažu u stvaranju kompleksa ribonukleoproteina (RNP). (C) "Mamci" lncRNA uklanjaju regulatorni faktor vezan za genom i time prekidaju njegovu regulaciju. (D) lncRNA uklanjaju mikro RNA (engl. „sponging”), čime inhibiraju mikro RNA (miRNA) molekulama posredovanu represiju gena. (E) lncRNA kao preteče miRNA se prerađuju u zrele miRNA. (F) Transkripcija lncRNA iz regulatornih regija genoma pokreće regulaciju gena dugog dometa. Modificirano prema: [96].

Nadalje, endogene antisense lncRNA (parovi sens-antisense RNA) mogu utišati komplementarne molekule mRNA, regulirati njihovo posttranskripcijsko prekrajanje (npr. odabir egzona tijekom alternativnog spajanja) ili utjecati na lokalizaciju, stabilnost, pa čak i na translaciju zrelih molekula mRNA [67, 93-96].

Osim toga molekule lncRNA sudjeluju u komplementarnom vezanju (engl. *micro RNA sponging*) molekula mikro RNA te time u regulaciji njihove aktivnosti (Slika 6) [67, 93-96].

Neke od najbolje okarakteriziranih molekula lncRNA sudjeluju u genomskom imprintingu (utiskivanju) (npr. *Kcnq1ot1* i *H19*) ili inaktivaciji X kromosoma (*Xist* i *Tsix*) ili sudjeluju u globalnoj represiji gena (npr. *lincRNA-p21* koja regulira transkripcijski odgovor posredovan genom *p53* uslijed oštećenje DNA) [67, 93-96].

S obzirom na sveprisutnost molekula lncRNA u ljudskom transkriptomu, nesumnjivo je da ima još puno primjera funkcionalnih mehanizama molekula lncRNA koji se tek trebaju otkriti.

No tek za manji broj molekula lncRNA poznata je njihova funkcionalna uloga u nastanku, razvoju i kliničkoj manifestaciji CAVS-a [67, 72, 97-104].

Pogotovo se malo zna o potencijalnom biomarkerskom potencijalu cirkulirajućih (tzv. cell-free) molekula lncRNA prisutnih u krvnoj plazmi/serumu bolesnika s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca.

## 1.2. lncRNA PACER i ZEB1-AS1

lncRNA PACER (engl. *PTGS2 Antisense NFKB1 Complex-Mediated Expression Regulator RNA / P50-Associated COX-2 Extragenic RNA*) identificirana je kao važan čimbenik koji sudjeluje u regulaciji ekspresije *COX2/PTGS2* (engl. *Cyclooxygenase 2/Prostaglandin-endoperoxide synthase 2*), ključnog enzima koji sudjeluje u sintezi prostaglandina [105]. Zajedno s drugim molekulama lncRNA (NKILA, HOTAIR, MALAT1, ANRIL, Lethe i MIR31HG) lncRNA PACER sudjeluje u regulaciji transkripcijskog čimbenika NF- $\kappa$ B (engl. *nuclear factor- $\kappa$ B*) koji ima važnu ulogu u regulaciji imunološkog odgovora te nastanku brojnih patoloških stanja poput primjerice različitih karcinoma, kardiovaskularnih bolesti, osteoartritisa, reumatoidnog artritisa, šećerne bolesti i periodontitisa [106-110].

lncRNA RNA 1 s protusmislenom sekvencom gena *ZEB1* (*ZEB1-AS1*) nalazi se u fizičkom susjedstvu gena *ZEB1* (engl. *zinc finger E-box binding homeobox 1*), ključnog transkripcijskog faktora koji regulira endotelno-mezenhimsku transformaciju [111, 112]. Patološki promjenjena ekspresija ove molekule lncRNA stoga ima važnu ulogu u nastanku brojnih malignih stanja [113, 114]. To se između ostalog očituje i kroz ulogu lncRNA *ZEB1-AS1* u regulaciji ekspresije gena *COX2* [112, 113].

Iako je povećana ekspresija gena *COX2* detektirana i u patološki promijenjenom tkivu aortnih zalistaka srca [115-120] potencijalna uloga lncRNA PACER i *ZEB1-AS1* u nastanku i razvoju CAVS-a još nije istražena.

## 2. HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA

### HIPOTEZA

Prethodni radovi pokazali su da je razina gena *COX2* povećana u kalcificiranom tkivu aortnih zalistaka srca pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca (CAVS).

Za pretpostaviti je da je ekspresijski obrazac molekula lncRNA PACER I ZEB1-AS1 koje sudjeluju u ekspresiji gena *COX2* i s njim povezanih regulatornih proteina diferencijalno izražen u perifernoj cirkulaciji (krvna plazma) pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca u odnosu na perifernu krv (krvnu plazmu) zdravih, kontrolnih ispitanika.

### CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je optimizirati metodu za izolaciju cirkulirajućih molekula lncRNA prisutnih u krvnoj plazmi pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca i zdravih kontrolnih ispitanika te odrediti:

- ekspresijski obrazac lncRNA PACER i ZEB1-AS1 u perifernoj cirkulaciji pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca,
- ekspresijski obrazac lncRNA PACER i ZEB1-AS1 u perifernoj cirkulaciji zdravih kontrolnih ispitanika te
- statističkom usporedbom prikupljenih podataka odrediti postoji li povezanost ekspresije cirkulirajućih molekula lncRNA PACER i ZEB1-AS1 s učestalošću kalcificirajuće stenozе aortnih zalistaka srca .

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Ispitanici**

Ovim istraživanjem obuhvaćeno je 38 pacijenta s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca dijagnosticiranih u Zavodu za kardijalnu i transplantacijsku kirurgiju Kliničke bolnice Dubrava u periodu od 01.10.2019.- 01.10.2020. godine.

Bolesnici s dijagnosticiranom bolešću koronarnih krvnih žila, sistemskim upalnim reakcijama, renalnom insuficijencijom, hiperparatiroidizmom ili aortnom stenozom uslijed kalcifikacije bikuspidnog aortnog zaliska (BAVS), Marfanovog sindroma ili reumatske bolesti nisu uvršteni u istraživanje.

Kontrolnu skupinu čine zdravi dobrovoljni ispitanici (n=31) bez povijesti bolesti srčanih zalistaka.

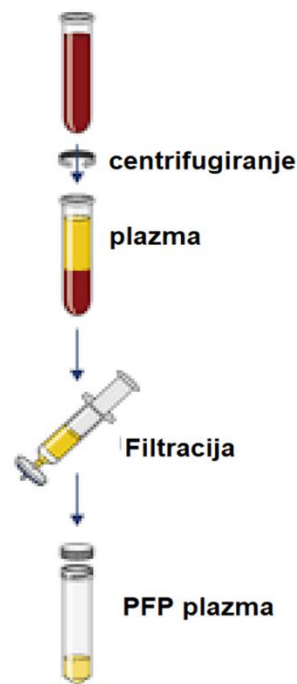
Od svih ispitanika pribavljen je potpisani informirani pristanak, a dozvolu za provedeno istraživanje dalo je na svojoj sjednici održanoj 18. lipnja 2019. godine lokalno etičko povjerenstvo Kliničke bolnice Dubrava, Zagreb [Naziv odobrenog projekta: „Ekspresijski obrazac i biomarkerski potencijal lncRNA molekula u perifernoj krvi pacijenta s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca“ (u sklopu istraživanja „Karakterizacija biomarkerskog potencijala dugih nekodirajućih RNA molekula u bolestima aortnih zalistaka srca“- voditelji projekta: doc. dr. sc. Frane Paić i doc. dr. sc. Igor Rudež)].

#### **3.2. Skupljanje uzoraka pune krvi**

Za potrebe izolacije ukupne cirkulirajuće (tzv. cell-free) RNA svim ispitanicima uključenim u ovo istraživanje venepunkcijom je uzet uzorak 5 mL pune krvi u epruvete u kojima se nalazio antikoagulans natrijev citrat. Krv je od pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca izuzeta predoperativno prije samog zahvata indicirane zamjene aortnog zalistka srca, a od kontrolnih zdravih ispitanika prilikom potpisivanja informiranog pristanka za sudjelovanje u navedenom istraživanju.

### 3.3. Izolacija krvne plazme

Periferni uzorci krvi (vakuumtajner s natrijevim citratom) u periodu od 30 minuta nakon izuzimanja centrifugirani su 15 minuta na 3000 g, a dobivena plazma filtrirana kroz sterilne filtere od 0,2  $\mu\text{m}$  kako bi se dobila plazma bez trombocita (PFP, engl. *platelet free plasma*). Dobiveni uzorci plazme PFP alikvotirani su u eppendorf epruvete od 1,5 mL i pohranjeni na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  za naknadnu analizu ekspresije lncRNA, a preostali dio krvi u vakuumtajneru s natrijevim citratom na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Slika 7).



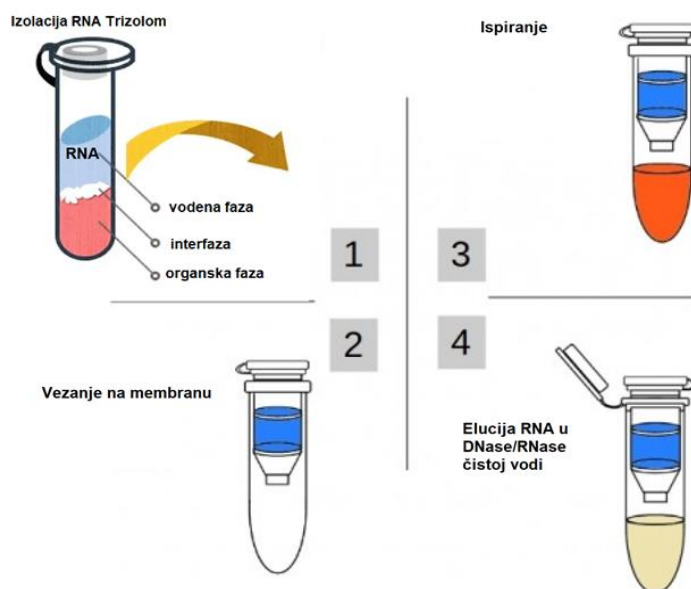
Slika 7. Shematski prikaz dobivanja plazme bez trombocita iz venske krvi ispitanika

### 3.4. Kvantitativna analiza RNA metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu

Ukupna ekstrakcija RNA iz perifernih uzoraka plazme PFP provedena je pomoću reagensa Trizol (Thermo Fisher Scientific) i kompleta *NucleoSpin RNA kit* (Macherey-Nagel) za izolaciju ukupne RNA iz uzoraka krvne plazme prema uputama proizvođača.

Ukratko, u 300 mikrolitara plazme PFP dodano je 1 mL Trizola, promiješano i inkubirano 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga u epruvetu je dodano 200 mikrolitara kloroforma te je nakon mješanja uzorak inkubiran na sobnoj temperaturi kroz 2-3 minute te centrifugiran na  $+40\text{ }^{\circ}\text{C}$  na 12000 g. Dobivena vodena faza prebačena je u nove eppendorf

epruvete uz dodatak jednakog volumena izopropanola. Nakon mješanja, po 700 mikrolitara uzorka je prebačeno u kolone Macherey-Nagel™ NucleoSpin™ RNA te dalje procesuirano slijedeći upute proizvođača (Slika 8).



Slika 8. Shematski prikaz izolacije ukupne RNA iz uzorka krvne plazme (bez trombocita) pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca i kontrolnih ispitanika

Kvaliteta i količina dobivene RNA utvrđena je uporabom spektrofotometra NanoDrop (Thermo Fischer Scientific). Po 250 ng ukupne RNA iz svakog uzorka pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca i dobrovoljnih zdravih ispitanika prepisano je u cDNA pomoću kompleta *High fidelity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fischer Scientific) prema uputama proizvođača.

Komponente reverzne transkripcije prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1. Komponente reverzno transkripcijskog master miksa

Komponenta	Volumen (μL)
10X RT pufer	2,0
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8
10X RT Random Primers	2,0
MultiScribe™ Reverzna Transkriptaza	1,0
Rnase Inhibitor	1,0
Nucelase-free H <sub>2</sub> O	3,2
Ukupni volumen	10,0

U 10  $\mu$ l cDNA je dodano 10  $\mu$ l smjese za transkripciju. Parametri reakcije prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Temperaturni parametri reverzno-transkripcijske reakcije

Parametri	1	2	3	4
Temperatura	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Vrijeme	10 minuta	120 minuta	5 minuta	$\infty$

Dobivena cDNA razrijeđena je jednom te je za potrebe kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR) korišteno po 3 mikrolitra razrijeđene cDNA. Analiza kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR) provedena je korištenjem PCR CFX-96 sustava s termoblokom C100 (Bio-Rad). Sve reakcije lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR) izvršene su u triplikatu pomoću smjese SYBR Green PCR Master Mix-a i komercijalnih setova početnica (Tablica 3) prema sljedećim uvjetima qPCR reakcije: a) 95 °C u trajanju od 30 s; b) 95 °C tokom 5 s c) 60 °C tokom 30 s, 40 ciklusa.

Tablica 3. Početnice korištene za qRT-PCR

<b>lncRNA PACER</b>	F 5-CTCCACGGGTCACCAATATAAAA-3
	R 5-ACGCATCAGGGAGAGAAATG-3
<b>lncRNA ZEB1-AS1</b>	F 5-TGGCACCCGTGACGACTTAACT-3
	R 5-GTAGTGGATCGTGTTACTGTGT-3
<b>Referentni gen - GAPDH</b>	F 5-TGCCCTCAACGACCACTTTG-3
	R 5-CCACCACCCTGTTGCTGTAG-3

Vrijednost praga ciklusa (Ct) dobivena je pomoću programa CFX96 Maestro za upravljanje, a ekspresijski podaci su analizirani korištenjem  $2^{-\Delta\Delta CT}$  metode. Relativna ekspresija ciljanih gena normalizirana je u odnosu na ekspresiju *GAPDH*, referentnog gena koji se koristio kao endogena kontrola. Specifičnost qPCR amplifikacije potvrđena je analizom krivulje taljenja.

### 3.5. Statistička obrada rezultata

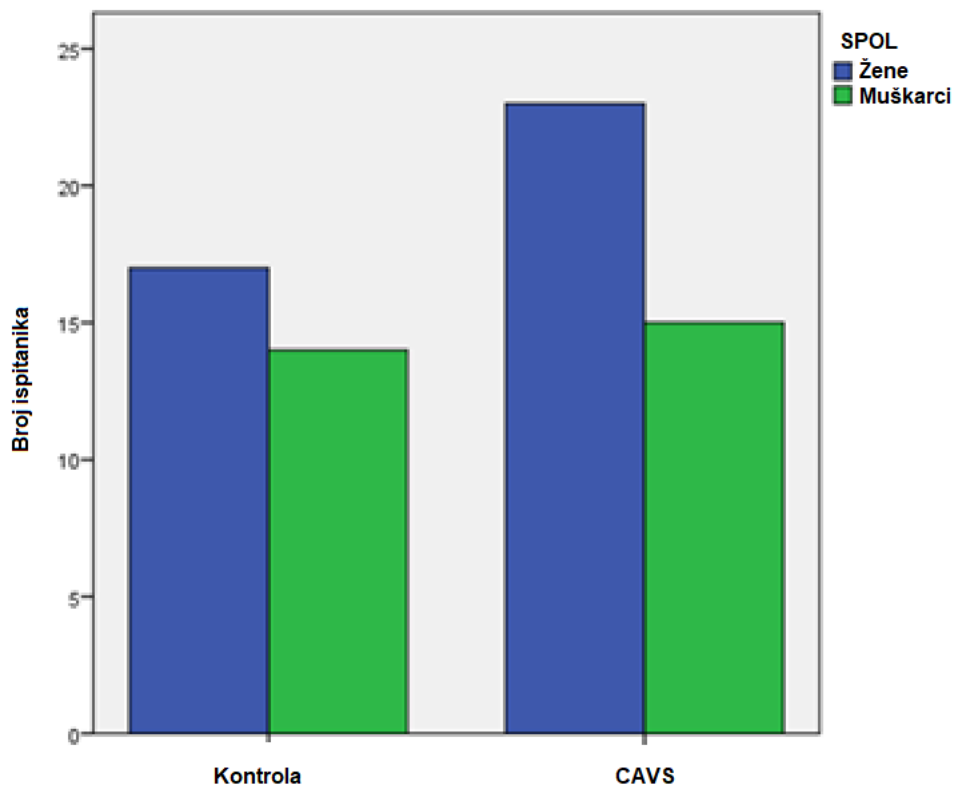
Prije statističke analize varijable su testirane na normalnu distribuciju uporabom Shapiro-Wilk statističkog testa. Varijable su prezentirane kao frekvencija  $n$  i postotak (%) te kao srednja vrijednost  $\pm$  SD ako su distribuirane normalno ili kao median i interkvartalni raspon ako su distribuirane neparametrijski. Poveznica između demografskih podataka (spol) pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca i kontrolnih ispitanika određena je pomoću  $\chi^2$  / Fisherovog testa za kategorijske varijable. Za neparametrijske kontinuirane varijable (dob) usporedba između skupina izvršena je Mann-Whitneyjev testom. Vjerojatnost  $P$  (dvosmjerni)  $<0,05$  smatran je statistički značajnim. Statistička analiza podataka izvršena je uporabom komercijalno dostupnog softvera IBM SPSS Statistics (IBM SPSS Statistics Version 22, USA). Svi statistički testovi su dvostrani (engl. *two-sided*). Konvencionalna vrijednost  $P < 0,05$  korištena je za određivanje statističke značajnosti podataka.



## 4. REZULTATI

### 4.1. Analiza dobi i spola ispitanika

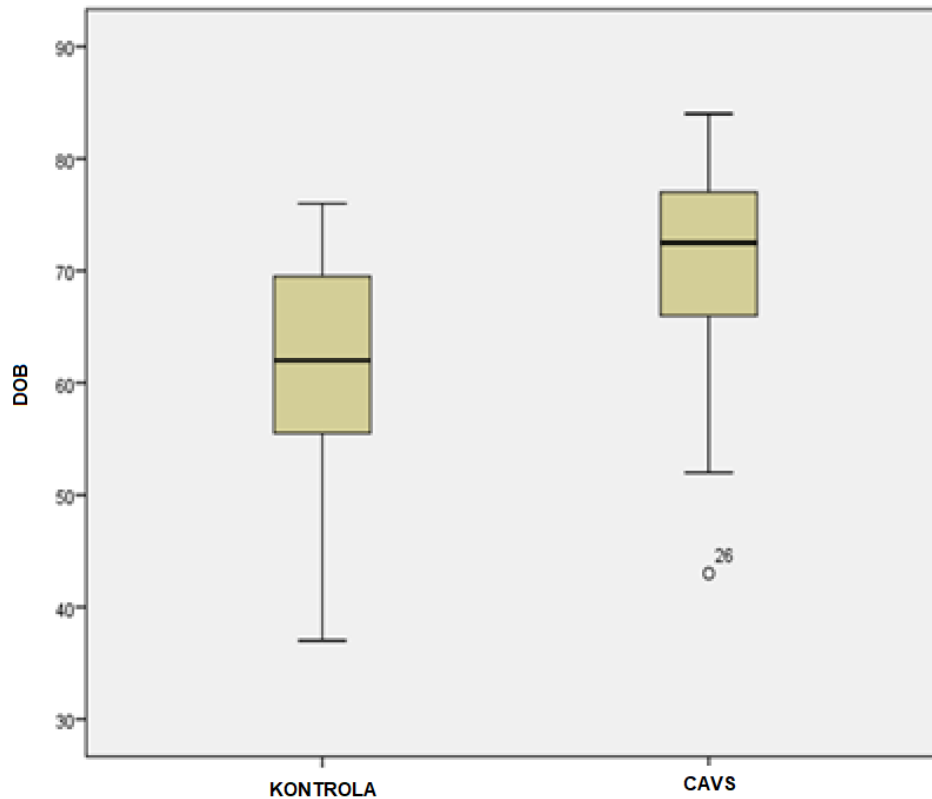
Da bi se istražio uzrok kalcificirajuće stenozе aortnih zalistaka srca, uspoređena je ekspresija lncRNA ZEB1-AS1 i PACER iz krvi pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca (CAVS) i zdrave skupine ispitanika. Ispitivana populacija (n= 69) obuhvaća 38 pacijenata s dijagnosticiranom kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca i 31 zdrava dobrovoljca koji čine kontrolnu skupinu ispitanika. Napravljena je usporedba spola kontrolne skupine i bolesnika te nije bilo statistički značajne razlike između dviju promatranih skupina. U skupini s dijagnosticiranom kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca bilo je 15 (39,5%) muškaraca i 23 (60,5 %) žene, a u kontrolnoj skupina: 14 (45,2%) muškaraca i 17 (54,9 %) žena ; P = 0,807 (Slika 8).



*Slika 9. Zastupljenost ispitanika s dijagnosticiranom kalcificiranom stenozom aortnih zalistaka srca (CAVS) i kontrolne skupine obzirom na spol*

S obzirom na dob ispitanika utvrđena je statistički značajna (P=0,003) razlika u raspodjeli pri čemu su pacijenti s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca bili starije

životne dobi u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika [medijan (interkvartilni raspon); pacijenti CAVS: 72,5 (66,0-77,25); kontrolni ispitanici: 62,0 (55,0-70,0)].



Slika 10. Zastupljenost ispitanika s dijagnosticiranom kalcificiranom stenozom aortnih zalistaka srca (CAVS) i kontrolne skupine obzirom na dob

#### 4.2. Izolacija i kvantifikacija RNA iz uzoraka krvi

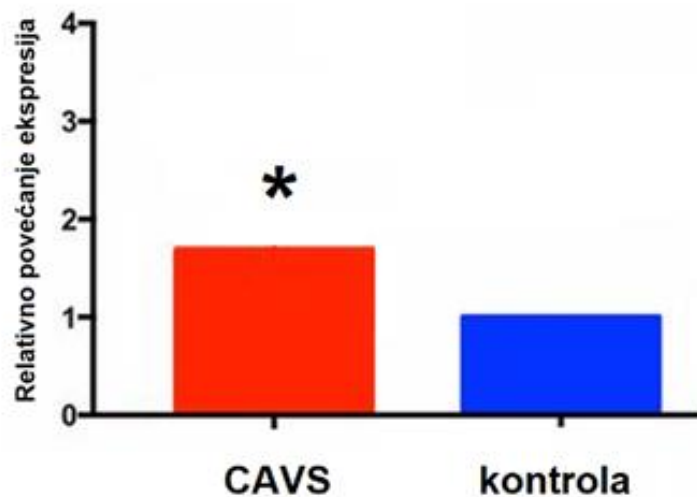
U istraživanju je analizirana periferna krv iz koje je izolirana ukupna RNA koja je prevedena u cDNA, a zatim je analizirana metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom. Primjenjena metoda izolacije ukupne RNA iz uzoraka plazme pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca i kontrolnih ispitanika pokazala se prikladnom. Vrijednosti koncentracije ukupne RNA izolirane kombinacijom Trizola i NucleoSpin™ RNA kit-a prikazane su u Tablici 4.

Tablica 4. Koncentracije ukupne RNA izolirane iz uzoraka krvne plazme (bez trombocita) pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca (CAVS) i kontrolnih ispitanika

	KONCENTRACIJE UKUPNO IZOLIRANE RNA (ng/ $\mu$ L)	
	CAVS	KONTROLE
1	14,9	20,6
2	50,2	20,6
3	18,6	18,5
4	18,8	12,9
5	73,6	12,8
6	96,3	13,9
7	19	21,8
8	16,8	17,2
9	15,8	24,3
10	28,1	15
11	16,2	15,6
12	17	43,1
13	12,5	14,2
14	15,2	14,7
15	12,7	26,2
16	14,3	21,2
17	13	20,6
18	12,7	11,5
19	15,7	26,4
20	13	22
21	30,4	22,6
22	92,3	32,3
23	12,6	22,3
24	14,5	13,8
25	16,3	68,8
26	15,6	22,7
27	16,8	14,7
28	14,3	16,3
29	14,4	14,2
30	30,8	23,8
31	14,6	13,7
32	16,8	
33	13,5	
34	13,2	
35	13	
36	14,7	
37	12,9	
38	14	

### 4.3. qRT-PCR analiza lncRNA PACER i ZEB1-AS1

Analiza ekspresije lncRNA PACER i ZEB1-AS1 u perifernoj cirkulaciji analizirana je metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu te je normalizirana s obzirom na ekspresijske vrijednosti gena *GAPDH* korištenog kao interna kontrola. Analiza je pokazala značajno povećanu ekspresiju lncRNA PACER u uzorcima plazma pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca u odnosu na uzorke kontrolnih ispitanika ( $P = 0,03$ ; FC (engl. *fold change*) = 1,79).



Slika 11. Relativno povećanje ekspresijske vrijednosti lncRNA PACER u uzorcima krvne plazma pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca (CAVS) u odnosu na uzorke krvne plazme kontrolnih ispitanika. \* $P = 0,03$ .

S obzirom na ekspresiju lncRNA ZEB1-AS1 nije zabilježena prisutnost ove lncRNA u ispitivanim uzorcima plazme pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca kao ni u plazma uzorcima kontrolnih ispitanika.

## 5. RASPRAVA

U ovom istraživanju izvršena je analiza povezanosti ekspresije lncRNA PACER i ZEB1-AS1 u uzorcima plazme periferne krvi s oboljevanjem od aortne stenozе. Rezultati pokazuju značajno veću prisutnost lncRNA PACER u perifernoj cirkulaciji pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike.

Do sada objavljeni podaci ukazuju da nuklearna antisens lncRNA PACER (engl. *P50-associated COX-2 extragenic RNA*) koja se eksprimira uzvodno (-257 do -1022 nukleotida u odnosu, a startno mjesto ekspresije gena *COX2*) od ljudskog gena *COX2* te izravno skida represivne NF- $\kappa$ B p50 podjedinice s promotora *COX-2* te time olakšava vezivanje p300, otvaranje kromatina, regrutiranje RNA polimeraze II i aktivaciju transkripcije gena *COX2* [115].

Enzimi ciklooksigenaze (COX) kataliziraju pretvorbu arahidonske kiseline u prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) koji djeluje kao supstrat za brojne derivate eikozanoida, poput prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), prostaciklina PGI<sub>2</sub> i tromboksana A<sub>2</sub>, koji su važni posrednici mnogih bioloških procesa, uključujući upalne reakcije [115].

Povećana ekspresija gena *COX2* zabilježena je u mineraliziranim aortnim zaliscima miševa koji nemaju ekspresiju gena *klotho* kao i u patološki promijenjenom tkivu aortnih zalistaka pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca te izoliranim stanicama AVIC tretiranim proupalnim čimbenikom lipopolisaharidom [116, 117].

Ciklooksigenaze (COX)-1, COX-2 i 5-lipooksigenaza [enzimi koji se nalaze nizvodno od gena za fosfolipazu A<sub>2</sub> u metabolizmu arahidonske kiseline] kolokalizirani su s enzimom fosfolipaza A<sub>2</sub> u stanicama kalcificiranih aortnih zalistaka kod pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca pozitivnima na  $\alpha$ -SMA (engl.  *$\alpha$ -smooth muscle actin*), čija je ekspresija povezana s raznim kardiovaskularnim obojenjima i CD68 antigen (makrofazi) [116].

Osim toga inhibicija aktivnosti *COX2* nestereoidnim protuupalnim lijekom Celecoxib-om [terapijski dostupan inhibitor COX2 odobren od strane FDA (Federal drug administration, SAD)] reducira kalcifikaciju aortnih zalistaka srca u miševima koji nemaju ekspresiju gena *klotho* te blokira ekspresiju gena osteogeneze *Runx2* – engl. *RUNX Family Transcription Factor 2*; SPP1/OPN - osteopontin) te reducira ekspresiju alkalne fosfataze, ali ne dovodi do

promjene u ekspresiji gena *COX2*. Nadalje, inhibicija aktivnosti *COX2 in vitro* dovodi do smanjenja ekspresije gena za koštani sijaloprotein II (*BS*) i gena za osteokalcin kod stanica svinje [116].

Pokazano je također da primjena antikoagulansa Rivaroxabana značajno reducira prekomjernu ekspresiju gena *COX2* u stanicama svinje [118].

No unatoč tim spoznajama, postoje i kontradiktorni podaci te se ne može sa sigurnošću reći djeluje li *COX2* kao jedan od inicijatora kalcificirajuće stenozе aortnih zalistaka srca ili pak kao protektivni čimbenik. Naime, nedavno objavljena studija Bowlera i suradnika [119] ukazala je na protektivnu ulogu enzima *COX2* u nastanku kalcificirajuće stenozе aortnih zalistaka srca. Naime primjena Colecoxib-a, inhibitora enzima *COX2*, dovela do značajno veće pojavnosti kalcificirajuće stenozе aortnih zalistaka srca. Povezanost Colecoxib-a s pojavnošću aortne stenozе pokazana je i u analizi kada su uzeti u obzir dob, spol, indeks tjelesne mase i poznati kardiovaskularni rizični čimbenici pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca [119].

Ovdje je važno napomenuti da nije nađena povezanost aortne stenozе s liječenjem pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca s drugim nestereoidnim protuupalnim lijekovima kao što su Ibuprofen ili Naproxen [119].

Najnovije istraživanje pokazalo je da terapija Celecoxibom dovodi do 2,8 puta veće pojavnosti kalcifikacije u svinjskim aortnim zaliscima *ex vivo* i više od dva puta veću pojavnost kalcifikacije u aortnim stanicama VIC, uzgajanim u osteogenom mediju. Navedeni efekt ovisan je o glukokortikosteroidima, a njihovo uklanjanje dovodi do značajnog smanjenja kalcifikacijskih žarišta [119].

Ovi podaci sugeriraju da bi povećana ekspresija lncRNA PACER u perifernoj cirkulaciji pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca mogla nastati kao obrambena reakcija na pojavnost kalcifikacijskih žarišta. No daljnje studije na većem broju ispitanika te prikladne studije na stanicama VIC *in vitro* potrebne su kako bi se potvrdili nalazi ovog istraživanja te otkrila funkcionalna uloga lncRNA PACER u tkivu normalnih i patološki promijenjenih aortnih zalistaka srca.

Kao što je prethodno navedeno, lncRNA ZEB1-AS1 potiče ekspresiju gena *ZEB1* koji između ostalog dovodi do smanjenja promotorske aktivnosti gena *COX2* te time sprječava pojavnost endotelne disfunkcije [112]. Međusobna interakcija *COX2* i *ZEB1* uočena je i u

regulaciji endotelno mezenhimske tranzicije [113]. No potpuni funkcionalni međuodnos ova dva gena još preostaje utvrditi.

U ovom istraživanju nije utvrđena značajnija prisutnost lncRNA ZEB1-AS1 u perifernoj cirkulaciji pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca i kontrolnih ispitanika.

## 6. ZAKLJUČCI

- Uspješno je izolirana ukupna RNA iz krvne plazme metodama ekstrakcije Trizolom i kompletom NucleoSpin™ RNA Kit u koncentracijama dostatnim za reverznu transkripciju i analizu metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR).

- S obzirom na dob ispitanika utvrđena je statistički značajna razlika u raspodjeli, pri čemu su pacijenti s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca (CAVS) bili starije životne dobi u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika.

- S obzirom na spol ispitanika nije utvrđena statistički značajna razlika između pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca i kontrolne skupine ispitanika.

- Analizirana je ekspresija lncRNA PACER u 38 uzoraka krvi pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca i 31 kontrolnih uzoraka krvi te je ekspresija lncRNA PACER značajno veća u odnosu na ekspresijske vrijednosti detektirane u perifernoj krvi kontrolnih ispitanika.

- Nije zabilježena ekspresija lncRNA ZEB1-AS1 u perifernim uzorcima krvi pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca i kontrolnih ispitanika.



## 7. LITERATURA

1. Iung B., Baron G., Butchart E.G., Delahaye F., Gohlke-Bärwolf C., Levang OW, i sur. (2003): A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. *Eur Heart J.* 24(13):1231–1243.
2. Thaden J.J., Nkomo V.T., Enriquez-Sarano M. (2014): The global burden of aortic stenosis. *Prog Cardiovasc Dis.* 56(6):565–571.
3. Yutzey K.E., Demer L.L., Body S.C., Huggins G.S., Towler D.A., Giachelli C.M., i sur. (2014): Calcific aortic valve disease: a consensus summary from the Alliance of Investigators on Calcific Aortic Valve Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 34(11):2387–2393.
4. Maganti K., Rigolin V.H., Sarano M.E., Bonow R.O. (2010): Valvular heart disease: diagnosis and management. *Mayo Clin Proc.* 85:483-500.
5. Osnabrugge R.L., Mylotte D., Head S.J., Van Mieghem N.M., Nkomo V.T., LeReun C.M., i sur. (2013): Aortic stenosis in the elderly: disease prevalence and number of candidates for transcatheter aortic valve replacement: a meta-analysis and modeling study. *J Am Coll Cardiol.* 62(11):1002–1012.
6. Goldbarg S.H., Elmariah S., Miller M.A., Fuster V. (2007): Insights into degenerative aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol.* 2550(13):1205–1213.
7. Iung B., Vahanian A. (2011): Epidemiology of valvular heart disease in the adult. *Nat Rev Cardiol.* 8(3):162–172.
8. Gohlke-Bärwolf C., Minners J., Jander N., Gerdtz E., Wachtell K., Ray S., i sur. (2013): Natural history of mild and of moderate aortic stenosis-new insights from a large prospective European study. *Curr Probl Cardiol.* 38(9):365–409.
9. Passik C.S., Ackermann D.M., Pluth J.R., Edwards W.D. (1987): Temporal changes in the causes of aortic stenosis: A surgical pathologic study of 646 cases. *Mayo Clin Proc.* 62:119.
10. Selzer A. (1987): Changing aspects of the natural history of valvular aortic stenosis. *N Engl J Med.* 317(2):91-98.
11. Gulyasy B., Lopez-Candales A., Reis S.E., Levitsky S. (2009): Quadricuspid aortic valve: an unusual echocardiographic finding and a review of the literature. *Int J Cardiol.* 132:e68-71.

12. Otto C.M., Prendergast B. (2014): Aortic-valve stenosis- from patients at risk to severe valve obstruction. *N Engl J Med.* 371(8):744–756.
13. Pasipoularides A. (2016): Calcific Aortic Valve Disease: Part 1-Molecular Pathogenetic Aspects, Hemodynamics, and Adaptive Feedbacks. *J Cardiovasc Transl Res.* 9(2):102–118.
14. Dweck M.R., Boon N.A., Newby D.E. (2012): Calcific aortic stenosis: a disease of the valve and the myocardium. *J Am Coll Cardiol.* 60:1854-1863.
15. Beppu S., Suzuki S., Matsuda H., Ohmori F., Nagata S., Miyatake K. (1993): Rapidity of progression of aortic stenosis in patients with congenital bicuspid aortic valves. *Am J Cardiol.* 71:322–327.
16. Ward C. (2000): Clinical significance of the bicuspid aortic valve. *Heart.* 83: 81–85.
17. Friedman T., Mani A., Elefteriades J.A. (2008). Bicuspid aortic valve: clinical approach and scientific review of a common clinical entity. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 6:235–248.
18. Jung B., Vahanian A. (2012): Degenerative calcific aortic stenosis: a natural history. *Heart.* 98 Suppl 4:iv7-13.
19. Nishimura R.A., Otto C.M., Bonow R.O., Carabello B.A., Erwin J.P. (2014): 3rd, Guyton RA, i sur; American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 63:e57-185.
20. Sathyamurthy I., Alex S. (2015): Calcific aortic valve disease: is it another face of atherosclerosis? *Indian Heart J.* 67(5):503–506.
21. Pawade T.A., Newby D.E., Dweck M.R. (2015): Calcification in Aortic Stenosis: The Skeleton Key. *J Am Coll Cardiol.* 66(5):561–577.
22. Miller J.D., Weiss R.M., Heistad D.D. (2011): Calcific aortic valve stenosis: methods, models, and mechanisms. *Circ Res.* 108(11):1392–1412.
23. Towler D.A. (2013): Molecular and cellular aspects of calcific aortic valve disease. *Circ Res.* 113(2):198–208.
24. Li C., Xu S., Gotlieb A.I. (2013): The progression of calcific aortic valve disease through injury, cell dysfunction, and disruptive biologic and physical force feedback loops. *Cardiovasc Pathol.* 22(1):1–8.

25. Butcher J.T., Mahler G.J., Hockaday L.A. (2011): Aortic valve disease and treatment: the need for naturally engineered solutions. *Adv Drug Deliv Rev.* 63(4–5):242–268.
26. Bossé Y., Mathieu P., Pibarot P. (2008): Genomics: the next step to elucidate the etiology of calcific aortic valve stenosis. *J Am Coll Cardiol.* 51(14):1327-1336.
27. Giusti B., Sticchi E., De Cario R., Magi A., Nistri S., Pepe G. (2017): Genetic Bases of Bicuspid Aortic Valve: The Contribution of Traditional and High-Throughput Sequencing Approaches on Research and Diagnosis. *Front Physiol.* 8:612.
28. Mohamed S.A., Aherrahrou Z., Liptau H., Erasmi A.W., Hagemann C., Wrobel S., Borzym K., Schunkert H., Sievers H.H., Erdmann J. (2006): Novel missense mutations (p.T596M and p.P1797H) in NOTCH1 in patients with bicuspid aortic valve. *Biochem Biophys Res Commun.* 345(4):1460-1465.
29. O'Brien K.D. (2007): Epidemiology and genetics of calcific. aortic valve disease. *J Investig Med.* 55(6):284-291.
30. Golubnitschaja O., Yeghiazaryan K., Skowasch D., Schild H., Bauriedel G. (2006): p21WAF1/CIP1 and 14-3-3 sigma gene expression in degenerated aortic valves: a link between cell cycle checkpoints and calcification. *Amino Acids.* 31(3):309-316.
31. Ortlepp J.R., Hoffmann R., Ohme F., Lauscher J., Bleckmann F., Hanrath P. (2001): The vitamin D receptor genotype predisposes to the development of calcific aortic valve stenosis. *Heart.* 85(6):635-638.
32. Novaro G.M., Sachar R., Pearce G.L., Sprecher D.L., Griffin B.P. (2003): Association between apolipoprotein E alleles and calcific valvular heart disease. *Circulation.* 108(15):1804-1808.
33. Ortlepp J.R., Pillich M., Mevissen V., Krantz C., Kimmel M., Autschbach R., Langebartels G., Erdmann J., Hoffmann R., Zerres K. (2006): APOE alleles are not associated with calcific aortic stenosis. *Heart.* 92(10):1463-1466.
34. Anger T., Ekici A.B., Daniel W.G., Garlich C.D. (2006): Gene polymorphisms leading to calcified and stenotic aortic valves. *Herz.* 31(7):635-643.
35. Avakian S.D., Annicchino-Bizzacchi J.M., Grinberg M., Ramires J.A., Mansura A.P. (2001): Apolipoproteins AI, B, and E polymorphisms in severe aortic valve stenosis. *Clin Genet.* 60(5):381-384.
36. Nordström P., Glader C.A., Dahlén G., Birgander L.S., Lorentzon R., Waldenström A., i sur. (2003): Oestrogen receptor alpha gene polymorphism is related to aortic valve sclerosis in postmenopausal women. *J Intern Med.* 254(2):140-146.

37. Schmitz F., Ewering S., Zerres K., Klomfass S., Hoffmann R., Ortlepp J.R. (2009): Parathyroid hormone gene variant and calcific aortic stenosis. *J Heart Valve Dis.* 18(3):262-267.
38. Ortlepp J.R., Schmitz F., Mevissen V., Weiss S., Huster J., Dronskowski R., Langebartels G., Autschbach R., Zerres K., Weber C., Hanrath P., Hoffmann R. (2004): The amount of calcium-deficient hexagonal hydroxyapatite in aortic valves is influenced by gender and associated with genetic polymorphisms in patients with severe calcific aortic stenosis. *Eur Heart J.* 25(6):514-522.
39. Thanassoulis G., Campbell C.Y., Owens D.S., Smith J.G., Smith A.V., Peloso G.M., i sur.; CHARGE Extracoronary Calcium Working Group. (2014): Genetic associations with valvular calcification and aortic stenosis. *N Engl J Med.* 368(6):503-512.
40. Arsenault B.J., Boekholdt S.M., Dubé M.P., Rhéaume E., Wareham N.J., Khaw K.T., Sandhu M.S., Tardif J.C. (2014): Lipoprotein(a) levels, genotype, and incident aortic valve stenosis: a prospective Mendelian randomization study and replication in a case-control cohort. *Circ Cardiovasc Genet.* 7(3):304-310.
41. Smith J.G., Luk K., Schulz C.A., Engert J.C., Do R., Hindy G., et al; Cohorts for Heart and Aging Research in Genetic Epidemiology (CHARGE) Extracoronary Calcium Working Group. (2014): Association of low-density lipoprotein cholesterol-related genetic variants with aortic valve calcium and incident aortic stenosis. *JAMA.* 312(17):1764-1771.
42. Kutikhin A.G., Yuzhalin A.E., Brusina E.B., Ponasenko A.V., Golovkin A.S., Barbarash O.L. (2014): Genetic predisposition to calcific aortic stenosis and mitral annular calcification. *Mol Biol Rep.* 41(9):5645-5663.
43. Ducharme V., Guauque-Olarte S., Gaudreault N., Pibarot P., Mathieu P., Bossé Y. (2013). NOTCH1 genetic variants in patients with tricuspid calcific aortic valve stenosis. *J Heart Valve Dis.* 22:142-149.
44. Thériault S., Gaudreault N., Lamontagne M., Rosa M., Boulanger M.C., Messika-Zeitoun D., i sur. (2018): A transcriptome-wide association study identifies PALMD as a susceptibility gene for calcific aortic valve stenosis. *Nat Commun.* 9:988.
45. Chen H.Y., Dufresne L., Burr H., Ambikkumar A., Yasui N., Luk K., i sur. (2018): Association of LPA Variants With Aortic Stenosis: A Large-Scale Study Using Diagnostic and Procedural Codes From Electronic Health Records. *JAMA Cardiol.* 3:18-23.

46. Zhang Y., Ma L. (2019): Identification of key genes and pathways in calcific aortic valve disease by bioinformatics analysis. *J Thorac Dis.* 11(12):5417-5426.
47. Schlotter F., Halu A., Goto S., Blaser M.C., Body S.C., Lee L.H., i sur. (2018): Spatiotemporal Multi-Omics Mapping Generates a Molecular Atlas of the Aortic Valve and Reveals Networks Driving Disease. *Circulation.* 138(4):377-393.
48. Cho K.I., Sakuma I., Sohn I.S., Jo S.H., Koh K.K. (2018): Inflammatory and metabolic mechanisms underlying the calcific aortic valve disease. *Atherosclerosis.* 277:60-65.
49. Parisi V., Leosco D., Ferro G., Bevilacqua A., Pagano G., de Lucia C., i sur. (2015): The lipid theory in the pathogenesis of calcific aortic stenosis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 25(6):519-525.
50. Gomez-Stallons M.V., Wirrig-Schwendeman E.E., Hassel K.R., Conway S.J., Yutzey K.E. (2016): Bone Morphogenetic Protein Signaling Is Required for Aortic Valve Calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 36(7):1398-1405.
51. Bossé Y., Miqdad A., Fournier D., Pépin A., Pibarot P., Mathieu P. (2009): Refining molecular pathways leading to calcific aortic valve stenosis by studying gene expression profile of normal and calcified stenotic human aortic valves. *Circ Cardiovasc Genet.* 2(5):489-498.
52. Albanese I., Yu B., Al-Kindi H., Barratt B., Ott L., Al-Refai M., i sur. (2017): Role of Noncanonical Wnt Signaling Pathway in Human Aortic Valve Calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 37(3):543-552.
53. Wirrig E.E., Yutzey K.E. (2014): Conserved transcriptional regulatory mechanisms in aortic valve development and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 34(4):737-741.
54. Song R., Fullerton D.A., Ao L., Zheng D., Zhao K.S., Meng X. (2015): BMP-2 and TGF- $\beta$ 1 mediate biglycan-induced pro-osteogenic reprogramming in aortic valve interstitial cells. *J Mol Med (Berl).* 93(4):403-412.
55. Patel N., Kumbhani D.J. (2018): Clinical Implications of Serum Biomarkers of Cardiac Stress in Aortic Stenosis. *Curr Heart Fail Rep.* 15(5):281-286.
56. Lindman B.R., Breyley J.G., Schilling J.D., Vatterott A.M., Zajarias A., Maniar H.S., et al. (2015): Prognostic utility of novel biomarkers of cardiovascular stress in patients with aortic stenosis undergoing valve replacement. *Heart.* 101(17):1382-1388.
57. Toutouzas K., Stathogiannis K., Latsios G., Synetos A., Drakopoulou M., Penesopoulou V., i sur. (2019): Biomarkers in Aortic Valve Stenosis and their Clinical

- Significance in Transcatheter Aortic Valve Implantation. *Curr Med Chem.* 26(5):864-872.
58. Barbieri F., Senoner T., Adukauskaite A., Dobner S., Holfeld J., Semsroth S., i sur. (2020): Dataset on the prognostic value of cardiac biomarkers used in clinical routine in patients with severe aortic stenosis undergoing valve replacement. *Data Brief.* 29:105111.
  59. Oury C., Côté N., Clavel M.A. (2020): Biomarkers Associated with Aortic Stenosis and Structural Bioprosthesis Dysfunction. *Cardiol Clin.* 38(1):47-54.
  60. Lindman B.R., Clavel M.A., Mathieu P., Iung B., Lancellotti P., Otto C.M., i sur. (2016): Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2016; 2:16006.
  61. Sawaya F., Liff D., Stewart J., Lerakis S., Babaliaros V. (2012). Aortic stenosis: a contemporary review. *Am J Med Sci.* 343:490-496.
  62. Vahanian A., Alfieri O., Andreotti F., Antunes M.J., Barón-Esquivias G., Baumgartner H., i sur. (2012): Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012) The Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur J Cardiothorac Surg.* 42:S1-44.
  63. Nishimura R.A., Otto C.M., Bonow R.O., Carabello B.A., Erwin J.P. 3rd, Fleisher L.A., i sur. (2017): AHA/ACC Focused Update of the 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 70:252-289.
  64. Czarny M.J., Resar J.R. (2014): Diagnosis and management of valvular aortic stenosis. *Clin Med Insights Cardiol.* 8:15-24.
  65. Yurek L.A., Jakub K.E., Menacho M.M. (2015): Severe Symptomatic Aortic Stenosis in Older Adults: Pathophysiology, Clinical Manifestations, Treatment Guidelines, and Transcatheter Aortic Valve Replacement (TAVR) *J Gerontol Nurs.* 41(6):8–13.
  66. Song R., Fullerton D.A., Ao L., Zhao K.S., Meng X. (2017): An epigenetic regulatory loop controls pro-osteogenic activation by TGF- $\beta$ 1 or bone morphogenetic protein 2 in human aortic valve interstitial cells. *J Biol Chem.* 292(21):8657-8666.
  67. Gošev I., Zeljko M., Đurić Ž., Nikolić I., Gošev M., Ivčević S. i sur. (2017): Epigenome alterations in aortic valve stenosis and its related left ventricular hypertrophy. *Clin Epigenetics.* 9:106

68. Oury C., Servais L., Bouznad N., Hego A., Nchimi A., Lancellotti P. (2016): MicroRNAs in Valvular Heart Diseases: Potential Role as Markers and Actors of Valvular and Cardiac Remodeling. *Int J Mol Sci.* 17(7). pii: E1120.
69. Shi J., Liu H., Wang H., Kong X. (2016): MicroRNA Expression Signature in Degenerative Aortic Stenosis. *Biomed Res Int.* 2016:4682172.
70. Sabatino J., Wicik Z., De Rosa S., Eyileten C., Jakubik D., Spaccarotella C., Mongiardo A., Postula M., Indolfi C. (2019): MicroRNAs fingerprint of bicuspid aortic valve. *J Mol Cell Cardiol.* 134:98-106.
71. Ni W.J., Wu Y.Z., Ma D.H., Leng X.M. (2018): Noncoding RNAs in Calcific Aortic Valve Disease: A Review of Recent Studies. *J Cardiovasc Pharmacol.* 71(5):317-323.
72. Hadji F., Boulanger M.C., Guay S.P., Gaudreault N., Amellah S., Mkannez G., i sur. (2016): Altered DNA Methylation of Long Noncoding RNA H19 in Calcific Aortic Valve Disease Promotes Mineralization by Silencing NOTCH1. *Circulation.* 134(23):1848-1862.
73. Xiao X., Zhou T., Guo S., Guo C., Zhang Q., Dong N., i sur. (2017): LncRNA MALAT1 sponges miR-204 to promote osteoblast differentiation of human aortic valve interstitial cells through up-regulating Smad4. *Int J Cardiol.* 243:404-412.
74. Yu C., Li L., Xie F., Guo S., Liu F., Dong N., Wang Y. (2018): LncRNA TUG1 sponges miR-204-5p to promote osteoblast differentiation through upregulating Runx2 in aortic valve calcification. *Cardiovasc Res.* 114(1):168-179.
75. Zheng D., Wang B., Zhu X., Hu J., Sun J., Xuan J., i sur. (2019): LncRNA OIP5-AS1 inhibits osteoblast differentiation of valve interstitial cells via miR-137/TWIST11 axis. *Biochem Biophys Res Commun.* 511(4):826-832.
76. Nasu T., Satoh M., Ohmomo H., Shiwa Y., Komaki S., Ono K., i sur. (2020): Epigenome-Wide Association Study Identifies a Novel DNA Methylation in Patients With Severe Aortic Valve Stenosis. *Circ Genom Precis Med.* 13(1):e002649.
77. Mkannez G., Gagné-Ouellet V., Jalloul Nsaibia M., Boulanger M.C., Rosa M., Argaud D., i sur. (2018): DNA methylation of a PLPP3 MIR transposon-based enhancer promotes an osteogenic programme in calcific aortic valve disease. *Cardiovasc Res.* 114(11):1525-1535.
78. Hadji F., Boulanger M.C., Guay S.P., Gaudreault N., Amellah S., Mkannez G., i sur. (2016): Altered DNA Methylation of Long Noncoding RNA H19 in Calcific Aortic Valve Disease Promotes Mineralization by Silencing NOTCH1. *Circulation.* 134(23):1848-1862.

79. Shen K., Liu H., Jing R., Yi J., Zhou X. (2017): DNA methylation dysregulations in rheumatic heart valve disease. *BMC Cardiovasc Disord.* 17(1):159.
80. Radhakrishna U., Albayrak S., Alpay-Savasan Z., Zeb A., Turkoglu O., Sobolewski P., Bahado-Singh R.O. (2016): Genome-Wide DNA Methylation Analysis and Epigenetic Variations Associated with Congenital Aortic Valve Stenosis (AVS). *PLoS One.* 11(5):e0154010.
81. Nagy E., Bäck M. (2012): Epigenetic regulation of 5-lipoxygenase in the phenotypic plasticity of valvular interstitial cells associated with aortic valve stenosis. *FEBS Lett.* 586(9):1325-1329.
82. Carrion K., Dyo J., Patel V., Sasik R., Mohamed S.A., Hardiman G., Nigam V. (2014): The long non-coding HOTAIR is modulated by cyclic stretch and WNT/ $\beta$ -CATENIN in human aortic valve cells and is a novel repressor of calcification genes. *PLoS One.* 9(5):e96577.
83. Wang J., Wang Y., Gu W., Ni B., Sun H., Yu T., i sur. (2016): Comparative Transcriptome Analysis Reveals Substantial Tissue Specificity in Human Aortic Valve. *Evol Bioinformatics Online.* 12:175–184.
84. Zhu Y., Chen H., Zhang X., Zhang L., Liu Y., Ren C. (2018): Downregulation of MALAT1 Promotes Aortic Valve Calcification by Inhibiting TWIST1 Expression. *Lipid Cardiovasc Res.* 2(2):31–38.
85. Kim J.K., Samaranayake M., Pradhan S. (2009): Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Mol Life Sci.* 66(4):596–612.
86. Esteller M. (2011): Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet.* 12(12):861–874.
87. Zink L.M., Hake S.B. (2016): Histone variants: nuclear function and disease. *Curr Opin Genet Dev.* 37:82–89.
88. Rizki G., Boyer L.A. (2015): Lncing epigenetic control of transcription to cardiovascular development and disease. *Circ Res.* 117(2):192–206.
89. Narlikar G.J., Sundaramoorthy R., Owen-Hughes T. (2013): Mechanisms and functions of ATP-dependent chromatin-remodeling enzymes. *Cell.* 154(3):490–503.
90. Arrowsmith C.H., Bountra C., Fish P.V., Lee K., Schapira M. (2012): Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 11(5):384–400.
91. Murr R. (2010): Interplay between different epigenetic modifications and mechanisms. *Adv Genet.* 70:101–141.



92. Winter S., Fischle W. (2010): Epigenetic markers and their cross-talk. *Essays Biochem.* 48(1):45–61.
93. Uszczyńska-Ratajczak B., Lagarde J., Frankish A., Guigó R., Johnson R. (2018): Towards a complete map of the human long non-coding RNA transcriptome. *Nat Rev Genet.* 19(9):535-548.
94. Fatica A., Bozzoni I. (2009): Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nat Rev Genet.* 2014;15(1):7-21. Brosnan CA, Voinnet O. The long and the short of noncoding RNAs. *Curr Opin Cell Biol.* 21(3):416-425.
95. Sweta S., Dudnakova T., Sudheer S., Baker A.H., Bhushan R. (2019): Importance of Long Non-coding RNAs in the Development and Disease of Skeletal Muscle and Cardiovascular Lineages. *Front Cell Dev Biol.* 7:228.
96. Hadji F., Boulanger M.C., Guay S.P., Gaudreault N., Amellah S., Mkannez G., Bouchareb R., Marchand J.T., Nsaibia M.J., Guauque-Olarte S., Pibarot P., Bouchard L., Bossé Y., Mathieu P. (2016): Altered DNA Methylation of Long Noncoding RNA H19 in Calcific Aortic Valve Disease Promotes Mineralization by Silencing NOTCH1. *Circulation.* 134(23):1848-1862.
97. Xiao X., Zhou T., Guo S., Guo C., Zhang Q., Dong N., Wang Y. (2017): LncRNA MALAT1 sponges miR-204 to promote osteoblast differentiation of human aortic valve interstitial cells through up-regulating Smad4. *Int J Cardiol.* 243:404-412.
98. Carrion K., Dyo J., Patel V., Sasik R., Mohamed S.A., Hardiman G., Nigam V. (2014): The long non-coding HOTAIR is modulated by cyclic stretch and WNT/ $\beta$ -CATENIN in human aortic valve cells and is a novel repressor of calcification genes. *PLoS One.* 9(5):e96577.
99. Yu C., Li L., Xie F., Guo S., Liu F., Dong N., Wang Y. (2018): LncRNA TUG1 sponges miR-204-5p to promote osteoblast differentiation through upregulating Runx2 in aortic valve calcification. *Cardiovasc Res.* 114(1):168-179.
100. Zheng D., Wang B., Zhu X., Hu J., Sun J., Xuan J., Ge Z. (2019): LncRNA OIP5-AS1 inhibits osteoblast differentiation of valve interstitial cells via miR-137/TWIST11 axis. *Biochem Biophys Res Commun.* 511(4):826-832.
101. Merryman W.D., Clark C.R. (2016): Lnc-ing NOTCH1 to Idiopathic Calcific Aortic Valve Disease. *Circulation.* 134(23):1863-1865.

102. Wang Y., Xiao X., Zhou T., Han D., Dong N. (2020): Novel mechanisms for osteogenic differentiation of human aortic valve interstitial cells. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 159(5):1742-1753.e7.
103. Vander Roest M., Krapp C., Thorvaldsen J.L., Bartolomei M.S., Merryman W.D. (2019): H19 is not hypomethylated or upregulated with age or sex in the aortic valves of mice. *Physiol Rep.* 7(19):e14244.
104. Gupta S.K., Kumari S., Singh S., Barthwal M.K., Singh S.K., Thum T. (2020): Non-coding RNAs: Regulators of valvular calcification. *J Mol Cell Cardiol.* 142:14-23.
105. Krawczyk M., Emerson B.M. (2014): p50-associated COX-2 extragenic RNA (PACER) activates COX-2 gene expression by occluding repressive NF- $\kappa$ B complexes. *Elife.* 3:e01776.
106. Gupta S.C., Awasthee N., Rai V., Chava S., Gunda V., Challagundla K.B. (2020): Long non-coding RNAs and nuclear factor- $\kappa$ B crosstalk in cancer and other human diseases. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 1873(1):188316.
107. Jiang M., Liu J., Luo T., Chen Q., Lu M., Meng D. (2019): LncRNA PACER is down-regulated in osteoarthritis and regulates chondrocyte apoptosis and lncRNA HOTAIR expression. *Biosci Rep.* 39(6):BSR20190404.
108. Sayad A., Ghafouri-Fard S., Shams B., Arsang-Jang S., Gholami L., Taheri M. (2020): Sex-specific up-regulation of p50-associated COX-2 extragenic RNA (PACER) lncRNA in periodontitis. *Heliyon.* 6(5):e03897.
109. Qian M., Yang X., Li Z., Jiang C., Song D., Yan W., Liu T., Wu Z., Kong J., Wei H., Xiao J. (2016): P50-associated COX-2 extragenic RNA (PACER) overexpression promotes proliferation and metastasis of osteosarcoma cells by activating COX-2 gene. *Tumour Biol.* 37(3):3879-3886.
110. Pearson M.J., Philp A.M., Heward J.A., Roux B.T., Walsh D.A., Davis E.T., Lindsay M.A., Jones S.W. (2016): Long Intergenic Noncoding RNAs Mediate the Human Chondrocyte Inflammatory Response and Are Differentially Expressed in Osteoarthritis Cartilage. *Arthritis Rheumatol.* 68(4):845-856.
111. Liu C., Lin J. (2016): Long noncoding RNA ZEB1-AS1 acts as an oncogene in osteosarcoma by epigenetically activating ZEB1. *Am J Transl Res.* 8(10):4095-4105.
112. Zhang H., Liu J., Qu D., Wang L., Luo J.Y., Lau C.W., Liu P., Gao Z., Tipoe G.L., Lee H.K., Ng C.F., Ma R.C., Yao X., Huang Y. (2016): Inhibition of miR-200c

- Restores Endothelial Function in Diabetic Mice Through Suppression of COX-2. *Diabetes*. 65(5):1196-1207.
113. Dohadwala M., Yang S.C., Luo J., Sharma S., Batra R.K., Huang M., Lin Y., Goodglick L., Krysan K., Fishbein M.C., Hong L., Lai C., Cameron R.B., Gemmill R.M., Drabkin H.A., Dubinett S.M. (2006): Cyclooxygenase-2-dependent regulation of E-cadherin: prostaglandin E(2) induces transcriptional repressors ZEB1 and snail in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 66(10):5338-5345.
114. Chen C., Feng Y., Wang X. (2018): LncRNA ZEB1-AS1 expression in cancer prognosis: Review and meta-analysis. *Clin Chim Acta*. 484:265-271.
115. Krawczyk M., Emerson B.M. (2014): p50-associated COX-2 extragenic RNA (PACER) activates COX-2 gene expression by occluding repressive NF- $\kappa$ B complexes. *Elife*. 3:e01776.
116. Suzuki K., Takahashi S., Watanabe K., Fujioka D., Nakamura T., Obata J.E., Kawabata K., Katoh R., Matsumoto M., Kugiyama K. (2014): The expression of groups III and V phospholipase A2 is associated with an increased expression of osteogenic molecules in human calcified aortic valves. *J Atheroscler Thromb*. 21(12):1308-1325.
117. Wirrig E.E., Gomez M.V., Hinton R.B., Yutzey K.E. (2015): COX2 inhibition reduces aortic valve calcification in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 35(4):938-947.
118. Rattazzi M., Faggini E., Bertacco E., Nardin C., Pagliani L., Plebani M., Cinetto F., Guidolin D., Puato M., Pauletto P. (2018): Warfarin, but not rivaroxaban, promotes the calcification of the aortic valve in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Cardiovasc Ther*. 36(4):e12438.
119. 109. Bowler M.A., Raddatz M.A., Johnson C.L., Lindman B.R., Merryman W.D. (2019): Celecoxib Is Associated With Dystrophic Calcification and Aortic Valve Stenosis. *JACC Basic Transl Sci*. 4(2):135-143.
120. Li X., Mauro M., Williams Z. (2015): Comparison of plasma extracellular RNA isolation kits reveals kit-dependent biases. *Biotechniques*. 59(1):13-17.

## 8. ŽIVOTOPIS

Ime i Prezime: **Nikola Pavlović**

Datum rođenja: **5.12.1996.**

### Obrazovanje:

- 2018.-2020. **Diplomski sveučilišni studij Eksperimentalna biologija; modul Fiziologija i imunobiologija**  
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb (Republika Hrvatska)
- 2015.-2018. **Preddiplomski studij Biologije**  
Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju, Osijek (Republika Hrvatska)

### Radno iskustvo:

2020. **Laboratorijska stručna praksa**  
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Laboratorij za epigenetiku i molekularnu medicinu, Zavod za medicinsku biologiju  
Mentor: doc. dr.sc. Frane Paić
2019. **Laboratorijska stručna praksa**  
Eberhard Karls University Tübingen, Zavod za infektivnu mikrobiologiju  
Mentor: doc. dr. sc. Simon Heilbronner
- Laboratorijska stručna praksa**  
Centar za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji, Zagreb  
Laboratorij za imunokemiju i biokemiju  
Mentor: dr. sc. Beata Halassy, znanstveni savjetnik

**Dodatno:**

2018.-2019.                      Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama:  
LabAnim A kategorija (Laboratory Animal Science Course:  
FELASA equivalent (60 sati)

**MeetTheBiologists2020**

Jedan od organizatora događaja koji je imao za cilj spojiti poslodavce sa studentima kao potencijalnim zaposlenicima.

**Dan i noć biologije**

Manifestacija koja promiče znanost.

**Tjedan mozga**

Manifestacija koja promiče znanost.

**Demonstrator**

Demonstrator na kolegiju Anatomija i histologija čovjeka.

**POČASTI I NAGRADE**

Dobitnik Rektorove nagrade za 2019./2020.

Sveučilište u Zagrebu

Nagrada za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici.