

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

Ieva Čiapienė

**RENINO-ANGIOTENZINO
SISTEMOS, CYP4F2 IR
20-HIDROKSIEIKOZATETRAENO
RŪGŠTIES SĄVEIKOS POVEIKIS
ENDOTELIO DISFUNKCIJAI IR
ATEROSKLEROZEI: LĄSTELIŲ
BIOŽYMENŲ IR TERAPINĖS
MODULIACIJOS TYRIMAS**

Daktaro disertacija
Gamtos mokslai,
biologija (N 010)

Kaunas, 2026

Disertacija rengta 2021–2026 metais Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Kardiologijos instituto Molekulinės kardiologijos laboratorijoje.

Mokslinis vadovas

prof. dr. Vacis Tatarūnas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Konsultantė

prof. dr. Agnė Giedraitienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto biologijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkė

prof. dr. Vilmantė Borutaitė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Nariai:

prof. dr. Ilona Sadauskienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010);

prof. dr. Indrė Čeponienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001);

dr. Daiva Bironaitė (Inovatyvios medicinos centras, gamtos mokslai, biologija – N 010);

prof. dr. Adrián Llerena Ruiz (Estremadūros universitetas (Ispanija), medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Disertacija bus ginama viešajame biologijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2026 m. rugpjūčio 28 d. 12 val. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Kardiologijos instituto posėdžių salėje.

Disertacijos gynimo vietos adresas: Sukilėlių pr. 15, LT-50162 Kaunas, Lietuva.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES

Ieva Čiapienė

**INTERACTION BETWEEN THE
RENIN–ANGIOTENSIN SYSTEM, CYP4F2,
AND 20-HYDROXYEICOSATETRAENOIC
ACID IN ENDOTHELIAL DYSFUNCTION
AND ATHEROSCLEROSIS:
AN INVESTIGATION OF CELLULAR
BIOMARKERS AND THERAPEUTIC
MODULATION**

Doctoral Dissertation
Natural Sciences,
Biology (N 010)

Kaunas, 2026

The dissertation has been prepared at the Laboratory of Molecular Cardiology of the Institute of Cardiology, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences during the period of 2021–2026.

Scientific Supervisor

Prof. Dr. Vacis Tatarūnas (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010).

Consultant

Prof. Dr. Agnė Giedraitienė (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010).

The dissertation is defended at the Biology Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences:

Chairperson

Prof. Dr. Vilmantė Borutaitė (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010).

Members:

Prof. Dr. Ilona Sadauskienė (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010);

Prof. Dr. Indrė Čėponienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001);

Dr. Daiva Bironaitė (Centre for Innovative Medicine, Natural Sciences, Biology – N 010);

Prof. Dr. Adrián Llerena Ruiz (University of Extremadura (Spain), Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

The dissertation will be defended at the open session of the Biology Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences at 12 p.m. on the 28th of August 2026, in the Meeting Hall of the Institute of Cardiology, Lithuanian University of Health Sciences.

Address: Sukilėlių 15, LT-50162 Kaunas, Lithuania.

TURINYS

SĄVOKOS.....	10
ĮVADAS	11
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	16
1.1. Išeminės širdies ligos epidemiologija ir patogenezė.....	16
1.1.1. Endotelio funkcijos ir disfunkcijos ypatumai širdies ir kraujagyslių sistemoje.....	19
1.1.2. Kraujagyslių funkcijos palaikymas veikiant azoto oksidui.....	21
1.2. Renino-angiotenzino sistema	22
1.2.1. Renino-angiotenzino sistemos vaidmuo aterosklerozės vystymuisi.....	24
1.3. Endotelio disfunkcijos biožymenys	26
1.3.1. Arachidono rūgšties metabolitai	27
1.3.2. 20-hidroksieikozatetraeno rūgštis	30
1.3.3. CYP4F2–20-HETE ašis: sąsajos su uždegimu ir kraujo krešėjimo sistema, genetinių veiksnių įtaka 20-HETE koncentracijai	31
1.4. Išeminės širdies ligos ir renino-angiotenzino sistemos sąsajos su inkstų funkcija	34
1.4.1. RAS inhibitorių poveikis ARA metabolizmo, uždegimo ir inkstų funkcijos reguliacijai.....	35
1.4.2. 20-HETE ir inkstų funkcijos reguliacija: GPR75 receptoriai	39
1.5. Žemo dažnio ultragarso poveikis RAS inhibitorių biologiniam atsakui	42
2. TYRIMO MEDŽIAGOS IR METODAI.....	45
2.1. Tyrimo struktūra.....	45
2.2. Bioetika	46
2.3. Reagentai, priemonės, įranga	46
2.3.1. Ląstelių linijos.....	46
2.3.2. Reagentai.....	47
2.3.3. Priemonės.....	48
2.3.4. Laboratorinė įranga.....	48
2.3.5. Programinė įranga	49
2.4. Tyrimo metodai su ląstelių kultūromis	49
2.4.1. Ląstelių kultūrų kultivavimas.....	49
2.4.2. Ląstelių kultūrų veikimas širdies ir kraujagyslių sistemą veikiančiais vaistais.....	50
2.4.3. Ląstelių kultūrų sinerginis veikimas vaistais ir žemo dažnio ultragarsu.....	51
2.4.4. Ląstelių kultūrų metabolinio aktyvumo nustatymas	52
2.4.5. Ląstelių kultūrų proliferacijos ir ląstelių dydžio įvertinimas	53

2.4.6.	Ląstelių kultūrų migracijos tyrimas „žaizdos gijimo“ metodu	53
2.4.7.	Azoto oksido kiekio nustatymas	54
2.4.8.	Aktyvių deguonies junginių nustatymas	55
2.4.9.	Genų raiškos tyrimas.....	55
2.4.10.	CYP4F2 nustatymas.....	58
2.4.11.	Eikozanoidų išskyrimas ir 20-HETE nustatymas	58
2.4.12.	GPR75 vertinimas netiesioginės imunofluorescencijos metodu.....	59
2.5.	Tyrimo metodai su žmonių biologine medžiaga.....	59
2.5.1.	Tiriamųjų pacientų grupės.....	59
2.5.2.	Palyginamoji grupė	61
2.5.3.	Genominės DNR išskyrimas ir genų variantų tyrimas tikro laiko polimerazės grandininės reakcijos metodu	61
2.5.4.	Trombocitų agregacijos tyrimas.....	62
2.5.5.	Eikozanoidų išskyrimas iš kraujo plazmos mėginių	63
2.5.6.	20-HETE nustatymas ELISA metodu	63
2.5.7.	ACE2 nustatymas ELISA metodu.....	64
2.6.	Statistinė duomenų analizė	64
3.	REZULTATAI	66
3.1.	<i>In vitro</i> tyrimų su ląstelių kultūromis rezultatai.....	66
3.1.1.	<i>CYP4F2</i> raiškos pokyčių vertinimas endotelio ir kepenų ląstelėse	66
3.1.2.	RAS inhibitorių poveikis endotelio ląstelių funkcijai.....	68
3.1.3.	RAS inhibitorių poveikis inkstų proksimalinių kanalėlių epitelinių ląstelių funkcijai.....	73
3.1.4.	RAS inhibitorių poveikis su RAS, uždegimu ir eikozanoidų metabolizmu susijusių žymenų genų raiškai endotelio ląstelėse	76
3.1.5.	RAS inhibitorių poveikis su RAS, uždegimu ir eikozanoidų metabolizmu susijusių žymenų genų raiškai inkstų proksimalinių kanalėlių epitelinėse ląstelėse	81
3.1.6.	RAS inhibitorių poveikis su RAS, uždegimu ir eikozanoidų metabolizmu susijusių žymenų genų raiškai kepenų ląstelėse.....	86
3.1.7.	Žemo dažnio UG ir RAS inhibitorių poveikis endotelio ląstelių funkcijai	90
3.1.8.	Žemo dažnio UG ir RAS inhibitorių poveikis inkstų proksimalinių kanalėlių epitelinių ląstelių funkcijai	92
3.1.9.	Žemo dažnio UG ir RAS inhibitorių poveikis su uždegimu ir eikozanoidų metabolizmu susijusių žymenų genų raiškai endotelio ląstelėse	95
3.1.10.	RAS inhibitorių poveikis 20-HETE susidarymui endotelio ląstelėse	99
3.1.11.	Hidroksieikozatetraeno rūgščių poveikis ląstelių funkcijai	100
3.1.12.	Hidroksieikozatetraeno rūgščių poveikis receptoriaus <i>GPR75</i> raiškai	102

3.2. Tyrimų su žmonių biologine medžiaga rezultatai	105
3.2.1. Tiriamųjų imtis ir grupių charakteristika	105
3.2.2. ACE2 ir 20-HETE koncentracijų sąsajos su vartojamais vaistais	111
3.2.3. Genetinių veiksnių įtaka ACE2 ir 20-HETE koncentracijai	114
3.2.4. ACE2 ir 20-HETE koncentracijų sąsajos su klinikiniais ir laboratoriniais rodikliais	121
3.2.5. Vienaveiksė ir daugiaveiksė logistinė regresija ŪKS prognozavimui	122
4. REZULTATŲ APTARIMAS.....	125
4.1. ARA metabolizmo fermento CYP4F2 raiškos pokyčiai ląstelių kultūrose	125
4.2. RAS inhibitorių poveikis ląstelių funkcijai ir genų raiškai.....	127
4.3. Sinerginis žemo dažnio UG ir RAS inhibitorių poveikis ląstelių funkcijai ir genų raiškai.....	131
4.4. RAS inhibitorių poveikis 20-HETE sintezei, 20-HETE–GPR75 ašies tyrimai	133
4.5. RAS–ACE2 ir CYP4F2–20-HETE ašių klinikinė reikšmė sergant IŠL	135
IŠVADOS	141
PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS	143
SUMMARY	144
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	196
PASKELBTOS PUBLIKACIJOS.....	215
PRIEDAI.....	221
CURRICULUM VITAE	224
PADĖKA.....	226

SANTRUMPOS

19-HETE	–	19-hidroksieikozatetraeno rūgštis (angl. <i>19-hydroxyeicosatetraenoic acid</i>)
20-HETE	–	20-hidroksieikozatetraeno rūgštis (angl. <i>20-hydroxyeicosatetraenoic acid</i>)
ACE	–	angiotenziną konvertuojantis fermentas (angl. <i>angiotensin-converting enzyme</i>)
ACE2	–	angiotenziną konvertuojantis fermentas 2 (angl. <i>angiotensin-converting enzyme 2</i>)
ADF	–	adenozino difosfatas
ADJ	–	aktyvūs deguonies junginiai (angl. <i>reactive oxygen species</i>)
AH	–	arterinė hipertenzija
AKFi	–	angiotenziną konvertuojančio fermento inhibitoriai
ALT	–	alanino aminotransferazė
Ang 1–7	–	angiotenzinas 1–7
Ang I	–	angiotenzinas I
Ang II	–	angiotenzinas II
ARA	–	arachidono rūgštis (angl. <i>arachidonic acid</i>)
ARB	–	angiotenzino II receptorių blokatoriai
AST	–	aspartato aminotransferazė
AT ₁	–	angiotenzino II 1 tipo receptoriai
AT ₂	–	angiotenzino II 2 tipo receptoriai
AUC	–	plotas po kreive (angl. <i>area under the curve</i>)
BH ₄	–	tetrahidrobiopterinas (angl. <i>tetrahydrobiopterin</i>)
BSA	–	galvijų serumo albuminas (angl. <i>bovine serum albumin</i>)
COX	–	ciklooksigenazės (angl. <i>cyclooxygenases</i>)
CRB	–	C reaktyvusis baltymas
CYP	–	citochromo P450 fermentai (angl. <i>cytochrome P450 enzymes</i>)
CYP4F2	–	citochromo P450 4 šeimos F pošeimio 2 polipeptidas (angl. <i>cytochrome P450 family 4 subfamily F member 2</i>)
DAPT	–	dviguba antiagregacinė terapija (angl. <i>dual antiplatelet therapy</i>)
DKTA	–	daugiasluoksnė kompiuterinės tomografijos angiografija
DMSO	–	dimetilsulfoksidas (angl. <i>dimethyl sulfoxide</i>)
DTL	–	didelio tankio lipoproteinai
ED	–	endotelio disfunkcija (angl. <i>endothelial dysfunction</i>)
eNOS	–	endotelio azoto oksido sintazė (angl. <i>endothelial nitric oxide synthase</i>)
ES	–	Europos Sąjunga
ET-1	–	endotelinas-1 (angl. <i>endothelin-1</i>)
FBS	–	veršelių vaisiaus serumas (angl. <i>fetal bovine serum</i>)
GPR75	–	G baltymą jungiantis receptoriai 75 (angl. <i>G protein-coupled receptor 75</i>)
GS	–	galimybių santykis
HETE	–	hidroksieikozatetraeno rūgštys (angl. <i>hydroxyeicosatetraenoic acids</i>)
HPETE	–	hidroperoksieikozatetraeno rūgštys (angl. <i>hydroperoxyeicosatetraenoic acids</i>)
ICAM-1	–	tarpląstelinė adhezijos molekulė 1 (angl. <i>intercellular adhesion molecule 1</i>)
IL-6	–	interleukinas-6 (angl. <i>interleukin-6</i>)
IŠL	–	išeminė širdies liga
KMI	–	kūno masės indeksas
LOX	–	lipoksigenazės (angl. <i>lipoxygenases</i>)

LTB ₄	–	leukotrienas B ₄ (angl. <i>leukotriene B₄</i>)
MI	–	miokardo infarktas
MTL	–	mažo tankio lipoproteinai
MTT	–	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio bromidas (angl. <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide</i>)
ND	–	nėra duomenų (angl. <i>no data</i>)
NO	–	azoto oksidas (angl. <i>nitric oxide</i>)
NOX	–	NADPH oksidazė (angl. <i>NADPH oxidase</i>)
O ₂ [–]	–	superoksido anijonas
ONOO [–]	–	peroksinitritas
PAI-1	–	plazminogeno aktyvatoriaus inhibitorius-1 (angl. <i>plasminogen activator inhibitor-1</i>)
PBS	–	fosfatinis buferinis druskų tirpalas (angl. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PGH ₂	–	prostaglandinas H ₂ (angl. <i>prostaglandin H₂</i>)
PGI ₂	–	prostaglandinas I ₂ (angl. <i>prostaglandin I₂</i>)
PI	–	pasikliautinasis intervalas
PK	–	pokytis kartais (angl. <i>fold change</i>)
PLA ₂	–	fosfolipazė A ₂ (angl. <i>phospholipase A₂</i>)
PGR	–	polimerazės grandininė reakcija
PTGS1	–	prostaglandino-endoperoksido sintazė 1 (angl. <i>prostaglandin-endoperoxide synthase 1</i>)
PTGS2	–	prostaglandino-endoperoksido sintazė 2 (angl. <i>prostaglandin-endoperoxide synthase 2</i>)
RAS	–	renino-angiotenzino sistema (angl. <i>renin-angiotensin system</i>)
SKA	–	stabili krūtinės angina
SN	–	standartinis nuokrypis
ŠKL	–	širdies ir kraujagyslių ligos
TFRC	–	transferino receptorius (angl. <i>transferrin receptor</i>)
TGF-β	–	transformuojantis augimo veiksnys β (angl. <i>transforming growth factor beta</i>)
TNF-α	–	naviko nekrozės veiksnys α (angl. <i>tumor necrosis factor alpha</i>)
TXA ₂	–	tromboksanas A ₂ (angl. <i>thromboxane A₂</i>)
UG	–	ultragarsas
VA	–	vainikinės arterijos
VAA	–	vainikinių arterijų angiografija
VAL	–	vainikinių arterijų liga
VCAM-1	–	kraujagyslių ląstelių adhezijos molekulė 1 (angl. <i>vascular cell adhesion molecule 1</i>)
VEGF	–	kraujagyslių endotelio augimo veiksnys (angl. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
vWF	–	<i>von Willebrand</i> veiksnys (angl. <i>von Willebrand factor</i>)
ŪKS	–	ūmus koronarinis sindromas

SAVOKOS

Aktyvūs deguonies junginiai (ADJ) – aktyvios, trumpaamžės deguonies turinčios molekulės ir radikalai, ląstelėse susidarantys fiziologinėmis ir patofiziologinėmis sąlygomis, tačiau jų perteklinė gamyba ar nepakankamas neutralizavimas sukelia oksidacinį stresą, kuris lemia uždegimą ir audinių pažeidimą.

Arachidono rūgštis – polinesočioji ω -6 riebalų rūgštis, esanti ląstelių membranų fosfolipiduose ir veikianti kaip pagrindinis substratas uždegimo bei kraujagyslių funkciją reguliuojančių eikozanoidų biosintzei.

Aterosklerozė – lėtinė, progresuojanti arterijų sienų liga, kuriai būdinga endotelio disfunkcija, lipoproteinų kaupimasis intimoje, uždegiminių ląstelių infiltracija ir aterominės plokštelės, dengtos jungiamojo audinio sluoksniu, formavimasis.

Endotelio disfunkcija – sutrikusi vidinio kraujagyslių sluoksnio funkcija, kai sumažėja azoto oksido gamyba, sutrinka kraujagyslių tonuso, uždegimo ir kraujo krešėjimo reguliacija, o kraujagyslės tampa mažiau atsparios žalingiems veiksniams ir aterosklerozei.

Išeminė širdies liga – klinikinis sindromas, atsirandantis dėl nepakankamos vainikinių arterijų perfuzijos, sukeliantis išemiją ir su ja susijusius struktūrinius bei funkcinis miokardo pakitimus.

Renino-angiotenzino sistema (RAS) – organizmo reguliacinė sistema, koordinuojanti kraujospūdžio, skysčių ir elektrolitų pusiausvyrą bei kraujagyslių tonusą, veikiant angiotenzino peptidams.

Stabili krūtinės angina – prognozuojamo intensyvumo ir dažnio krūtinės skausmo ar diskomforto epizodai, kurie pasireiškia fizinio ar emocinio krūvio metu dėl pastovaus, hemodinamiškai reikšmingo vainikinių arterijų spindžio susiaurėjimo.

Trombocitų agregacija – procesas, kurio metu aktyvuoti trombocitai tarpusavyje jungiasi, inicijuodami trombo formavimąsi.

Ūminis koronarinis sindromas – ūmi, gyvybei pavojinga klinikinių būklių grupė, apimanti nestabilią krūtinės anginą ir miokardo infarktą, kuri išsivysto dėl staiga sumažėjusios vainikinės arterijos perfuzijos, dažniausiai nulemtos aterosklerozinės plokštelės plyšimo, trombo formavimosi ir ūmaus kraujagyslės spindžio susiaurėjimo, sukeliančio miokardo išemiją.

IVADAS

Išeminė širdies liga (IŠL), Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) vertinimu, yra viena dažniausių lėtinių neinfekcinių ligų ir sudaro didžiausią sergamumo ir mirtingumo dalį širdies ir kraujagyslių ligų (ŠKL) grupėje tiek pasaulio, tiek ir Europos mastu [1]. Nepaisant reikšmingos pažangos IŠL prevencijos ir gydymo srityje, epidemiologiniai rodikliai rodo, kad Lietuva patenka tarp Europos valstybių, kurioms būdingas itin didelis vainikinių arterijų ligos ir IŠL paplitimas bei mirtingumas [2, 3]. IŠL klinikinė išraiška yra heterogeniška – apima lėtinius ir ūminius išeminius sindromus [4]. Lėtiniai išeminiai sindromai siejami su ilgalaikiais, santykinai stabiliais miokardo perfuzijos sutrikimais, o ūminiai – su staigiais vainikinių arterijų (VA) okliuzijos įvykiais, dažniausiai nulemtais aterosklerozinės plokštelės plyšimo ir trombozės. Dėl šios priežasties vis daugiau dėmesio skiriama molekulinų ir biocheminių žymenų paieškai, kurie galėtų padėti tiksliau vertinti ligos eigą, prognozuoti klinikines baigtis ir individualizuoti gydymą.

IŠL patogenezė yra daugialypė ir apima tarpusavyje susijusius hemodinaminius, uždegiminius, oksidacinius ir trombozinius mechanizmus. Pastarųjų dešimtmečių eksperimentinių ir klinikinių tyrimų duomenys rodo, jog epikardinių VA ar net smulkiųjų kraujagyslių endotelio funkcijos sutrikimas yra svarbus IŠL patogenezės veiksnys [5–7]. Ši būklė, vadinama endotelio disfunkcija (ED), yra apibūdinama kaip endotelio ląstelių funkcinės homeostazės pažeidimas, lemiantis pakitusį kraujagyslių biologinį atsaką į fiziologinius ir patologinius veiksnus. ED pasižymi pakitusia kraujagysles plečiančių ir sutraukiančių veiksmų pusiausvyra, padidėjusiu oksidaciniu stresu, uždegiminių signalinių kelių aktyvumu bei kraujagyslių pralaidumo reguliacijos pokyčiais [8]. Šie tarpusavyje susiję procesai sudaro palankias sąlygas aterosklerozės progresavimui, prisideda prie vainikinės mikrocirkuliacijos funkcinių sutrikimų ir lemia miokardo perfuzijos nepakankamumą, kuris kliniškai pasireiškia išemijos sindromu. ED vertinama kaip vienas ankstyviausių širdies ir kraujagyslių sistemos funkcijos sutrikimo požymių. Sutrikus endotelio funkcijai, smulkiosios kraujagyslės praranda gebėjimą adekvačiai išsiplėsti padidėjus miokardo metaboliniams poreikiams. Epikardinių VA lygmeniu ED yra ankstyvas kraujagyslių sienos funkcinis pažeidimas, pasireiškiantis dar prieš susiformuojant struktūriniams ateroskleroziniams pakitimams [9]. Dėl šios priežasties endotelio funkcijos nustatymas ir įvertinimas gali būti naudinga priemonė IŠL rizikos bei ateroprotekcinio gydymo vertinimui. Nors endotelio funkcijos vertinimas klinikinėje praktikoje išlieka metodiškai sudėtingas, vis daugiau dėmesio skiriama molekuliniais ir biocheminiams rodikliams, atspindintiems endotelio aktyvaciją ir uždegiminę

būklę. Kraujyje cirkuliuojantys biožymenys ir endotelio ląstelių signalinių kelių pokyčiai leidžia netiesiogiai vertinti endotelio funkciją bei farmakoterapijos poveikį, ypač tiriant vaistų poveikį uždegimo ir kraujagyslių funkcijos reguliacijai [10].

Vienas svarbiausių biologinių reguliacinių mechanizmų, tiesiogiai dalyvaujančių endotelio funkcijos reguliacijoje, yra renino-angiotenzino sistema (RAS). Ši sistema dalyvauja kraujagyslių tonuso, uždegiminių procesų ir endotelio homeostazės kontrolėje [11]. RAS komponentų disbalansas siejamas su ED vystymusi, aterosklerozės progresavimu bei nepalankiais klinikiniais IŠL baigties rodikliais. Todėl šios sistemos farmakologinis slopinimas angiotenziną konvertuojančio fermento inhibitoriais (AKFi) ar angiotenzino II receptorių blokatoriais (ARB) pripažįstamas svarbia ateroprotekcinio gydymo dalimi [12–14]. Pastaraisiais metais vis didesnio dėmesio sulaukia ir alternatyvioji RAS ašis, susijusi su angiotenziną konvertuojančiu fermentu 2 (ACE2). Tyrimai su selektyviais ACE2 inhibitoriais suteikia galimybę detaliau įvertinti šios sistemos poveikį endotelio funkcijai molekulinio lygmeniu. Sisteminės hemodinamikos ir RAS aktyvumo kontrolėje aktyviai dalyvauja inkstai, tad inkstų ląstelių modeliai taip pat gali būti svarbūs vertinant sisteminius kraujagyslių funkcijos sutrikimus. Greta RAS, kraujagyslių homeostazei palaikyti taip pat svarbus ir CYP4F2–20-hidroksieikozatetraeno rūgšties (20-HETE)–GPR75 signalinis kelias, susijęs su kraujagyslių uždegimo ir trombogenezės reguliacija [15]. Naujausi tyrimai rodo, kad antitrombocitiniai vaistai (antiagregantai) gali netiesiogiai veikti CYP4F2 aktyvumą ir daryti pleotropinį poveikį endotelio funkcijai, neapsiribojant vien hemostazės slopinimu [16]. Taigi, RAS ir CYP4F2–20-HETE–GPR75 ašių sąveika gali būti svarbi aiškinant tiek kraujagyslių pažaidos mechanizmus, tiek individualius pacientų atsako į gydymą vaistais skirtumus.

Nors pagal Europos kardiologų draugijos gaires RAS inhibitoriai ar antitrombocitiniai vaistai yra standartinė IŠL gydymo dalis, klinikinėje praktikoje stebimas reikšmingas terapinio atsako kintamumas. Pacientų atsako į gydymą skirtumus lemia ne tik klinikiniai veiksniai, bet ir farmakogenominiai mechanizmai, tokie kaip fermentų transkripcinė reguliacija, epigenetiniai procesai ar uždegiminės mikroaplinkos poveikis fermentų aktyvumui. Siekiant sustiprinti farmakologinį atsaką molekulinio lygmeniu, aktyviai ieškoma šio atsako reguliavimo būdų. Eksperimentiniuose modeliuose tiriami nefarmakologiniai biologinio atsako moduliavimo būdai. Vienas iš jų – žemo dažnio ultragarsas (UG), kuris gali veikti ląstelių membranų pralaidumą, signalinių kelių aktyvumą ir genų raišką, taip potencialiai sustiprindamas farmakologinių junginių poveikį bei keisdamas ląstelių funkcijas. Todėl RAS, CYP4F2–20-HETE–GPR75 signalinio kelio ir endotelio funkcijos tarpusavio sąveikos tyrimas yra svarbus siekiant geriau suprasti terapinio

atsako kintamumą ir nustatyti naujus ateroprotekcinės terapijos žymenis bei taikinius.

Šiame tyrime atlikti eksperimentiniai *in vitro* tyrimai su ląstelių kultūromis, kurių metu buvo siekiama įvertinti RAS ir eikozanoidų metabolizmo sąveiką molekulinio lygmeniu. Ypatingas dėmesys skirtas CYP4F2–20-HETE metabolinei ašiai, analizuojant jos reguliacijos pokyčius, kuriuos lemia RAS inhibitoriai, antikoagulantai ir antiagregantai. Endotelio, inkstų ir kepenų ląstelėse buvo vertintas farmakologinių junginių (kaptoprilio, losartano, MLN-4760) poveikis genų ir baltymų raiškai, signalinių kelių aktyvumui bei funkciniam ląstelių atsako parametrams. Papildomai *in vitro* tyrimuose taikytas žemo dažnio ir intensyvumo UG, siekiant įvertinti, ar šis fizinis veiksnys gali keisti vaistų biologinį aktyvumą ir sustiprinti jų poveikį ląstelių signaliniams mechanizms. Ląstelių kultūrose nustatyti su RAS ir CYP4F2–20-HETE keliu susiję biožymenys ir įvertinti jų pokyčiai, o vėliau šių biožymenų pokyčiai buvo analizuoti ir IŠL sirgusių pacientų, gydytų RAS inhibitoriais, kraujo plazmoje. Skirtingose IŠL pasireiškimo formose analizuotos šių biožymenų sąsajos su klinikinėmis charakteristikomis ir laboratorinių tyrimų parametrais. Toks ląstelių kultūrų ir klinikinių duomenų vertinimas sudarė prielaidas sistemškai įvertinti RAS ir CYP4F2–20-HETE kelio reikšmę IŠL patogenezėje bei jų, kaip galimų farmakologinio poveikio taikinių, reikšmę sergant IŠL.

Hipotezės:

1. RAS inhibitorių poveikis endotelio, inkstų ir kepenų ląstelių funkcijai gali būti susijęs ne tik su klasikiniu RAS slopinimu, bet ir su CYP4F2–20-HETE–GPR75 signalinio kelio moduliacija, lemiančia uždegimo, oksidacinio streso ir metabolinių procesų pokyčius.
2. Žemo dažnio UG, taikomas kartu su AKFi ar ARB, gali sustiprinti šių vaistų biologinį poveikį ląstelių kultūrose, veikdamas funkcinis ląstelių atsako parametrus, signalinių kelių aktyvumą ir genų raišką.
3. RAS–ACE2 ir CYP4F2–20-HETE–GPR75 signalinių ašių pusiausvyros pokyčiai gali būti susiję su IŠL klinikinės eigos heterogeniškumu bei prisidėti prie ligos progresavimo į ūmines formas.

Darbo tikslas

Ištirti renino-angiotenzino sistemos inhibitorių, žemo dažnio ultragarso ir CYP4F2–20-HETE–GPR75 ašies moduliacijos poveikį endotelio, inkstų ir kepenų ląstelių funkcijai bei įvertinti su RAS–ACE2 ir eikozanoidų meta-

bolizmu susijusių biožymenų klinikinę reikšmę išemine širdies liga sergančių ir sveikų asmenų grupėse.

Uždaviniai:

1. Įvertinti antikoagulantų ir antiagregantų poveikį CYP4F2 geno ir baltymo raiškai endotelio ląstelių kultūrose.
2. Įvertinti AKFi, ARB ir ACE2 inhibitoriaus MLN-4760 poveikį endotelio, inkstų ir kepenų ląstelių funkciniam rodikliams, RAS, eikozanoidų metabolizmo ir uždegimo genų raiškai bei 20-HETE aktyvumui.
3. Įvertinti žemo dažnio ultragarso, taikomo kartu su AKFi ir ARB, poveikį endotelio ir inkstų ląstelių funkciniam rodikliams bei RAS, eikozanoidų metabolizmo ir uždegimo genų raiškai.
4. Įvertinti 20-HETE ir 19(R)-HETE poveikį endotelio, inkstų ir kepenų ląstelių metaboliniam aktyvumui bei GPR75 receptoriaus raiškai.
5. Ištirti IŠL sergančių ir RAS inhibitoriais gydytų pacientų kraujo plazmos ACE2 ir 20-HETE koncentracijas, įvertinti CYP4F2 genotipų variantų įtaką 20-HETE koncentracijai bei šių biožymenų sąsajas su trombocitų funkcija, klinicine IŠL forma ir vainikinių arterijų pažeidimo pobūdžiu.

Darbo mokslinis naujumas

Iki šiol IŠL patogenezės ir jos gydymo atsako kintamumo tyrimuose daugiausia dėmesio buvo skiriama klasikiniam hemodinaminiam ir trombo-genezės mechanizmomams. Tačiau tarpusavyje susijusių reguliacinių sistemų – RAS ir CYP4F2–20-HETE–GPR75 signalinio kelio – sąveika ED ir IŠL vystymesi nėra pakankamai ištirta. Šiame darbe pirmą kartą ištirta, kaip terapinė RAS moduliacija ir hemostazę veikiantys vaistai keičia CYP4F2–20-HETE–GPR75 ašies aktyvumą, uždegimo žymenis ir funkcinis ląstelių atsako parametrus ne tik endotelio, bet ir inkstų bei kepenų ląstelių modeliuose. Nustatyta, kad rivaroksabanas, tiesioginis aktyvuoto X krešėjimo veiksnio inhibitorius, ir antiagregantas tikagreloras reikšmingai slopina CYP4F2 raišką endotelio ląstelėse, ir tai leidžia CYP4F2 įvardyti kaip su uždegimu ir eikozanoidų metabolizmu susijusį molekulinį žymenį. Pirmą kartą vieno tyrimo metu palygintas AKFi (kaptoprilio), ARB (losartano) ir ACE2 inhibitoriaus (MLN-4760) poveikis RAS sistemos dalims ir CYP4F2–20-HETE–GPR75 ašiai skirtingų tipų ląstelėse. Nustatyta, kad endotelio ląstelėse kaptoprilis mažina 20-HETE aktyvumą, losartanas slopina CYP4F2 raišką, o MLN-4760 didina 20-HETE aktyvumą ir GPR75 raišką, taip

patvirtindami alternatyvios RAS ašies reikšmę ląstelių homeostazėje. Inkstų ląstelių kultūrose stebėtas analogiškas poveikio pobūdis – losartanas slopino *CYP4F2* raišką, o MLN-4760 didino *GPR75* raišką.

Šiame darbe taip pat pateikiami nauji duomenys apie sinerginę žemo dažnio UG ir RAS inhibitorių sąveiką endotelio ir inkstų ląstelių kultūrų modeliuose. Nustatyta, kad žemo dažnio UG geba sustiprinti RAS inhibitorių biologinį poveikį, keisdamas *CYP4F2* raišką ir funkcinius ląstelių atsako rodiklius. Gauti rezultatai pirmą kartą patvirtino sinerginį farmakologinės ir fizikinės RAS reguliacijos potencialą.

In vitro modeliuose nustatyti RAS–ACE2 ir CYP4F2–20-HETE ašių pokyčiai buvo įvertinti IŠL sergančių ir RAS inhibitoriais gydytų pacientų grupėje, atsižvelgiant į IŠL kliniškes formas bei taikomą farmakoterapiją. Atskleista, kad ACE2 ir 20-HETE koncentracijos yra susijusios su IŠL klinikinėmis formomis, o 20-HETE pasižymi didesne diagnostine verte diferencijuojant stabilias ir ūmines būkles. Šie rezultatai išplečia suvokimą apie RAS ir eikozanoidų metabolizmo sąveiką bei jų vaidmenį IŠL patogenezėje, pabrėžiant šių molekulių ašių potencialą kaip biožymenų ir galimų taikinių personalizuojant IŠL diagnostiką ir gydymą.

Darbo praktinė reikšmė

In vitro tyrimų rezultatai parodė, kad žemo dažnio UG gali sustiprinti RAS inhibitorių poveikį endotelio ir inkstų ląstelių funkcijai, veikdamas su RAS ir eikozanoidų metabolizmu susijusius signalinius mechanizmus, įskaitant *CYP4F2* raišką ir funkcinius ląstelių atsako parametrus (ląstelių migraciją, NO susidarymą). Klinikinėje praktikoje RAS inhibitorių veiksmingumas neretai išlieka nevienodas, o papildomos priemonės jų biologiniam poveikiui stiprinti šiuo metu nėra taikomos. Tai pagrindžia tolesnių klinikinių tyrimų poreikį, vertinantį žemo dažnio UG kaip galimą neinvazinę priemonę farmakoterapijos veiksmingumui didinti sergant IŠL.

Tyrimų su pacientų kliniške medžiaga metu nustatytos ACE2 ir 20-HETE koncentracijų sąsajos su ADF indukuota trombocitų agregacija, vartojamų RAS inhibitorių tipu ir VA pažeidimo laipsniu rodo šių biožymenų potencialą vertinant trombozinį aktyvumą ir endotelio funkcijos būklę sergant IŠL. Šių kraujo biožymenų įtraukimas į klinikinį vertinimą galėtų padėti tiksliau įvertinti gydymo RAS inhibitoriais biologinį poveikį ir pagrįsti labiau individualizuotą terapinių sprendimų priėmimą sergant IŠL.

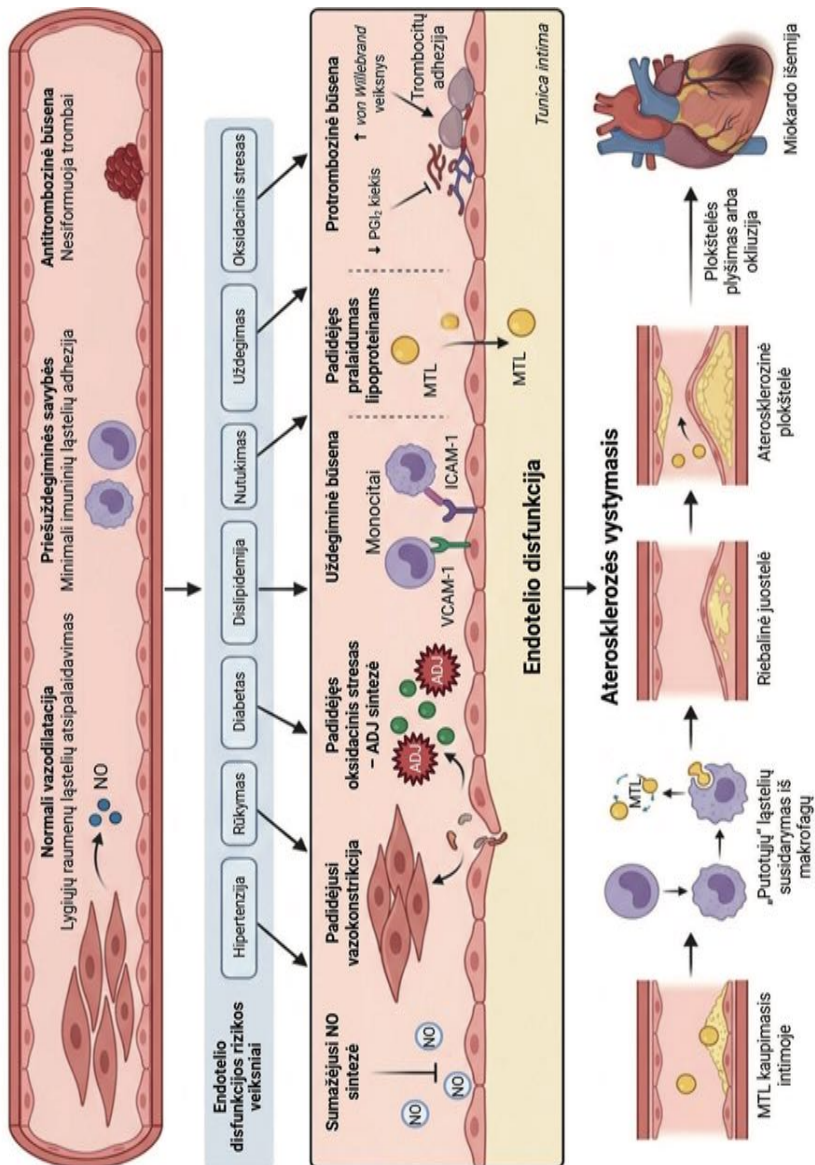
1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Išeminės širdies ligos epidemiologija ir patogenezė

Širdies ir kraujagyslių ligos (ŠKL) yra pagrindinė sergamumo ir mirtinumo priežastis Vakarų visuomenėse, nepaisant reikšmingos pažangos diagnostikos, gydymo ir prevencijos srityse. Kasmet pasaulyje nuo ŠKL miršta apie 19,8 mln. žmonių [17]. Europos Sąjungoje (ES) 2022 m. nuo ŠKL mirė 1,68 mln. žmonių – tai sudarė 32,7 proc. visų mirčių [3]. Eurostat duomenimis, Lietuvoje mirtingumo rodikliai nuo ŠKL yra vieni didžiausių ES. 2024 m. Higienos instituto duomenimis, Lietuvoje ŠKL sudarė daugiau kaip pusę visų mirties priežasčių (50,8 proc.), dvigubai viršijant mirčių nuo piktybinių navikų skaičių (21,5 proc.) [18]. Tarp ŠKL didžiausią klinikinę reikšmę turi išeminė širdies liga (IŠL), lemianti 59,7 proc. mirčių šioje ligų grupėje [18]. Siekiant sumažinti sergamumą ir mirtinumą nuo IŠL, būtina detaliai nagrinėti jos patogenezę ir nustatyti veiksnius bei biožymenis, svarbius ne tik ankstyvai ligos diagnostikai ir rizikos įvertinimui, bet ir personalizuoto gydymo parinkimui.

IŠL apima tiek lėtinius (stabili krūtinės angina), tiek ūminius miokardo išemijos sindromus (ŪKS) – nestabilią krūtinės angina, ūminį miokardo infarktą. Ši būklė pasireiškia miokardo išemija, kuri atsiranda sutrikus vainikinių arterijų (VA) kraujotakai ir nepakankamai aprūpinant širdies audinius arteriniu krauju. Dažniausia IŠL priežastis yra aterosklerozės sukelta vainikinių arterijų liga (VAL) – VA aterosklerozinės kilmės stenozės, ribojančios miokardo perfuziją ir sukeliančios išemiją. Šių pakitimų pradžia yra siejama su endotelio funkcijos sutrikimais – endotelio disfunkcija (ED) laikytina ankstyviausiu aterogenezės etapu. Tai būklė, kai pažeidžiama endotelio ląstelių funkcinė homeostazė, lemianti pakitusį kraujagyslių biologinį atsaką į hemodinaminius ir biocheminius dirgiklius.

Normali endotelio funkcija



1.1.1 pav. Endotelio funkcijos sutrikimo mechanizmai ir jų vaidmuo aterogenezėje

Adaptuota pagal Abdu ir bendr. [20]. ADJ – aktyvūs deguonies junginiai; MTL – mažo tankio lipoproteinai; NO – azoto oksidas; PGI₂ – prostaciklinas.

Sutrikus endotelio barjerinei ir reguliacinei funkcijai, didėja kraujagyslių sienos pralaidumas, mažėja azoto monoksido (NO) biologinis prieinamumas, suaktyvėja adhezijos molekulių ir chemokinių raiška (1.1.1 pav.). Šie patofiziologiniai pokyčiai skatina mažo tankio lipoproteinų (MTL) cholesterolio kaupimąsi arterijos intimoje ir monocitų adheziją prie aktyvuoto endotelio. Tai yra pagrindinis VAL patogenezės mechanizmas. Intimoje MTL, veikiami aktyvių deguonies junginių (ADJ, angl. *reactive oxygen species*, ROS) bei lipoksigenazių, yra oksiduojami. Vyksta lėtinė uždegiminė reakcija – oksiduoti MTL skatina monocitų migraciją per endotelį ir jų diferenciaciją į makrofagus. Pastarieji, fagocituodami oksiduotus MTL bei esant jų pertekliui, virsta vadinamosiomis putotosiomis ląstelėmis. Jų kaupimasis lemia riebalinių ruoželių (angl. *fatty streaks*) susidarymą. Lėtinis uždegimas, oksidacinis stresas ir sutrikęs cholesterolio šalinimas skatina lipidų sankaupos didėjimą, aktyvina uždegiminius signalinius kelius, įskaitant NF- κ B, ir lemia nekrozinio branduolio susidarymą. Tuo pat metu lygiųjų raumenų ląstelės migruoja iš medijos į intimą, proliferuoja ir sintetina užląstelinės matricos komponentus, sudarydamos jungiamojo audinio stogelį, kuris dengia nekrozinį branduolį. Aterosklerozei progresuojant, plokštelių stabilumą mažina hemodinaminiai pakitimai ir uždegiminė aplinka. Dėl šių procesų jungiamojo audinio stogelis plonėja, plokštelė tampa nestabili ir gali plyšti. Plyšus plokštei, į kraujotaką patenka trombogeniškos medžiagos (audinių veiksnys, oksiduoti lipidai), aktyvuojama trombocitų ir koaguliacijos kaskada. Dėl to vystosi trombozė ir staigus vainikinės kraujotakos sutrikimas, kuris kliniškai pasireiškia ŪKS [19].

Svarbu pažymėti, jog ED yra svarbi tiek stambiųjų VA aterosklerozės patogenezėje, tiek mikrocirkuliacijos sutrikimų sukeltos išemijos mechanizmuose. Epikardinių VA ED pasireiškia dar prieš susidarant morfologiškai nustatomoms aterosklerozinėms plokštelėms ir skatina jų progresavimą [9, 21]. Smulkiuose arteriolėse endotelio funkcijos sutrikimas gali lemti nepakankamą kraujagyslių išsiplėtimą ir sutrikusią miokardo perfuziją, net jei epikardinėse arterijose nėra reikšmingų stenozų.

VA ED paplitimą yra sudėtinga įvertinti, nes ši būklė dažnai persidengia su kitais vainikinės kraujotakos funkciniais sutrikimais – vainikinės mikrocirkuliacijos ar vazospazminiais sutrikimais bei ankstyvosiomis neobstrukcinės aterosklerozės formomis. Vis dėlto stebimieji tyrimai rodo, kad 65–90 proc. pacientų, besiskundžiančių krūtinės skausmu ir neturinčių reikšmingų VA stenozų, nustatomi mikrocirkuliacijos sutrikimai, o 50–70 proc. jų nustatoma nuo endotelio priklausoma kraujagyslių disfunkcija [6, 7].

Nors aterosklerozė yra pagrindinė IŠL priežastis, miokardo išemiją taip pat gali lemti uždegiminiai procesai kraujagyslėse, kraujagyslių vazospazmas ar kraujo krešėjimo sistemos sutrikimai [22]. ED vystymasis, aterosklerozės

progresavimas ir vėlesni IŠL etapai glaudžiai susiję su lėtiniu uždegiminiu atsaku kraujagyslių sienoje. Šį procesą reguliuoja tarpusavyje sąveikaujantys signaliniai keliai, apimantys renino-angiotenzino sistemą (RAS), eikozanoidų ir oksilipinų metabolinius kelius, redokso homeostazės disbalansą ir imuninio atsako mechanizmus [23]. Todėl endotelis yra vienas pagrindinių taikinių, siejančių kraujagyslių funkcijos reguliaciją, uždegimą, trombozės procesus bei gydymo atsaką. Jo molekulinį ir funkcinį pokyčių analizė yra aktuali siekiant geriau suprasti IŠL patogenezę.

1.1.1. Endotelio funkcijos ir disfunkcijos ypatumai širdies ir kraujagyslių sistemoje

Endotelis sudarytas iš vientiso endotelio ląstelių sluoksnio, dengiančio kraujagyslių vidų. Jis yra esminis veiksnys palaikant širdies ir kraujagyslių homeostazę, taip pat ir vystantis jų patologijai. Pirmiausia tai yra apsauginis barjeras, atskiriantis cirkuliuojantį kraują ir kitas kraujagyslės sienos dalis: jungiamąjį audinį, fibroblastus, lygiųjų raumenų ląsteles [24]. Endotelis dalyvauja reguliuojant ne tik kraujagyslių tonuso ir hemodinamikos pusiausvyrą, tarpląstelinis signalus, bet ir palaiko antitrombozinę bei priešuždegiminę mikroaplinką [21, 25]. Dėl sandarių ląstelių jungčių endotelis selektyviai kontroliuoja makromolekulių judėjimą [26]. Sveikas endotelis autokrininiu, parakrininiu ir endokrininiu būdu geba išskirti daugybę biologiškai aktyvių molekulių. Joms priskiriami įvairūs citokinai, chemokinai, augimo veiksniai [27]. Šios išskiriamos medžiagos veikia kraujagyslių tonusą, lygiųjų raumenų ląstelių proliferaciją ir migraciją, ląstelių adheziją, uždegiminius procesus ir kt. [28, 29]. Išskirdamas vazoaktyvias medžiagas, sveikas endotelis palaiko žemą oksidacinio streso lygį ir atpalaiduoja kraujagyslių tonusą. Vazoaktyvios medžiagos, reguliuodamos kraujagyslių spindį ir tonusą, tiesiogiai palaiko audinių aprūpinimo deguonimi ir medžiagų apykaitos pusiausvyrą [29].

Pagrindiniai kraujagysles plečiantys junginiai, kuriuos išskiria endotelio ląstelės, yra azoto monoksidas (NO), prostaciklinas (prostaglandinas I_2 , PGI_2), bradikininas, histaminas bei endotelio kilmės hiperpolarizuojantis veiksnys (EDHF) [30–32]. Priešingu poveikiu pasižymi endotelio išskiriamos kraujagysles sutraukiančios medžiagos: endotelinas-1 (ET-1), angiotenzinas II (Ang II), tromboksanas A_2 (TXA_2), prostaglandinas H_2 (PGH_2), arachidono rūgštis (ARA) bei ADJ [33–36]. Šių vazoaktyvių medžiagų išskyrimas vyksta kaip atsakas į kraujagysles veikiančius fizinius ar cheminius veiksnius, tokius kaip endotelio pažaida ar oksidacinis stresas [37]. Kai endotelis tinkamai nereaguoja į fiziologinius ar patologinius dirgiklius, aktyvuojami neįprasti kompensaciniai mechanizmai, lemiantys endotelio fenotipo pokyčius. Pakitus kraujagysles plečiančių ir sutraukiančių bei prokoagu-

liacinių ir antikoaguliacinių veiksmų pusiausvyrai sutrinka kraujagyslių autoreguliacija. Tai pažeidžia struktūrinę bei funkcinę endotelio vientisumą ir stebima patofiziologinė pasekmė – vystosi ED [29, 38].

Fiziologinėmis sąlygomis endotelio homeostazę palaiko laminarinė kraujo tėkmė, subalansuota endotelio vazoaktyvių mediatorių sintezė bei cirkuliuojantys kraujagyslių apsauginiu poveikiu pasižymintys veiksniai, tokie kaip didelio tankio lipoproteinai (DTL) [39]. Ramybės būsenoje esančių endotelio ląstelių fenotipą gali sutrikdyti įvairūs veiksniai, kurie palaipsniui sukelia ED. ED taip pat apima specifinę būklę – endotelio aktyvaciją. Jai būdinga uždegimą skatinanti, proliferacinė ir prokoaguliacinė būseną, lemianti aterogenezės pradžią [26]. Uždegiminių reakcijų molekuliniai mechanizmai yra esminiai veiksniai, indukuojantys endotelio ląstelių aktyvaciją ar disfunkciją ir IŠL vystymąsi [40]. Oksidacinis stresas, oksiduoti MTL, trombozė, taip pat virusinės ir bakterinės infekcijos prisideda prie uždegimo ląstelių infiltratų formavimosi, kurie bendrai sustiprina vietinį kraujagyslių uždegimą [41, 42]. ED sukelia ir kiti veiksniai: metaboliniai sutrikimai (dislipidemija, nutukimas, II tipo cukrinis diabetas), arterinė hipertenzija (AH), rūkymas, pakitusios hemodinaminės sąlygos ir kt. [21, 36]. ED yra ne tik IŠL inicijavimo, bet ir jos progresavimo veiksnys. Todėl nustatant kraujagyslių ligas labai svarbu suprasti molekulinį veiksmų, lemiančių endotelio funkciją ir disfunkciją, mechanizmus.

Išskiriami penki pagrindiniai mechanizmai, apibūdinantys endotelio ląstelių funkcijos sutrikimus: sumažėjusi NO sintezė ir biologinis prieinamumas, padidėjusi kraujagysles sutraukiančių mediatorių sintezė, padidėjęs oksidacinis stresas ir ADJ kaupimasis, uždegiminio ir imuninės sistemos atsako aktyvacija bei prokoaguliacinės būsenos vystymasis [43, 44].

Pirmasis mechanizmas – sumažėjusi NO sintezė ir biologinis prieinamumas – lemia sutrikusį kraujagyslių atsipalaidavimą ir didesnę trombozės riziką bei aterosklerozės progresavimą [44, 45]. Antrasis mechanizmas apima padidėjusią kraujagysles sutraukiančių mediatorių, ET-1, Ang II, TXA₂, PGH₂, sintezę, kuri skatina kraujagyslių spazmus bei struktūrinius sienos pokyčius [46–48]. Trečiasis mechanizmas – oksidacinis stresas ir perteklinis ADJ kaupimasis – dar labiau mažina NO biologinį prieinamumą, pažeidžia ląstelių metabolinę būklę ir aktyvuoja uždegimą skatinančius signalinius kelius, įskaitant NF- κ B signalinę grandinę [49, 50]. Ketvirtasis mechanizmas yra susijęs su uždegiminių reakcijų aktyvacija, kuri didina adhezijos molekulių (kraujagyslių ląstelių adhezijos molekulės 1 (VCAM-1), tarpląstelinės adhezijos molekulės 1 (ICAM-1), E-selektino) raišką ir citokinų (interleukino-6 (IL-6), naviko nekrozės veiksnio- α (TNF- α)) sintezę. Šie pokyčiai inicijuoja monocitų adheziją ir migraciją į intimą bei palaiko lėtinį uždegimą, būdingą aterosklerozei [51, 52]. Penktasis mechanizmas apima prokoagulia-

cinės būsenos vystymąsi, kai endotelis įgyja trombogeniškų savybių – didėja audinių veiksnio, *von Willebrand* veiksnio (vWF) ir plazminogeno aktyvatoriaus inhibitoriaus-1 (PAI-1) raiška, skatinanti trombo formavimąsi ir aterotrombozinių įvykių riziką [53, 54]. Šių mechanizmų tarpusavio sąveika lemia aterosklerozės progresavimą ir IŠL vystymąsi.

1.1.2. Kraujagyslių funkcijos palaikymas veikiant azoto oksidui

NO yra pagrindinis ir vienas svarbiausių endotelio išskiriamų signalinių mediatorių, reguliuojančių kraujagyslių homeostazę. Endotelis sintetina NO iš L-arginino azoto atomo ir O₂, o sintezės reakcijas katalizuoja endotelio azoto oksido sintazė (eNOS) [55, 56]. Endotelio ląstelės pasižymi pastovia eNOS raiška, tačiau yra nemažai humoralinių ir mechaninių veiksnių, galinčių reguliuoti eNOS aktyvumą. Veiksniai, darantys įtaką NO sintezei, yra plazmos sudedamosios dalys (trombinas, sfingozino-1-fosfatas), trombocitų išskiriamos medžiagos (adenozino difosfatas, serotoninas), biologiniai mediatoriai (bradikininas, histaminas, prostaglandinai), neurohumoraliniai mediatoriai (acetilcholinai, norepinefrinas) bei įvairūs cirkuliuojantys hormonai (catecholaminai, vazopresinas, aldosteronas) [45, 57, 58]. Be šių veiksnių, reikšmingą poveikį eNOS raiškai daro ir mechaniniai stimulai – hemodinaminės jėgos, tokios kaip laminarinė kraujo tėkmė ar šlyties įtempis (angl. *shear stress*). Esant laminarinei kraujo tėkmei, vyksta efektyvesnė NO sintezė [59].

Nors NO pirmiausiai apibrėžiama kaip kraujagysles atpalaiduojanti ir tonusą reguliuojanti medžiaga, jis pasižymi daug platesniu biologiniu poveikiu. NO yra vienas svarbiausių ateroprotekcinės veiksnio: slopina oksidacinį stresą, mažina trombocitų aktyvaciją ir jų agregaciją, moduliuoja uždegimo procesus, slopina leukocitų adheziją prie endotelio bei kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelių proliferaciją [60, 61]. Išskyrus NO, vyksta jo difuzija į kraujagyslių lygiųjų raumenų ląsteles, kuriose jis aktyvuoja guanilato ciklazės sistemą. Ši sistema didina ciklinio guanozino monofosfato (cGMP) sintezę. Padidėjęs cGMP kiekis inicijuoja baltymų kinazės aktyvaciją, kuri skatina lygiųjų raumenų ląstelių atsipalaidavimą ir kraujagyslių išsiplėtimą [36, 62]. Be klasikinių poveikių, NO dalyvauja ir potransliacinėse baltymų modifikacijose, ypač S-nitrozilinime. Tai grįžtamasis procesas, kurio metu NO grupė prijungiama prie baltymų cisteino sulfhidrilo grupės, sudarant S-nitrozilintus baltymus. Ši modifikacija yra itin svarbi reguliuojant daugybę ląstelių procesų, svarbių širdies ir kraujagyslių sistemoje, įskaitant jonų kanalų aktyvumą, ląstelių proliferaciją, apoptozę, mitochondrijų kvėpavimą ir bendrą redokso homeostazę [36, 63].

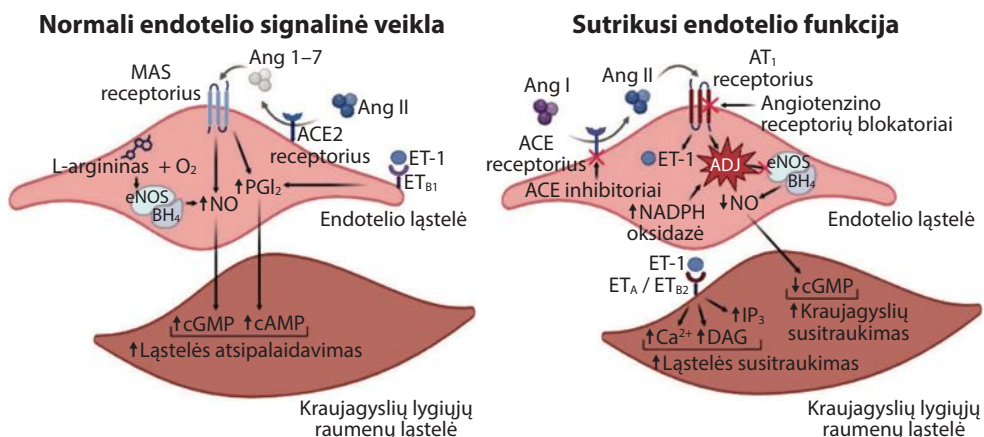
Vis dėlto NO biologinį prieinamumą ir jo ateroprotekcinį poveikį gali mažinti įvairūs širdies ir kraujagyslių sistemos rizikos veiksniai. Patologinėmis sąlygomis gali trūkti svarbių eNOS kofaktorių, tokių kaip tetrahidrobiopterinas (BH₄). eNOS dimerai tampa monomerais, kurie gali prisidėti prie ADJ sintezės [29]. BH₄ trūkumas dažnai būna susijęs su kraujagyslių oksidaciniu stresu, kuris yra būdingas didžiajai daliai klinikinių aterosklerozės rizikos veiksnių: AH, cukriniam diabetui, hipercholesterolemijai, rūkymui ir kt. RAS aktyvacija, ypač Ang II poveikis per Ang II 1 tipo (AT₁) receptorių, yra vienas svarbiausių mechanizmų, lemiančių NO sintezės slopinimą bei jo biologinio prieinamumo mažėjimą. Ang II stimuliuoja NADPH oksidazių (NOX) aktyvumą ir didina ADJ sintezę. Tai tiesiogiai inaktyvuoja NO bei skatina eNOS funkcinį atsiejimą [64]. NO, reaguodamas su superoksido anijonu (O₂⁻) sudaro stiprų oksidatorių – peroksinitritą (ONOO⁻). ONOO⁻ oksiduoja BH₄ į dihidrobiopteriną (BH₂). Tai mažina eNOS gebėjimą sintetinti NO ir skatina O₂⁻ susidarymą, sukuriant uždarą oksidacinį ciklą [65, 66]. Be to, Ang II slopina eNOS geno raišką ir fermento aktyvumą per kelių signalinių kaskadų aktyvaciją [67]. Per AT₁ receptorių stimuliuojamas NF-κB kelias, kuris skatina uždegimą skatinančių citokinų (TNF-α, IL-6) transkripciją ir mažina eNOS promotoriaus aktyvumą, taip slopindamas NO sintezę. Kita svarbi signalinė kaskada – MAPK šeimos kinazių (ERK1/2, JNK, p38 MAPK) aktyvinimas, sukeliantis eNOS fosforilinimą neaktyviose vietose ir mažinantis fermento katalizinį aktyvumą. Ši aktyvacija lemia sumažėjusį NO biologinį prieinamumą. Taigi, NO sintezės ir biologinio prieinamumo pokyčiai tiesiogiai atspindi endotelio funkcinę būklę ir yra vertinami kaip svarbūs funkciniai rodikliai, leidžiantys įvertinti ED ir jos sąsajas su IŠL patogenezė.

1.2. Renino-angiotenzino sistema

Renino-angiotenzino sistema (RAS) ir ypač jos pagrindinis efektorius polipeptidas Ang II yra vieni svarbiausių kraujospūdžio ir kraujagyslių homeostazės reguliacinių veiksnių. Jų disbalansas yra glaudžiai susijęs su AH bei ED vystymusi. Svarbus vaidmuo tenka angiotenziną konvertuojantiems fermentams (AKF) [68]. Kraujagyslių endotelis yra viena pagrindinių ACE (angl. *angiotensin-converting enzyme*) raiškos vietų. ACE katalizuoja angiotenzino I (Ang I) virsmą į Ang II, todėl yra svarbus AH vystymosi procesui. Ang II jungiasi prie AT₁ receptorių ir aktyvuoja MAPK, PI3K/Akt, JAK/STAT bei NADPH oksidazės viduląstelines signalinius kelius. Šie signaliniai keliai gali lemti didesnę ADJ susidarymą, augimo veiksnių, ET-1, uždegiminių citokinų bei adhezijos molekulių raišką. Stimuliuodamas AT₁

receptorių, Ang II taip pat skatina aldosterono sintezę, kuri aktyvina mineral-kortikoidų receptorius ir didina uždegimą, fibrozę bei endotelio pažeidimus [69]. Be to, Ang II skatina kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelių hiperplaziją ir hipertrofiją. Šis poveikis susijęs su mitogenų – transformuojančio augimo veiksnio (TGF- β), trombocitų kilmės augimo veiksnio (PDGF), epidermio augimo veiksnio (EGF), insulino augimo veiksnio (IGF-1) – endogeninės sintezės didėjimu [70]. Kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelių hiperplaziją ir hipertrofiją Ang II indukuoja ir per O_2^- sintezę. Šis poveikis vyksta aktyvinant baltymų kinazę C (PKC), fosfolipazę A2 (PLA2) bei fosfolipazę D (PLD) [71]. Ang II taip pat pasižymi protrombozinėmis savybėmis. Šis peptidas indukuoja PAI-1 sintezę, slopina fibrinolizę, didina audinių veiksnio raišką bei trombocitų aktyvumą. Veikiant Ang II susiformuoja oksidacinė ir uždegiminė aplinka. Ji skatina endotelio pažeidimą, kraujagyslių susitraukimą bei struktūrinius sienos pokyčius. Dėl šių pokyčių vystosi ED, kuri sudaro prielaidas aterosklerozės progresavimui bei AH vystymuisi [68, 72].

Priešingai, Ang II veikimas per 2 tipo (AT_2) receptorių pasižymi palankesniais kraujagyslių funkcijos pokyčiais. Jis skatina kraujagyslių išsiplėtimą, sukelia antioksidacinį ir priešuždegiminį poveikį, palaiko kraujagyslių homeostazę. Tačiau Ang II giminingumas AT_2 receptoriams yra mažesnis nei AT_1 receptoriams, todėl vyrauja jungimasis prie AT_1 ir būtent tai lemia Ang II svarbą reguliuojant kraujospūdį [73]. Ang II koncentracija kraujotakoje mažėja ACE2 (angl. *angiotensin-converting enzyme 2*) fermentui katalizuojant jo hidrolizę. Pastaraisiais metais ACE2 sulaukė ypatingo dėmesio, nes veikia kaip receptorius sunkaus ūminio respiracinio sindromo koronaviruso 2 (SARS-CoV-2) spyglio baltymams [74, 75]. ACE2 yra cinką turintis karboksipeptidazės šeimos fermentas. Jis katalizuoja Ang II hidrolizę – pašalina jo C-galo aminorūgštį, taip susidarant heptapeptidui angiotenzinui 1–7 (Ang 1–7). Šis peptidas veikia per Mas receptorių, kuris yra su G baltymu susijęs receptorių. Šio receptoriaus raiška pasižymi endotelio, lygiųjų raumenų, makrofagų bei miokardo ląstelės [76, 77]. Jungdamasis prie Mas receptoriaus, Ang 1–7 didina NO sintezę ir biologinį prieinumą, mažina ADJ kiekį bei slopina kraujagyslių uždegimą. Taip ACE2/Ang 1–7/Mas ašis veikia kaip priešprieša klasikinei RAS ašiai. Klasikinės ACE/Ang II/ AT_1 ir alternatyvios ACE2/Ang 1–7/Mas ašių sąveika endotelio lygmeniu pavaizduota 1.2.1 pav. Pastaroji ašis yra svarbus ED ir AH terapinis taikinis, nes atkuria kraujagyslių tonuso pusiausvyrą, gerina kraujagyslių elastingumą ir mažina aterosklerozės progresavimą.



1.2.1 pav. Klasikinės ir alternatyviosios RAS ašių sąveika kraujagyslių endotelio ir lygiųjų raumenų ląstelėse

Adaptuota pagal Ambrosino ir bendr. [68]. ADJ – aktyvūs deguonies junginiai; cAMP – ciklinis adenosino monofosfatas; cGMP – ciklinis guanozino monofosfatas; DAG – diacilglicerolis; ET_A – A endotelino receptoriai; ET_{B1} – B1 endotelino receptoriai; ET_{B2} – B2 endotelino receptoriai; IP₃ – inozitolio trifosfatas.

1.2.1. Renino-angiotenzino sistemos vaidmuo aterosklerozės vystymuisi

Be savo tradicinio vaidmens kraujospūdžio reguliavime, RAS turi tiesioginį poveikį aterogenezei. Aterosklerozė laikytina pagrindine IŠL išsivystymo priežastimi [23]. Šis procesas apibūdinamas kaip lėtinis VA sienos uždegiminis atsakas į endotelio pažeidimus, kurio metu aktyvuojami įvairūs ląsteliniai ir molekuliniai mechanizmai. Pradinėje stadijoje dėl ED sutrinka NO gamyba ir kraujagyslių tonuso reguliacija, didėja pralaidumas MTL, kurie kaupiasi poendoteliniame sluoksnyje (intimoje). Tai stimuliuoja adhezijos molekulių (VCAM-1, ICAM-1, E- ir P-selektinų) raišką bei leukocitų (daugiausia monocitų, T limfocitų ir neutrofilų) adheziją prie endotelio paviršiaus [78]. Veikiant chemoatraktantams šios imuninės ląstelės migruoja į kraujagyslės intimą, o monocitai diferencijuojasi į makrofagus. Makrofagai fagocituoja oksiduotus MTL ir formuoja „putotąsias“ ląsteles. Jų atsiradimas kraujagyslių sienoje yra ankstyvojo aterosklerozinio pažeidimo požymis [79]. „Putotosios“ ląstelės ir migravę T limfocitai išskiria citokinus, skatinančius uždegimą ir ADJ susidarymą. Uždegiminių ląstelių išskirti augimo veiksniai ir ADJ stimuliuoja lygiųjų raumenų ląstelių proliferaciją ir elastinių skaidulų, proteoglikanų, kolageno sintezę. Aplink lipidinį branduolį formuojasi jungiamojo audinio stogelis – susidaro aterosklerozinė plokštelė, siaurinti kraujagyslės spindį [80, 81].

Aktyvi Ang II/ACE/AT₁ RAS ašis skatina uždegimą, kuris yra pagrindinė grandis, prisidedanti prie aterosklerozės vystymosi. Ne tik uždegiminės ląstelės, bet ir Ang II veikia kaip oksidacinį stresą bei uždegimą skatinantis mediatorius. Ang II ir AT₁ receptorių sąveika sukelia kelių tarpusavyje susijusių pataloginių signalų kaskadą. Pirmiausia, Ang II aktyvina NADPH oksidazės (NOX) kompleksą (ypač NOX1, NOX2 ir NOX5 izoformas), dėl to ypač padidėja ADJ gamyba endotelyje ir lygiųjų raumenų ląstelėse [5, 82]. ADJ, tokie kaip O₂⁻, ONOO⁻, ne tik mažina NO biologinį prieinamumą, bet ir tiesiogiai pažeidžia endotelio struktūras bei baltymus. Šis oksidacinis disbalansas lemia endotelio kraujagysles plečiančių savybių praradimą, padidėjusį kraujagyslių pralaidumą bei uždegiminių ląstelių adheziją [83].

Be tiesioginio poveikio oksidacinei pusiausvyrai, Ang II/AT₁ receptorių kelias aktyvina RhoA/ROCK signalinį kelią. Šis kelias stimuliuoja mitogenų aktyvuojamas baltymų kinazes (MAPK – p38 MAPK ir ERK1/2) ir transkripcijos veiksnį NF-κB [84]. NF-κB transkripcijos aktyvacija indukuoja daugelio su uždegimu ir aterogeneze susijusių genų raišką: uždegiminių citokinų (TNF-α, IL-6), chemokinų (MCP-1), adhezijos molekulių (VCAM-1, ICAM-1, P-selektino), fermento COX-2 bei angiotenzinogeno (AGT) [85, 86]. Šie pokyčiai skatina monocitų adheziją, jų diferenciaciją į makrofagus ir oksiduoto MTL fagocitozę, formuojant „putotąsias“ ląsteles.

Tuo pačiu metu Ang II indukuoja LOX-1 receptoriaus raišką endotelio, lygiųjų raumenų ląstelėse ir makrofaguose [87]. LOX-1 sąveika su oksiduotu MTL dar labiau stiprina oksidacinį stresą, skatina apoptozės procesus ir palaiko lėtinį kraujagyslės sienos uždegimą. Susiformuoja uždara patogenezinė grandinė: oksiduoti MTL didina ACE raišką, o susidaręs Ang II dar labiau aktyvina LOX-1 ir AT₁ receptorių [88]. Dėl šio teigiamo grįžtamojo ryšio susiformuoja savaime palaikomas uždegiminis ciklas, skatinantis aterosklerozinės plokštelės progresavimą ir destabilizaciją.

Uždegiminės reakcijos metu Ang II taip pat stimuliuoja osteopontino ir kitų profibrozinių baltymų sintezę [89, 90]. Šie baltymai prisideda prie lygiųjų raumenų ląstelių proliferacijos, migracijos į intimą ir kolageno sintezės. Dėl to vyksta plokštelės jungiamojo audinio bei jos struktūrinio stabilumo pokyčiai [91, 92]. Visa ši kompleksinė signalų visuma rodo, kad per didelę ACE/Ang II/AT₁ ašies aktyvacija yra esminis aterogeneze variklis. Ji lemia ne tik endotelio pažeidimus, bet ir plokštelės uždegiminį bei jungiamojo audinio pertvarkymą [23]. Todėl RAS disbalansas sudaro palankias sąlygas aterosklerozinių plokštelių formavimuisi bei jų nestabilumui.

Priešingai nei klasikinė proaterogeninė ACE/Ang II/AT₁ ašis, apsauginė ACE2/Ang 1–7/Mas receptoriaus RAS ašis palaiko kraujagyslių homeostazę ir išsaugo jų struktūrą bei funkciją. Mas receptoriaus aktyvinimas inicijuoja

PI3K/Akt signalinį kelią, kuris skatina eNOS fosforilinimą ir aktyvaciją. Dėl šių procesų padidėja NO sintezė. NO, veikdamas parakriniškai, sukelia kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelių atsipalaidavimą, mažina trombocitų adheziją ir leukocitų sukibimą su endotelium [45, 77].

Ang 1–7/Mas taip pat slopina NOX aktyvumą, ypač NOX2 ir NOX4 izoformas. Dėl to mažėja ADJ susidarymas ir atkurama redokso homeostazė endotelio ląstelėse [45, 93]. Šis poveikis susijęs ir su transkripcijos veiksnio NF- κ B inaktyvacija. Dėl jos slopinama uždegiminių mediatorių genų raiška – mažėja *ICAM-1*, *VCAM-1*, taip pat citokinų *TNF- α* ir *IL-6* transkripcija [86, 94]. Tuomet reikšmingai mažėja monocitų ir makrofagų adhezija bei kraujagyslės sienos uždegiminė infiltracija.

Ekspimentiniais aterosklerozės modeliais ApoE^{-/-} pelėse nustatyta, kad Ang 1–7 arba Mas receptoriaus agonistas AVE0991 mažina aterosklerozinių plokštelių dydį [95, 96]. Taip pat slopinama lygiųjų raumenų ląstelių proliferacija ir makrofagų kaupimasis intimoje, didėja kolageno sintezė ir taip gerinamas aterosklerozinių plokštelių stabilumas. Be to, Ang 1–7/Mas ašies aktyvinimas dalyvauja lipidų ir gliukozės apykaitos reguliacijoje. Ji skatina adiponektino sekreciją. Adiponektinas mažina trigliceridų, MTL koncentraciją kraujo plazmoje bei gerina jautrumą insulinui [97]. Šie sisteminiai metaboliniai poveikiai sustiprina bendrą antiaterogeninį šios ašies veikimą. Todėl RAS disbalanso korekcija, stiprinant ACE2/Ang 1–7/Mas ašies aktyvumą arba slopinant ACE/Ang II/AT₁ ašies signalinį kelią, yra perspektyvi aterosklerozės profilaktikos ir gydymo strategija [98].

1.3. Endotelio disfunkcijos biožymenys

Adhezijos molekulės VCAM-1, ICAM-1, E-selektinai bei koaguliacijoje dalyvaujančios molekulės, ypač vWF ir tirpus trombomodulinas, dažnai įvardijamos kaip klasikiniai kraujotakoje cirkuliuojantys ED biožymenys [99]. Tačiau vien šių biožymenų nustatymas kraujyje vertinant IŠL riziką yra diskutuotinas. Daugelį šių molekulių sintetina ne tik endotelis, bet ir leukocitai bei trombocitai. Todėl jos nėra specifiški endotelio pažaidos rodikliai [10, 100]. Be to, šie biožymenys tiesiogiai neatspindi ir VA endotelio funkcijos.

Vis labiau pabrėžiama, kad endotelio funkcijos vertinimas turėtų būti kompleksinis. Jis turėtų apimti ne tik cirkuliuojančių biožymenų analizę, bet ir funkcinis kraujagyslių tyrimus, tokius kaip nuo endotelio priklausomos vazodilatacijos ar vazokonstrikcijos vertinimas. Šie metodai tiksliau atspindi endotelio gebėjimą reguliuoti kraujagyslių tonusą. Neseniai pasiūlyta daugelio biožymenų nustatymo strategija, apimanti tiek naujų, tiek klasikinių bio-

žymenų derinius. Tokia strategija leidžia tiksliau vertinti IŠL riziką ir gydymo veiksmingumą, nes apima kelis endotelio funkcijos aspektus [101].

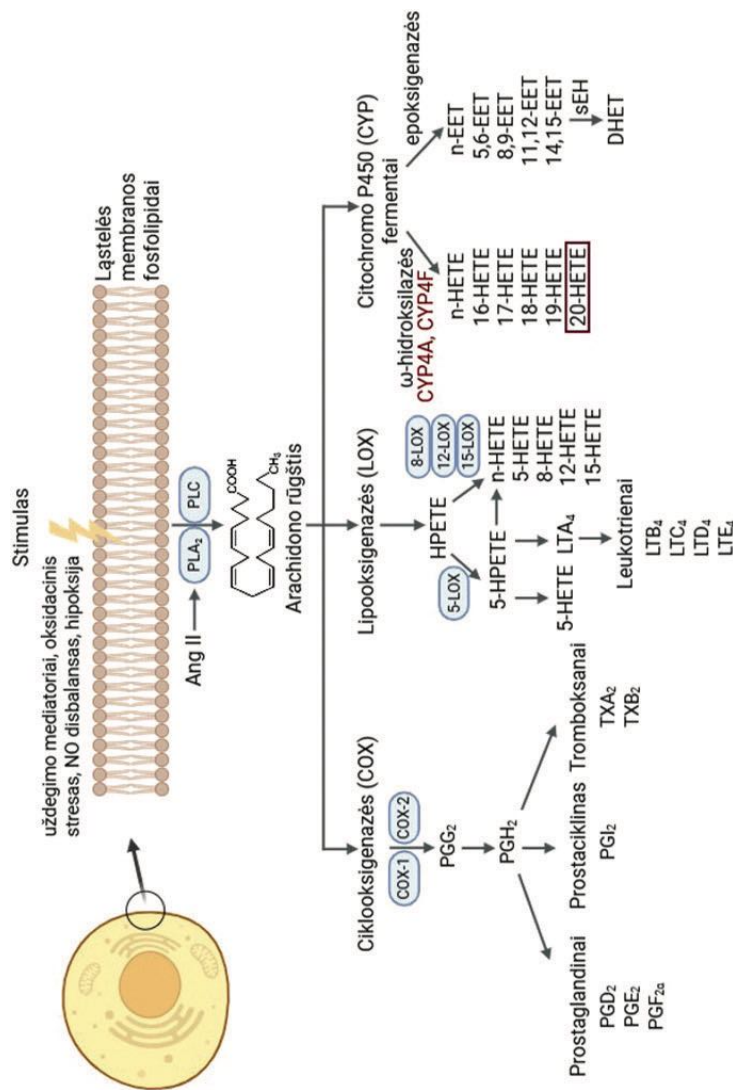
Kadangi endotelis atlieka daugybę fiziologinių funkcijų, jo disfunkcijos vertinimui tiriama visa eilė biožymenų, atspindinčių skirtingus ED aspektus. Jau kelis dešimtmečius tiriamos endotelio mikro-RNR ir mikrodalelės (užląstelinės pūslelės). Šios 0,1–1,0 μm skersmens pūslelės, atsiskiriančios nuo endotelio plazminės membranos, perneša įvairias biologiškai aktyvias molekules, įskaitant adhezijos molekules, citokinus, transkripcijos veiksnius, augimo veiksnius ir nukleorūgštis. Patekusios į kraujotaką, šios pūslelės ir jų pernešamos molekulės perduoda informaciją kitų tipų ląstelėms, reguliuoja genų raišką ir ląstelinius procesus [102, 103]. Tyrimai rodo, kad mikrodalelių koncentracija kraujyje didėja sergant AH, VAL ar cukriniu diabetu, o tai siejama su IŠL progresavimu [104, 105]. Tačiau duomenys apie jų patofiziologinį poveikį nėra vienareikšmiai. Jos gali veikti kaip nespecifiniai ląstelių aktyvacijos ar pažeidimo produktai, atspindintys bendrą sisteminį uždegimą.

Pastaraisiais metais vis daugiau dėmesio skiriama metaboliniams ir signaliniams keliams, kurie tiesiogiai reguliuoja endotelio homeostazę, reaktyvumą ir sąveiką su aplinkinėmis struktūromis. Tarp jų reikšmingą vietą užima lipidų kilmės signalinės molekulės, veikiančios kaip greiti, autokrininiai ir parakrininiai endotelio funkcijos reguliaciniai junginiai. Šių junginių pusiausvyros pokyčiai lemia kraujagyslių tonuso, oksidacinio streso, uždegimo bei trombozės procesų disbalansą, todėl jie sudaro esminę patogenezinę jungtį tarp metabolinių sutrikimų, ED ir aterogenezės [106].

Vienas svarbiausių lipidinių signalinių kelių yra arachidono rūgšties (ARA) metabolizmas. Šio proceso metu susidarantys eikozanoidai koordinuoja daugelį kraujagyslių funkcijų. Ši ω -6 polinesočioji riebalų rūgštis yra daugelio uždegiminių ir agregaciją skatinančių mediatorių, tokių kaip prostaglandinai, tromboksanai, leukotrienai ir kiti oksiduoti lipidų junginiai, metabolinis pirmtakas [107]. Todėl kiekybiniai specifinių ARA metabolitų pokyčiai gali atspindėti endotelio funkcijos sutrikimus.

1.3.1. Arachidono rūgšties metabolitai

Naujausi tyrimai rodo, kad ARA metabolizmo pokyčiai yra svarbi grandis, jungianti uždegiminius, oksidacinius ir kraujagyslių reaktyvumo sutrikimus [106, 108]. Fiziologinėmis sąlygomis ARA yra įterpta į ląstelių plazminės membranos fosfolipidų sudėtį, daugiausia fosfatidilcholino ir fosfatidiletanolamino molekulėse. Ji užima antrąją (sn-2) padėtį glicerolio pagrinde, kuriame jos polinesočioji grandinė lemia membranos lankstumą.



1.3.1.1 pav. Arachidono rūgšties metabolizmas ir biologiškai aktyvių eikozanoidų susidarymas

Adaptuota pagal Wang ir bendr. [110]. 20-HETE – 20-hidroksieikozatetraeno rūgštis; 5-, 8-, 12-, 15-LOX – 5-, 8-, 12-, 15-lipooksigenazės; Ang II – angiotenzinas II; CYP4A, CYP4F – CYP4A ir CYP4F šeiminį citochromo P450 izofermentai; COX-1 – ciklooksigenazė-1; COX-2 – ciklooksigenazė-2; DHET – dihidroksieikozatetraeno rūgštis; EET – epoksieikozatetraeno rūgštis; HPETE – epoksieikozatetraeno rūgštis; HPTETE – hidroperoksieikozatetraeno rūgštis; LTA₄ – leukotrienas A₄; LTB₄ – leukotrienas B₄; LTC₄ – leukotrienas C₄; LTD₄ – leukotrienas D₄; LTE₄ – leukotrienas E₄; PGD₂ – prostaglandinas D₂; PGE₂ – prostaglandinas E₂; PGF_{2α} – prostaglandinas F_{2α}; PGI₂ – prostaglandinas I₂; PLA₂ – fosfolipazė A₂; PLC – fosfolipazė C; sEH – tirpi epoksidhidrolazė; TXA₂ – tromboksanas A₂; TXB₂ – tromboksanas B₂.

Ląstelės aktyvacijos metu fosfolipazė A₂ (PLA₂) hidrolizuoja esterinius ryšius ir atpalaiduoja laisvą ARA į citoplazmą. Išlaisvinta ARA tampa uždegimo mediatorių (eikozanoidų) sintezės substratu ir metabolizuojama trimis pagrindiniais būdais: veikiant ciklooksigenazėms (COX), lipoksigenazėms (LOX) ir citochromo P450 (CYP) fermentams [107, 109]. Šių fermentinių kelių ARA galutiniai produktai – prostanooidai (tromboksanai, prostaglandinai, prostaciklinai), leukotrienai, epoksieikozatrienoinės (EET) ir hidroksieikozatetraeno rūgštys (HETE) – pasižymi plačiu biologiniu aktyvumu. Jie dalyvauja uždegimo, oksidacinio streso bei endotelio pralaidumo reguliacijoje [106, 110, 111] (1.3.1.1 pav.).

Veikiant COX fermentams, polinesočiųjų riebalų rūgščių substratai (daugiausia ARA) pirmiausia konvertuojami į tarpinį produktą prostaglandiną H₂ (PGH₂). Šis junginys, priklausomai nuo specifinių signalų, veikiant prostaglandinų, prostaciklinų ir tromboksano sintazėms, metabolizuojamas į prostanoidus: prostaglandinus (PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}), prostacikliną (PGI₂) bei TXA₂ [110, 112]. Prostanoidų biosintezę katalizuoja dvi skirtingos COX izoformos: COX-1 ir COX-2. COX-1 apibūdinama kaip konstitutyvi izoforma, pasižyminti stabilia raiška daugelyje audinių bei ląstelių. Ši izoforma palaiko fiziologines reakcijas, tokias kaip trombocitų agregacija, gleivinės apsauga ir inkstų perfuzijos reguliacija [113]. Kita vertus, COX-2 yra indukuojama tam tikrų signalų – uždegimo, augimo veiksnių, hormonų. Dėl šios priežasties COX-2 yra pagrindinis uždegimo metu susidarančių prostanoidų šaltinis, reikšmingai prisidedantis prie uždegiminių, aterosklerozinių ir neoplazinių procesų vystymosi [110, 114–116].

Antrasis ARA metabolizmo ir eikozanoidų susidarymo būdas – veikiant LOX fermentams. Šioje metabolinėje grandinėje skirtingos LOX izoformos – 5-LOX, 8-LOX, 12-LOX, 15-LOX – katalizuoja ARA oksigenaciją, įterpdamos molekulinį deguonį į tam tikras anglies pozicijas, todėl atitinkamai susidaro 5-, 8-, 12-, 15-hidroperoksieikozatetraeno rūgštys (HPETE). Šie hidroperoksidai redukuojami peroksidazių į atitinkamas HETE arba toliau metabolizuojami į leukotrienus ir lipoksinus, dalyvaujančius uždegimo ir jo rezoliucijos procesuose [110, 117]. Tarp LOX šeimos fermentų, 5-LOX yra patofiziologiškai svarbiausia izoforma, nes būtent ji inicijuoja leukotrienų sintezę [118]. 5-LOX suformuoja tarpinį produktą 5-HPETE, kuris verčiamas leukotrienu A₄ (LTA₄), o šis – į uždegiminį mediatorių leukotrieną B₄ (LTB₄) [119]. LTB₄ yra stiprus neutrofilų chemotaksinis veiksnys, skatinantis jų adheziją, aktyvaciją ir degranuliaciją. Jis taip pat indukuoja ADJ bei lizosominių fermentų išsiskyrimą [120]. Tokiu būdu LTB₄ prisideda prie audinių pažeidimo, leukocitų infiltracijos ir uždegiminio atsako palaikymo. Todėl aktyvus 5-LOX kelias siejamas su aterogeneze, metaboliniu sindromu, uždegiminėmis ir onkologinėmis ligomis [121, 122].

Trečiasis ARA metabolizmo būdas apima CYP fermentus, kurie pasižymi ω -hidroksilazės ir epoksigenazės aktyvumu [110]. Nors CYP fermentų šeimą sudaro daugybė izoformų, ARA metabolizmui reikšmingiausi yra CYP4A ir CYP4F pošeimių fermentai [123]. Šių fermentų katalizuojamos reakcijos lemia HETE susidarymą, tarp kurių vienas svarbiausių metabolitų – 20-HETE. Ji ne tik prisideda prie kraujagyslių funkcijos reguliavimo, bet ir turi įtakos daugeliui patofiziologinių procesų. Žmogaus organizme 20-HETE sintezę atlieka CYP4A11, CYP4F2 ir CYP4F3 izoformos [124]. ARA metabolizmas, vykdomas CYP4A ir CYP4F fermentų, organizme nustatomas įvairiuose organuose, įskaitant inkstus, kepenis, širdį, plaučius, smegenis ir kraujagysles [125]. Kraujagyslėse pagrindinė 20-HETE biosintezės vieta yra lygiųjų raumenų ląstelės. Tačiau reikšminga CYP4A/F raiška aptinkama ir endotelio ląstelėse, ypač išeminės ar hipoksinės būklės metu [126]. Tai rodo, kad endotelis taip pat gali veikti kaip papildomas 20-HETE sintezės šaltinis.

1.3.2. 20-hidroksieikozatetraeno rūgštis

20-HETE pasižymi audiniams specifiniu ir daugialypiu biologiniu poveikiu. Kepenyse 20-HETE dalyvauja gliukozės išskyrimo, kasoje – insulino sekrecijoje, o širdies ir kraujagyslių sistemoje ji veikia kaip stipri kraujagysles sutraukianti medžiaga [127]. 20-HETE sukelia rezistencinių kraujagyslių ir inkstų aferentinių arteriolių susitraukimą, didina kraujagyslių pasipriešinimą ir prisideda prie arterinio kraujospūdžio padidėjimo [15, 128]. Be to, 20-HETE veikia ir kitus kraujagyslių funkcijos aspektus: skatina kraujagyslių sienos remodeliavimąsi, lygiųjų raumenų ląstelių proliferaciją ir migraciją, angiogenezę, didina kraujagysles sutraukiančių medžiagų išsiskyrimą [129].

Šis ARA metabolitas taip pat sukelia endotelio aktyvaciją, kuri yra vienas iš ankstyviausių aterosklerozės etapų. Endotelio aktyvacija vyksta per uždegiminio transkripcijos aktyvatoriaus NF- κ B signalinę grandinę, indukuojančią uždegiminių mediatorių – citokinų (TNF- α , IL-1 β) ir adhezijos molekulių (ICAM-1, VCAM-1) – raišką [129–131]. Reikšminga 20-HETE sukeliama endotelio pažeidimo dalis siejama su pertekliniu ADJ susidarymu. 20-HETE stimuliuoja oksidacinį stresą, kuris dar labiau aktyvina uždegimo signalines kaskadas, mažina NO biologinį prieinamumą ir prisideda prie ED. 20-HETE aktyvina NADPH oksidazę ir skatina BH₄ oksidaciją, dėl kurios funkciškai atsieta eNOS vietoje NO pradeda sintetinti O₂⁻, o pastarasis, reaguodamas su NO, sudaro ONOO⁻ [132–134]. eNOS aktyvumą 20-HETE taip pat slopina mažindama Akt-priklausomą fosforilinimą ir didindama arginazės aktyvumą. Dėl to sumažėja L-arginino prieinamumas NO sintezei [135].

Svarbus 20-HETE bruožas yra tiesioginis grįžtamasis ryšys su RAS. RAS aktyvacija skatina 20-HETE sintezę, o 20-HETE, savo ruožtu, didina

ACE aktyvumą ir stiprina Ang II sukeltą kraujagyslių reakciją [128, 136, 137]. Dėl šio ryšio 20-HETE yra svarbi grandis, jungianti angliavandenių ir lipidų metabolizmą, oksidacinį stresą, uždegimą, aterosklerozę ir AH. Dėl savo biologinių savybių 20-HETE dalyvauja įvairių ligų patogenezėje. Be aterosklerozės ir AH, padidėjusi 20-HETE sintezė siejama su inkstų funkcijos sutrikimu, metaboliniu sindromu, IŠL, smegenų kraujotakos sutrikimais, taip pat tam tikrais onkologiniais procesais, kuriuose 20-HETE gali skatinti angiogenezę ir navikinių ląstelių proliferaciją [128, 138, 139]. Atsižvelgiant į šį kompleksinį ir daugialypį poveikį, 20-HETE laikytina reikšminga RAS, kraujagyslių funkcijos ir uždegimo sąveikos mediatore.

20-HETE kaip galimo endotelio funkcijos biožymens reikšmė buvo iškelta Schuck ir bendraautorų tyrime [140]. Jame analizuotas CYP metabolizuojamų eikozanoidų ryšys su kraujagyslių funkcija pacientams, sergantiems angiografiškai patvirtinta stabilia VAL. Autoriai nustatė, kad pacientai, kurių plazmos 20-HETE koncentracijos buvo didesnės, turėjo ryškesnę ED. Ši sąsaja išliko nepaisant standartinės farmakoterapijos, įskaitant angiotenziną konvertuojančio fermento inhibitorių (AKFi) vartojimą. Kita klinikinė studija taip pat nustatė teigiamą koreliaciją tarp padidėjusio 20-HETE kiekio šlapime ar plazmoje ir ED žymenų bei oksidacinio streso rodiklių [129]. Šie rezultatai leidžia manyti, kad padidėjusi 20-HETE sintezė arba sutrikusi jos biotransformacija gali būti nepriklausomas endotelio pažaidos veiksnys ir potencialus terapinis taikynys. 20-HETE koncentracijos pokyčiai gali padėti atrinkti pacientus, kuriems būtų tikslingos intervencijos, koreguojančios 20-HETE sintezę ar blokuojančios jos signalinį poveikį.

1.3.3. CYP4F2–20-HETE ašis: sąsajos su uždegimu ir kraujo krešėjimo sistema, genetinių veiksnių įtaka 20-HETE koncentracijai

CYP4F2–20-HETE ašis gali būti vertinama kaip molekulinė grandis, siejanti RAS aktyvumą, eikozanoidų metabolizmą, ED ir kraujo krešėjimo aktyvumo pokyčius. CYP4F2 yra ne tik viena reikšmingiausių ω -hidroksilazių, dalyvaujanti 20-HETE biosintezėje, bet ir yra aktyvinama uždegimo ir trombozės procesuose [141]. CYP4F2 prisideda prie uždegimo rezoliucijos mažindama leukotrieno B₄ koncentraciją [142]. Šios ašies aktyvumo skirtumai gali turėti klinikinę reikšmę, ypač vertinant pacientų atsaką į IŠL gydymą.

Klinikinėje praktikoje pastebima, kad taikant standartizuotas gydymo strategijas pacientų atsakas į farmakoterapiją išlieka nevienodas: tas pats vaistas skirtingiems asmenims gali būti veiksmingas, neveiksmingas ar sukelti nepageidaujamą poveikį. Šį individualaus gydymo atsako kintamumą

lemia paciento demografinės charakteristikos, klinikinės būklės [143]. Reikšmingiausią šio kintamumo dalį nulemia genetiniai skirtumai, kurie gali keisti su vaistu susijusių baltymų funkciją ir jų aktyvumą. CYP fermentų funkcija reikšmingai priklauso nuo genetinių variacijų, transkripcinės reguliacijos, uždegimo bei kitų biologinių veiksnių [144, 145]. Uždegimo metu IL-6 ir IL-1 β slopina CYP fermentų genų transkripciją [146]. Uždegimą skatinantys citokinai gali sukelti reiškinį, vadinamą laikina fenokonversija (angl. *pheno-conversion*), kai sumažėja vaistų metabolizmo aktyvumas dėl vaistus metabolizuojančių fermentų raiškos slopinimo. Uždegimo metu asmenys, kurie genetiškai priskiriami intensyvaus metabolizmo fenotipui (angl. *extensive metabolizers*), fenotipiškai gali tapti silpno metabolizmo fenotipo asmenimis (angl. *poor metabolizers*) [147]. Be endogeninių veiksnių, CYP fermentų aktyvumo pokyčius gali lemti išoriniai veiksniai, tokie kaip vartojami vaistai ar maistas [148].

Anksčiau publikuoti tyrimai parodė, kad CYP4F2 turi įtakos antikoagulianto varfarino dozavimui – CYP4F2*3 (rs2108622) polimorfizmas didina varfarino palaikomosios dozės poreikį ir yra įtrauktas į farmakogenetinius vaisto skyrimo algoritmus [149]. Šis variantas (V433M) yra funkciškai reikšmingas, nes yra siejamas su sumažėjusiu fermento aktyvumu ir 20-HETE biosinteze [150]. Ši genetinė variacija gali lemti tarpasmeninius 20-HETE koncentracijos skirtumus ir keisti su tromboze bei kraujagyslių funkcija susijusius procesus. Klinikinę reikšmę gali turėti ir kiti CYP4F2 geno variantai (rs1558139, rs2074902), kurie siejami su fermento aktyvumo kintamumu, nors jų funkcinė įtaka 20-HETE biosintezai išlieka nepakankamai tirta. Kai kuriuose tyrimuose nurodoma, kad CYP4F2 rs1558139 AG genotipas gali būti susijęs su mažesne AH rizika [151].

CYP4F2 geno variantai gali turėti įtakos antiagregacinio gydymo efektyvumui. Nie ir bendraautorai nustatė, jog CYP4F2 polimorfizmai turi įtakos tikagreloro ir jo aktyvaus metabolito farmakokinetinėms savybėms [152]. Klinikiniuose tyrimuose šie genetiniai skirtumai buvo siejami su trombocitų funkcijos rodikliais. Asmenims, turintiems rs3093135 TT genotipą, gydymo tikagreloru metu nustatytas didesnis trombocitų reaktyvumas, lyginant su pacientais, turinčiais bent vieną A alelį [153]. Be to, nustatyta, jog CYP4F2 daro įtaką antiagregaciniam poveikiui pacientams, sergantiems stabilia ir nestabilia VAL bei cukriniu diabetu, kurie buvo gydyti antiagregantais tikagreloru ir klopidogreliu [16, 154]. Pastarajame tyrime tirti ŪKS pacientai, kuriems po stentavimo taikyta dviguba antiagregacinė terapija (DAPT) aspirinu su tikagreloru arba klopidogreliu, nustatyta didesnė CYP4F2 bei 20-HETE koncentracija pacientams, sergantiems cukriniu diabetu, ir pacientams, vartojusiems tikagrelorą. Didesnės jų koncentracijos cukriniu diabetu sergantiems gali lemti intensyvesni sisteminio uždegimo procesai, lyginant

su nesergančiais cukriniu diabetu. Be to, pacientams, kuriems nustatytas didelis gydymo metu išliekantis trombocitų reaktyvumas, nustatytos mažesnės CYP4F2 ir didesnės 20-HETE koncentracijos, palyginus su gerai į gydymą reaguojančiais asmenimis. Taigi, 20-HETE gali būti susijusi su padidėjusiu trombocitų reaktyvumu ir didesne trombozės rizika. Vis dėlto šie duomenys gauti ŪKS pacientų grupėje, todėl 20-HETE reikšmė kitose IŠL klinikinėse formose reikalauja papildomų tyrimų. Kitame tyrime stebėta, kad stabilia krūtinės angina sergantiems CYP4F2 koncentracija buvo mažesnė nei sveikiems asmenims [154]. Todėl CYP4F2–20-HETE ašies aktyvumo ar jų koncentracijos pokyčiai gali būti susiję su trombozės riziką moduluojančiais mechanizmais ir kisti priklausomai nuo klinikinės būklės ir farmakologinio gydymo.

Atsižvelgiant į tai, kad CYP4F2 dalyvauja ARA metabolizme ir aktyvuojamas uždegimo bei trombozės procesų metu, buvo iškelta hipotezė – modernus hemostazę veikiantis gydymas, apimantis tiesiogiai veikiančius geriamuosius antikoagulantus (tiesioginį aktyvuoto X krešėjimo veiksnio (FXa) inhibitorių rivaroksabaną) bei P2Y₁₂ receptoriaus inhibitorius (tikagrelorą), gali turėti įtakos CYP4F2 reguliacijai. Šių vaistų aktualumas pagrįstas jų plačiu taikymu IŠL sergantiems pacientams esant skirtingoms klinikinėms IŠL formoms. Tikagreloras yra vienas pagrindinių DAPT komponentų ŪKS atvejais, ypač po perkutaninės koronarinės intervencijos (angl. *percutaneous coronary intervention*, PCI) su stento implantacija. Rivaroksabanas skiriamas aterotrombozinių įvykių rizikai mažinti IŠL pacientams, kuriems būdingas padidėjęs trombozinis aktyvumas, remiantis *Cardiovascular Outcomes for People Using Anticoagulation Strategies* (COMPASS) klinikinio tyrimo duomenimis. Kadangi endotelis yra pirminė kraujagyslių barjerinė struktūra, tiesiogiai dalyvaujanti uždegimo ir trombozės iniciacijoje, pagrįstai tikslinga įvertinti šių vaistų poveikį endotelio ląstelių molekuliniais mechanizmais, įskaitant *CYP4F2* raiškos pokyčius HUVEC modelyje.

Nors CYP4F2 ir 20-HETE biologinė reikšmė uždegimo, hemostazės ir kraujagyslių funkcijos reguliacijoje yra pagrįsta ankstesniais tyrimais, iki šiol išlieka nepakankamai aišku, kaip šią ašį veikia klinikinėje praktikoje plačiai taikomi vaistai, skiriami IŠL sergantiems pacientams. Aktualu, ar skirtingų farmakologinių klasių preparatai – antikoagulantai (FXa inhibitoriai), antiagregantai (P2Y₁₂ receptoriaus inhibitoriai) bei RAS inhibitoriai (AKFi ir ARB) – gali tiesiogiai arba netiesiogiai keisti *CYP4F2* raišką ir taip paveikti 20-HETE priklausomus signalinius mechanizmus kraujagyslių sienoje bei jų sąsajas su VA aterosklerozės progresavimu. Dėl to, kad endotelis svarbus uždegiminiame atsake, o RAS aktyvumas funkciškai persidengia su eikozanoidų metabolizmu ir redokso reguliacija, būtini tyrimai endotelio ląstelių

modeliuose, leidžiantys įvertinti šių vaistų poveikį CYP4F2–20-HETE ašies reguliacijai. Tokie tyrimai galėtų padėti geriau suprasti, kaip genetiniai variantai ir vaistų poveikio kintamumas bei skirtingi IŠL klinikiniai fenotipai gali būti susiję su uždegimo, trombozės ir eikozanoidų sąveikos mechanizmais.

1.4. Išeminės širdies ligos ir renino-angiotenzino sistemos sąsajos su inkstų funkcija

IŠL ir inkstų funkcijos sutrikimai sudaro tarpusavyje susijusią patofiziologinę sistemą, kurioje vienos grandies pažeidimas inicijuoja arba paspartina kitos grandies disfunkciją [155]. Inkstai yra vienas svarbiausių kraujotakos homeostazės reguliatorių. Todėl bet koks sisteminės hemodinamikos pakitimas – ED, AH ar aterosklerozė – tiesiogiai veikia inkstų perfuziją, glomerulų filtracijos dinamiką ir struktūrinį vientisumą [156]. Inkstų funkcijos silpnėjimas skatina skysčių susilaikymą, oksidacinį stresą, uždegiminius procesus ir neurohormoninę aktyvaciją, taip didindamas IŠL riziką ir progresavimą. Sutrikusi sisteminė ir periferinė kraujotaka (mikrocirkuliacija) dar labiau sustiprina vietinio audinių pažeidimo, hipoksijos ir uždegiminių reakcijų grandinę. Tai ilgainiui lemia ne tik širdies nepakankamumą, bet ir tiesiogiai skatina lėtinės inkstų ligos išsivystymą ir progresavimą [157, 158].

Svarbiausias šios kardiorenalinės ašies mechanizmas – pernelyg aktyvuota RAS. Ji, veikdama inkstų funkciją, reikšmingai prisideda prie uždegimo ir fibrozės. Be to, inkstai turi visavertę vietinę RAS, kurios veikla gali būti iš dalies autonomiška, tačiau yra glaudžiai susijusi su sistetine RAS. Aktyvuojant klasikinę ACE/Ang II/AT₁ ašį inkstų pažeidimas progresuoja. Priešingai, ACE2/Ang 1–7/Mas ašies aktyvacija mažina lėtinės inkstų ligos progresavimą [159]. Pagrindinis klasikinės ašies efektorius Ang II be įprasto vaidmens inkstų natrio jonų ir kitų elektrolitų transporte lemia glomerulų filtracijos barjero struktūrinius ir funkcinius pokyčius. Vyksta podocitų aktino citoskeleto destabilizacija, didėja didesnės molekulinės masės baltymų filtracija [160]. Ang II sustiprina intraglomerulinį spaudimą, skatindamas selektyvų eferentinių arteriolių susitraukimą, kuris didina kompensacinę nefronų hipertrofiją. Šie hemodinaminiai pokyčiai tiesiogiai mechaniskai veikia podocitus, mezangines ir endotelio ląsteles. Be hemodinaminių efektų, Ang II aktyvuoja signalinius kelius, skatinančius mezanginių ląstelių proliferaciją ir fibroblastų transformaciją į matricą sintetinančius miofibroblastus [161]. Šis procesas atspindi audinių fibrogenozę ir epitelinių ląstelių adaptacinį atsaką į nepalankią mikroaplinką. Dėl glomerulų filtracijos barjero pažeidimo išsivysčiusi proteinurija yra svarbus tubulointerstinio pažeidimo veiks-

nys. Proksimalinių kanalėlių ląstelės, veikiamos baltymų pertekliaus, pradeda sekretuoti citokinus, chemokinus ir augimo veiksnius, kurie skatina uždegiminių ląstelių infiltraciją ir tarpląstelinės matricos kaupimąsi [162].

Aktyvuota RAS tiesiogiai prisideda prie ED vystymosi, kuri yra svarbi kardiorenalinės ašies dalis sergant lėtine inkstų liga [163]. Ureminė, uždegiminė ir oksidacinio streso aplinka mažina NO biologinį prieinamumą. Pažengusiose ligos stadijose tai yra beveik universalus reiškinys ir lemia sutrikusį kraujagyslių išsiplėtimą tiek smulkiosiose, tiek stambiosiose kraujagyslėse [164, 165]. Dėl šių pokyčių didėja periferinis kraujagyslių pasipriešinimas, progresuoja aterosklerozė, kraujagyslių kalcifikacija ir vystosi AH, reikšmingai didinantys IŠL riziką lėtine inkstų liga sergantiems pacientams. Dėl kraujagyslių disfunkcijos jau ankstyvose ligos stadijose sutrinka audinių perfuzija, vystosi hipoksija ir progresuoja inkstų bei kitų organų funkcijos nepakankamumas. Be funkcinų pokyčių nustatomi struktūriniai endotelio pažeidimai – endotelio vientisumo praradimas. Jam būdingas padidėjęs endotelio pralaidumas, endotelio aktyvacija, endotelio mezenchiminė transformacija bei endotelio ląstelių atsiskyrimas nuo kraujagyslės sienos [166]. Endotelio aktyvacija lėtinės inkstų ligos atveju pasireiškia padidėjusiomis cirkuliuojančių ląstelių adhezijos molekulių, įskaitant VCAM-1, ICAM-1, E- ir P-selektiną bei vWF, koncentracijomis kraujyje, kurios atspindi endotelio uždegiminį aktyvumą ir trombogeniškumą. Lėtine inkstų liga taip pat siejama ir su padidėjusia krešėjimo aktyvacija, patvirtinančia sisteminio pobūdžio endotelio pažeidimą [163].

Atsižvelgiant į glaudžią sąveiką tarp aktyvuotos RAS ir ED, ligonių, turinčių inkstų funkcijos sutrikimus, gydymas turėtų būti orientuotas ne tik į tradicinių IŠL rizikos veiksnių kontrolę. Gydymas taip pat turėtų būti nukreiptas į tikslingą RAS moduliaciją ir endotelio funkcijos gerinimą. Toks integruotas požiūris gali prisidėti prie inkstų pažeidimo progresavimo lėtini-
mo, mažinti IŠL komplikacijų dažnį ir pagerinti klinikines baigtis.

1.4.1. RAS inhibitorių poveikis ARA metabolizmo, uždegimo ir inkstų funkcijos reguliacijai

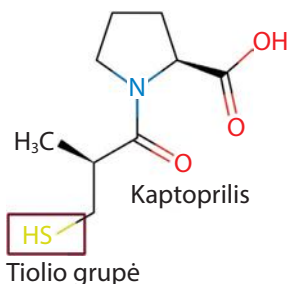
RAS ir ARA metabolizmo keliai sudaro tarpusavyje glaudžiai susijusią reguliacinę sistemą, dalyvaujančią reguliuojant uždegiminį atsaką, kraujagyslių ir inkstų funkciją. Angiotenziną konvertuojančio fermento inhibitoriai (AKFi) ir angiotenzino II receptorių blokatoriai (ARB) yra pirmojo pasirinkimo antihipertenziniai vaistai, tačiau jų poveikis neapsiriboja vien arterinio kraujospūdžio mažinimu. Šie vaistai moduliuoja tiek sisteminį, tiek intrarenalinį RAS aktyvumą.

Tyrimai rodo, kad AKFi ir ARB gali veikti ARA metabolizmo fermentų aktyvumą, ypač CYP4A ir CYP4F izoformų, dalyvaujančių 20-HETE biosintezėje [167]. Slopinant RAS aktyvumą, mažėja Ang II sukeltas CYP4A indukavimas ir NADPH oksidazės aktyvacija. Dėl to sumažėja oksidacinių radikalų susidarymas ir slopinamas 20-HETE sukiamas endotelio pažeidimas [168–170]. AKFi didina bradikinino prieinamumą, o šis aktyvina eNOS, skatina NO sintezę ir veikia kaip funkcinis antagonistas 20-HETE sukiamam kraujagyslių susitraukimui [171]. Klinikinėje praktikoje AKFi gali būti taikomi ir ilgalaikiam pacientų, sergančių staziniu širdies nepakankamumu, diabetine ir nediabetine nefropatija, gydymui [172].

ARB taip pat pasižymi ryškiu renoprotekciniu poveikiu. Blokuodami AT₁ receptorių, ARB mažina intraglomerulinį spaudimą, normalizuoja glomerulų hemodinaminę pusiausvyrą, gerina perfuziją, todėl slopina albuminuriją ir apsaugo filtracijos barjerą nuo Ang II sukiamos glomerulų endotelio ir podocitų pažeidimo [173]. Dėl geresnės mikrocirkuliacijos ARB tiesiogiai riboja lėtinės hipoksijos progresavimą, kuris yra vienas pagrindinių glomerulų ir intersticinės fibrozės vystymosi veiksnių. Šių mechanizmų visuma sudaro pagrindą ARB taikymui renoprotekciniai terapijai pacientams, kuriems progresuoja inkstų funkcijos nepakankamumas.

Šiame darbe tirti trys RAS reguliuojantys junginiai – kaptoprilis, losartanas ir MLN-4760 – apėmė skirtingas RAS funkcinės ašies dalis. Tai leidžia kompleksiskai įvertinti RAS moduliacijos poveikį kraujagyslių endotelio ir inkstų funkcijai bei uždegiminiams procesams. Kaptoprilis, pirmasis klinikinėje praktikoje pradėtas naudoti AKFi, pasižymi ne tik RAS slopinamuoju, bet ir išreikštu pleotropiniu poveikiu. Dėl junginyje esančios tiolio grupės (-SH) kaptoprilis pasižymi antioksidacinėmis savybėmis (1.4.1.1 pav.). Jis tiesiogiai suriša ir neutralizuoja ADJ bei slopina jų perteklinę gamybą NADPH oksidazės aktyvavimo metu, apsaugodamas endotelį nuo oksidacinio pažeidimo [174]. Šios savybės yra ypač reikšmingos lėtinės inkstų ligos metu, kai oksidacinis stresas ir lėtinis uždegimas lemia inkstų ir kraujagyslių pažeidimo progresavimą. Be sisteminio poveikio, kaptoprilis aktyviai veikia ir intrarenalinę RAS – mažina eferentinės arteriolės tonusą ir intraglomerulinį spaudimą, slopina Ang II sukeltą glomerulų sklerozę, oksidacinį stresą ir tubulointersticinės fibrozės progresavimą [175, 176]. Tokiu būdu palaikomas glomerulų filtracijos barjero struktūrinis ir funkcinis vientisumas, mažinama proteinurija ir uždegiminių signalų aktyvacija inkstų audinyje. Klinikiniai tyrimai rodo, kad kaptoprilis lėtina inkstų funkcijos blogėjimą tiek diabetinės, tiek nediabetinės nefropatijos atvejais, o šis nefroprotektinis poveikis nėra vien arterinio kraujospūdžio sumažėjimo pasekmė [177]. Tai patvirtina, kad kaptoprilis veikia kaip daugialypis intrarenalinės hemodinamikos ir oksida-

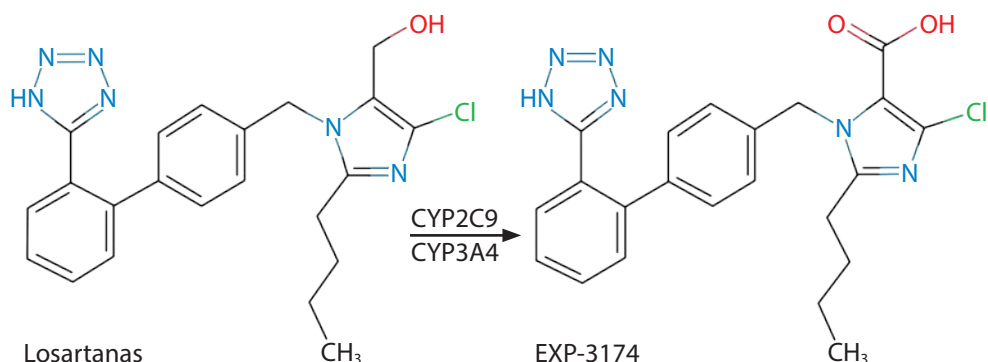
cinio streso reguliatorius ir tai pagrindžia jo pasirinkimą kaip tiriamąjį junginį šiame darbe.



1.4.1.1 pav. Kaptoprilio cheminė struktūra

Adaptuota iš ChemSpider (Royal Society of Chemistry 2026; <https://www.chemspider.com/>)

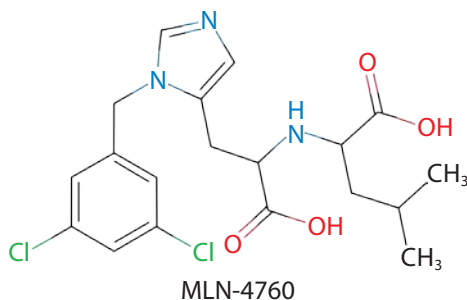
Losartanas, selektyvus AT₁ receptorių antagonistas, taip pat pasižymi ne tik antihipertenziniu, bet ir antioksidaciniu bei priešuždegiminiu poveikiu. Losartanas slopina Ang II sukeltą signalinę kaskadą ir taip mažina uždegiminių mediatorių, įskaitant prostaglandinus, ET-1, raišką bei NADPH oksidazės stimuliuojamą ADJ sintezę [178]. Losartanas yra provaistas, kuris daugiausia kepenyse, veikiant citochromo P450 fermentams CYP2C9 ir CYP3A4, metabolizuojamas į farmakologiškai aktyvų metabolitą – karboksirūgšties junginį EXP-3174 (1.4.1.2 pav.) [179]. EXP-3174 pasižymi didesniu afinitetu AT₁ receptoriams nei losartanas ir užtikrina ilgalaikį bei efektyvų Ang II biologinio poveikio slopinimą [180]. Losartaną iš kitų ARB išskiria jo urikozurinis poveikis, kuris siejamas su padidėjusia šlapimo rūgšties ekskrecija. Šis poveikis susijęs su uratų pernašos baltymų slopinimu inkstų proksimaliniuose kanalėliuose, dėl kurio mažėja uratų reabsorbcija [181]. Inkstuose losartanas, panašiai kaip ir kaptoprilis, veikia intrarenalinę RAS, mažindamas eferentinės arteriolės tonusą, intraglomerulinį spaudimą. Šie hemodinaminiai pokyčiai prisideda prie proteinurijos slopinimo ir glomerulų filtracijos barjero apsaugos [182]. Be to, losartanas slopina uždegiminių ir profibrozinių signalinių kelių aktyvaciją, mažina TGF-β raišką bei tarpląstelinės matricos kaupimąsi, taip lėtinamas tubulointerstinės fibrozės ir lėtinės inkstų ligos progresavimą [183]. Atsižvelgiant į losartano veikimo specifiką, jo įtraukimas į tyrimą leidžia kompleksiskai įvertinti RAS slopinimo poveikį endotelio ir inkstų ląstelių funkciniam ir signaliniam mechanizmom.



1.4.1.2 pav. Losartano ir jo aktyvaus metabolito cheminė struktūra

Adaptuota iš ChemSpider (Royal Society of Chemistry 2026; <https://www.chemspider.com/>)

MLN-4760, selektyvus ACE2 inhibitorius, leidžia tirti alternatyvią RAS šaką (ACE2/Ang 1–7/Mas) ir jos įtaką ARA metabolizmo, uždegimo ir inkstų funkcijos reguliacijoje. Skirtingai nuo kaptoprilio ir losartano, kurie slopina klasikinę RAS ašį, veikiant MLN-4760 galima imituoti būseną, kuriai yra būdingas sumažėjęs šios apsauginės RAS šakos aktyvumas. Tokiai būsenai būdingas santykinis klasikinės ACE/Ang II/AT₁ ašies dominavimas. Nors MLN-4760 neturi redoksiniu požiūriu aktyvių funkcinių grupių, tačiau cheminėje struktūroje svarbų vaidmenį atlieka dvi karboksilato grupės (–COO[–]) ir imidazolo žiedas (1.4.1.3 pav.) [184]. Jie su ACE2 aktyviojo centro aminorūgštimis sudaro jonines ir vandenilines sąveikas bei stabilizuoja junginio prisijungimą katalizinėje fermento srityje. ACE2 aktyvumo slopinimas mažina Ang 1–7 biologinį prieinamumą. Tai sudaro palankias sąlygas uždegimo, oksidacinio streso ir ED vystymuisi. Eksperimentiniai inkstų pažaidos modeliai rodo, jog ACE2 slopinimas didina albuminuriją ir skatina glomerulinės tarpląstelinės matricos kaupimąsi. Šie pokyčiai atspindi intrarenalinės RAS disbalansą ir inkstų struktūrinio pažeidimo progresavimą [185]. Todėl MLN-4760 įtraukimas į tyrimą leidžia įvertinti RAS signalinės pusiausvyros svarbą kraujagyslių endotelio ir inkstų ląstelių funkcijai.



1.4.1.3 pav. MLN-4760 cheminė struktūra

Adaptuota iš ChemSpider (Royal Society of Chemistry 2026; <https://www.chemspider.com/>)

1.4.2. 20-HETE ir inkstų funkcijos reguliacija: GPR75 receptorius

Nors tyrimuose minėtas ARA metabolitas 20-HETE dažniausiai analizuojama kaip su ED susijęs biožymuo, vis daugiau duomenų rodo, kad 20-HETE atlieka aktyvų vaidmenį ne tik kraujagyslių, bet ir inkstų funkcijos reguliacijoje [186, 187]. Inkstuose 20-HETE pasižymi kompleksiniu, nuo patofiziologinių sąlygų priklausomu poveikiu: viena vertus ji dalyvauja intrarenalinės hemodinamikos ir natrio jonų reabsorbcijos reguliacijoje, kita vertus, ji yra siejama su uždegiminių (NF- κ B), profibrozinių (TGF- β /Smad) ir proliferacinių (MAPK) signalinių kelių aktyvacija, galinčia prisidėti prie glomerulinio ir tubulointerstinio pažeidimo progresavimo [188, 189].

Pastaraisiais metais nustatyta, kad kraujagyslių endotelyje ir lygiuosiuose raumenyse 20-HETE veikia per su G baltymu susijusį receptorių GPR75 [190]. 20-HETE prisijungimas prie GPR75 sukelia $G\alpha_{q/11}$ subvieneto disociaciją, skatina inozitolio trifosfato (IP₃) susidarymą, didina viduląstelinę Ca²⁺ koncentraciją ir aktyvina MAPK signalinį kelią [128]. Šių signalinių įvykių visuma lemia ED būdingus pokyčius, pasireiškiančius sumažėjusiu NO biologiniu prieinamumu ir padidėjusia ADJ sinteze. Be to, 20-HETE/GPR75 signalinis kelias aktyvina NF- κ B bei skatina ACE raišką, sudarydamas prielaidas formuotis teigiamojo ryšio mechanizmui tarp RAS ir ARA metabolizmo (1.4.2.1 pav.) [191].

Aprašymas. ARA, veikiant citochromo P450 fermentams (daugiausia CYP4F izoformai), metabolizuojama į 20-HETE, kuris veikia kaip biologiškai aktyvus lipidinis mediatorius. 20-HETE pasižymi dideliu afinitetu su Gq baltymu susijusiam receptoriui GPR75, lokalizuotam kraujagyslių endotelio ir lygiųjų raumenų ląstelių membranoje. Prisijungus 20-HETE prie GPR75, aktyvuojamas $G\alpha_{q/11}$ baltymas, inicijuojantis fosfolipazės C (PLC) signalinę kaskadą, dėl kurios didėja inozitolio trifosfato (IP_3) ir diacilglicerolio (DAG) susidarymas bei viduląstelinė Ca^{2+} koncentracija. Padidėjusi Ca^{2+} koncentracija ir baltymų kinazės C (PKC) aktyvacija lemia kelių signalinių kelių sužadinimą. Vienas svarbiausių jų yra MAPK signalinis kelias, kuris reguliuoja genų transkripciją, ląstelių proliferaciją ir uždegiminių mediatorių sintezę. Kartu 20-HETE/GPR75 signalinis kelias sukelia eNOS inaktyvaciją arba funkcinį atsiejimą, dėl to mažėja NO biologinis prieinamumas ir didėja ADJ (O_2^-) gamyba. Šis disbalansas tiesiogiai prisideda prie kraujagyslių susitraukimo, ED ir oksidacinio streso. 20-HETE poveikis per GPR75 apima NF- κ B signalinio kelio aktyvaciją. Aktyvuotas NF- κ B translokuojamas į branduolį, kur skatina uždegiminių citokinų (IL-1, IL-6, TNF- α), adhezijos molekulių (ICAM-1, VCAM-1, E-selektino), taip pat fermentų, dalyvaujančių eikozanoidų sintezėje (PLA₂, COX-2), raišką. Tai lemia leukocitų adheziją, uždegiminį atsaką ir progresuojančius kraujagyslių bei audinių funkcijos pokyčius. Paveiksle taip pat pavaizduota 20-HETE sąveika su RAS komponentais. NF- κ B aktyvacija skatina ACE raišką, taip didindama Ang II susidarymą ir sustiprindama klasikinės RAS ašies (ACE/Ang II/AT₁) aktyvumą. Ang II, veikdamas per AT₁ receptorių, papildomai aktyvuoja MAPK ir NF- κ B kelius, didina uždegimą, oksidacinį stresą ir ED, sudarydamas teigiamo grįžtamojo ryšio mechanizmą tarp 20-HETE signalinio kelio ir RAS. Priešpriešą šiam patogeniniam procesui sudaro apsauginė ACE2/Ang 1–7/Mas ašis, kuri pasižymi priešuždegiminiu, kraujagysles plečiančiu ir antioksidaciniu poveikiu. Paveiksle pažymėti RAS inhibitoriai – AKFi kaptoprilis, ARB losartanas ir selektyvus ACE2 inhibitorius MLN-4760 – iliustruoja skirtingus farmakologinius RAS moduliacijos taikinius, leidžiančius keisti šios signalinės pusiausvyros kryptį.

Priešingai nei endotelyje, 20-HETE signaliniai mechanizmai inkstų epitelinėse ląstelėse ir kepenyse iki šiol išlieka nepakankamai apibrėžti. Nors šiuose audiniuose intensyviai vykdoma 20-HETE sintezė, veikiant CYP4A ir CYP4F fermentams, trūksta duomenų, ar GPR75 yra pagrindinis šio metabolito receptorių inkstų kanalėlių ar kepenų ląstelėse, ar 20-HETE poveikis šiuose audiniuose yra realizuojamas per alternatyvius signalinius kelius [192]. Tai riboja galimybes tiksliai įvertinti 20-HETE vaidmenį inkstų pažeidimo patogenezėje ir jos sąveiką su RAS.

Siekiant funkciškai įvertinti 20-HETE biologinį aktyvumą ir jos tarpininkaujamus signalinius kelius, modeliuose taikomas struktūriškai giminingas metabolitas 19-hidroksieikozatetraeno rūgštis (19-HETE). Ji veikia kaip funkcinis 20-HETE antagonistas. Visgi, apie 19-HETE fiziologines funkcijas yra žinoma gana nedaug palyginti su 20-HETE. 19-HETE pasižymi gebėjimu slopinti Ang II sukeltą hipertrofiją žmogaus širdies ląstelėse, skatina preglomerulinių kraujagyslių išsiplėtimą, stimuliuoja inkstų Na^+/K^+ -ATPazės aktyvumą. Svarbu tai, kad 19-HETE pasižymi priešingu poveikiu kraujagyslėms ir endotelio funkcijai nei 20-HETE [193]. 19-HETE neutralizuoja 20-HETE poveikį NO ir superoksido sintezei [194]. Tyrimai su pelėmis parodė, kad 19-HETE gali sukelti kraujagyslių atsipalaidavimą ir slopinti trombocitų aktyvaciją, indukuotą trombinu [193]. Nors yra žinoma, kad 19-HETE pasižymi teigiamu poveikiu kraujagyslių funkcijai, jos veikimo mechanizmai nėra iki galo aiškūs. Neseniai paviršiaus plazmoninio rezonanso (SRR) tyrimu buvo parodyta, kad funkcinis 20-HETE antagonistas 19(R)-HETE geba jungtis prie GPR75 receptoriaus 20-HETE jungimosi srities, kurią sudaro TM5 ir TM6 transmembraniniai domenai, priešingai nei 19(S)-HETE stereoisomeras [195]. Vis dėlto 19-HETE sąveika su GPR75 receptoriais ir jo raiška nėra patvirtinta tiek endotelyje, tiek kitose organizmo vietose kaip inkstai ir kepenys.

Šiame kontekste tikslinga vertinti RAS inhibitorių – kaptoprilio, losartano ir MLN-4760 – poveikį 20-HETE susidarymui, GPR75 receptoriaus, eikozanoidų metabolizmo, prostaglandinų sintezės bei adhezijos molekulių raiškai. Tai leistų įvertinti, kaip skirtinguose RAS signalinės kaskados lygmenyse veikiantys inhibitoriai veikia nuo 20-HETE priklausomą signalinį kelią ir jo sąsajas su endotelio bei inkstų pažeidimo patogenezė. Be to, vertinant 20-HETE ir jos funkcinio antagonisto 19(R)-HETE poveikį GPR75 raiškai galima įvertinti, ar 20-HETE–GPR75 ašis gali būti reguliuojama antagonistiniais ARA metabolitais, taip išplečiant potencialių terapinių taikinių spektrą.

1.5. Žemo dažnio ultragarso poveikis RAS inhibitorių biologiniam atsakui

Farmakologinė RAS moduliacija ne visuomet užtikrina optimalų biologinį atsaką – vaistų efektyvumą gali riboti nepakankama audinių penetracija ir nevienalytis ląstelinis atsakas. Heterogeniškam ląstelių atsakui įtakos gali turėti struktūriniai barjerai, susiję su aterosklerozinėmis plokštelėmis [196]. Aterosklerozinės plokštelės ne tik mechanškai riboja kraujotaką ir audinių perfuziją, bet ir formuoja uždegiminę bei prooksidacinę mikroaplinką. Ši

aplinka gali silpninti farmakologinių junginių veiksmingumą jų taikymo vietoje. Tai paskatino ieškoti papildomų metodų, galinčių pagerinti ląstelių biologinį atsaką į vaistą. Neinvaziniai terapiniai metodai sulaukia vis didesnio dėmesio gerinant gydymo efektyvumą, kartu užtikrinant palankų saugumo profilį ir į pacientą orientuotą gydymą [197]. Šiai metodų grupei priskiriamos įvairios fizikinės intervencijos, įskaitant šviesos, elektromagnetinių laukų taikymą, vaistų pernašą naudojant mikroadatas bei ultragarsą (UG).

Vienas iš perspektyvių būdų sustiprinti AKFi ir ARB terapinį poveikį endotelio ir inkstų ląstelių funkcijai gali būti šių vaistų derinimas su UG – mechaninėmis bangomis, kurių dažnis viršija žmogaus klausos ribą (> 20 kHz). UG technologija dėl savo neinvazinio pobūdžio ir nedidelių eksploatacinių sąnaudų užima išskirtinę vietą klinikinėje diagnostikoje. UG technologijos skirstomos į diagnostines ir terapines, atsižvelgiant į naudojamą dažnį ir intensyvumą. Diagnostinis UG (2–20 MHz, mažo intensyvumo) plačiai taikomas neinvazinei audinių vizualizacijai, o terapinis UG (20 kHz–3 MHz) sukelia biologinius efektus, priklausančius nuo perduodamos energijos intensyvumo [198]. Žemo ar vidutinio intensyvumo UG veikia daugiausia neterminiais mechanizmais, tokiais kaip kavitacija ir mechanotransdukcija, todėl yra tinkamas tikslinės vaistų pernašos ir audinių funkcijos moduliacijos tikslams. Kita vertus, didelio intensyvumo UG sukelia terminius efektus ir taikomas tiksliniam patologinių audinių pažeidimui [199]. UG bangų dažnis lemia jų skvarbą, erdvinę raišką ir biologinį poveikį, todėl yra esminis parametras parenkant terapinį pritaikymą.

Terapinis UG, taikomas kartu su sisteminiu būdu skiriamais vaistais, pasižymi sinerginiu poveikiu, kuris plačiai nagrinėjamas eksperimentiniuose ir ikiklinikiniuose tyrimuose [200]. Žemo intensyvumo UG sukelti mechaniniai efektai, įskaitant kavitaciją ir sonoporaciją, didina ląstelių proliferaciją, membranų pralaidumą, moduliuoja jonų srautus, ypač Ca^{2+} pernašą ir daro kitą reikšmingą įtaką ląstelių funkcijai, priklausomai nuo taikomų UG parametrų [201]. Tyrimai rodo, kad žemo intensyvumo UG gali teigiamai veikti endotelio funkciją – didinti NO sintezę, gerinti kraujagyslių tonusą ir mažinti oksidacinį stresą – veiksnius, kurie yra esminiai ED ir VA mikrocirkuliacijos sutrikimų patogenezėje [202]. Ankstesni tyrimai taip pat parodė, kad UG pasižymi priešušdegiminėmis savybėmis, nes mažina adhezijos molekulių raišką ir slopina ADJ kaupimąsi ląstelių kultūrose [203, 204]. Dėl šių savybių terapinio UG taikymas leidžia tikslingai aktyvuoti kraujagyslių endotelį, taip pagerinant vaistų pernašą į tikslinius audinius ir kartu mažinant nepageidaujamą poveikį netikslinėse lokacijose. Inkstų ląstelėse terapinis UG gali veikti mechanotransdukcijos kelius, potencialiai moduluodamas natrio

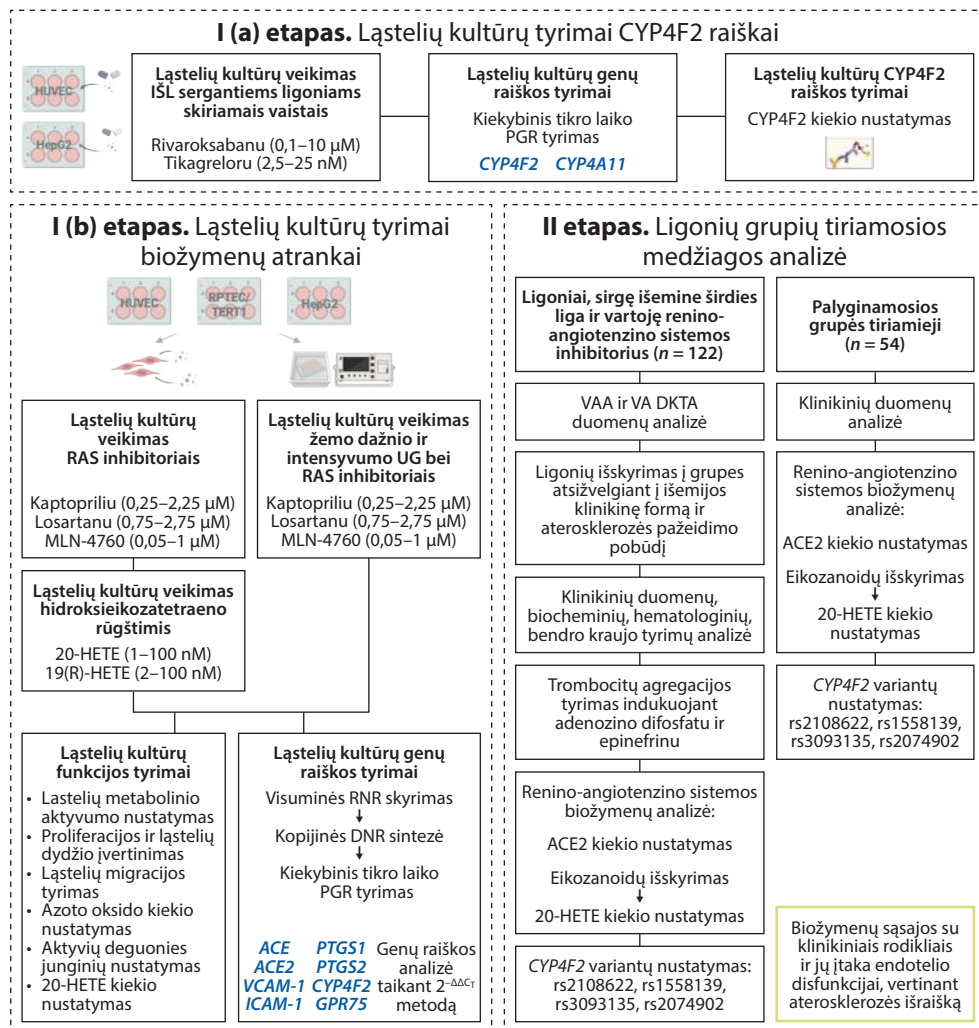
jonų ir vandens reabsorbciją bei uždegiminių procesų aktyvumą, kurie yra ypač svarbūs RAS reguliacijoje [205].

Siekiant užtikrinti saugų ir efektyvų UG taikymą, būtina tiksliai charakterizuoti energijos perdavimą biologiniuose audiniuose, užtikrinant optimalų elektrinės ir akustinės varžos suderinamumą bei efektyvią energijos transdukciją. Nors terminiai UG poveikiai yra gerai ištirti, neterminiai, ypač žemo dažnio ir intensyvumo UG sukelti biologiniai efektai, susiję su vaisių pernašos gerinimu ir ląstelinio atsako moduliacija, vis dar kelia nemažai klausimų [206]. Didžioji dalis iki šiol publikuotų tyrimų buvo atlikti *in vitro* modeliuose, dažniausiai taikant aukšto dažnio UG, o *in vivo* tyrimų šioje srityje yra palyginti nedaug. Tai iš dalies lemia metodologiniai iššūkiai, susiję su optimalių UG parametrų parinkimu, nes UG skvarba kinta priklausomai nuo dažnio. *In vitro* sąlygomis nustatyti veiksmingi UG dažnio ir intensyvumo deriniai ne visada gali būti tiesiogiai perkelti į *in vivo* tyrimus, siekiant analogiško biologinio efekto.

Tyrimų, kurių metu taikytas žemo dažnio UG, atlikta nedaug. Naujausiais duomenimis, žemo dažnio UG mažino senstančių ląstelių senėjimą nulemiančių biožymenų kiekį ir skatino šių ląstelių proliferaciją [207]. Taikant 24 kHz dažnio UG nustatyti reikšmingi morfologiniai pokyčiai – sumažėjęs ląstelių tūris, apoptozinių pūslelių formavimasis, chromatino kondensacija bei branduolio fragmentacija [208, 209]. Atsižvelgiant į tai, kad žemo dažnio UG gali palankiai moduluoti ląstelių funkciją, aktyvindamas mechanotransdukcinius procesus bei su redokso pusiausvyra susijusius mechanizmus, išlieka aktualus klausimas, kaip parinkti optimalų žemo dažnio UG režimą, galintį sumažinti ED požymius bei teigiamai veikti inkstų ląstelių funkciją. Šios prielaidos sudaro pagrindą tikslingai tirti žemo dažnio ir intensyvumo UG taikymo galimybes. Tikėtina, kad UG poveikis galėtų sustiprinti farmakologinės RAS moduliacijos biologinį atsaką ir pagerinti kraujagyslių endotelio ir inkstų ląstelių funkciją.

2. TYRIMO MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Tyrimo struktūra



2.1.1 pav. Tyrimo struktūra

Tyrimas buvo sudarytas iš dviejų etapų (2.1.1 pav.). Pirmojo tyrimo etapo metu eksperimentai buvo atliekami su nepatologinėmis endotelio ir inkstų ląstelių kultūromis bei kepenų vėžinėmis ląstelių kultūromis *in vitro*. I (a) tyrimo etape buvo vertintas ISL gydymui skiriamų vaistų poveikis CYP4F2 raiškai. I (b) tyrimo etape, įvertinus ląstelių funkcijos ir genų raiškos tyrimų rezultatus, nustatyti aktualūs biožymenys bei jų pokyčiai. Atrinkti biožymenys buvo tiriami antrojo tyrimo etapo metu – ligonių, sirgusių ISL ir

gydytų RAS inhibitoriais bei asmenų, nesirgusių IŠL, imtyje. Tyrimai su komercinėmis ląstelių kultūromis atlikti LSMU MA Kardiologijos instituto Molekulinės kardiologijos laboratorijoje. Tiriamųjų ligonių ir palyginamoji grupės surinktos Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninės Kauno klinikų (Kauno klinikų) Kardiologijos klinikoje. Tyrimai su pacientų biologine medžiaga atlikti LSMU MA Kardiologijos instituto Molekulinės kardiologijos laboratorijoje.

2.2. Bioetika

Tyrimas su žmonių biologine medžiaga buvo atliktas vadovaujantis Helsinkio deklaracijos nuostatomis. Tyrimai atlikti gavus Kauno regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto pritarimą biomedicininio tyrimo papildymui (leidimo Nr. P1-BE-2-19/2019) (1 priedas). Visi tyrimo dalyviai buvo informuoti apie tyrimo struktūrą ir tikslus. Iš visų tiriamųjų buvo gautas raštinškas informuotas sutikimas dalyvauti tyrime.

2.3. Reagentai, priemonės, įranga

2.3.1. Ląstelių linijos

Tyrime buvo naudojama žmogaus virkštelės venos endotelio ląstelių linija HUVEC (*Gibco by Life Technologies*, Karlsbadas, JAV), žmogaus inkstų proksimalinių kanalėlių epitelinių ląstelių linija RPTEC/TERT1 (*Evercyte*, Viena, Austrija) bei žmogaus hepatoceliulinės karcinomos ląstelių linija HepG2 (*ATCC*, Manassas, JAV). HUVEC ląstelės buvo kultivuojamos žmogaus didžiųjų kraujagyslių endotelinių ląstelių bazinėje terpėje (angl. *Human Large Vessel Endothelial Cell Basal Medium*, HLVECBM, *Gibco by Life Technologies*, Karlsbadas, JAV), papildytoje 1× didžiųjų kraujagyslių endotelinių ląstelių priedu (angl. *Large Vessel Endothelial Supplement*, LVES, *Gibco by Life Technologies*, Karlsbadas, JAV) bei 1 proc. antibiotikų tirpalu (10000 VV/ml penicilino, 10 mg/ml streptomicino, *Gibco by Life Technologies*, Karlsbadas, JAV). RPTEC/TERT1 ląstelės buvo auginamos DMEM/F-12 mitybinėje terpėje (1:1 mišinys) (*Gibco by Life Technologies*, Karlsbadas, JAV), į kurią papildomai buvo pridėta: 4 proc. veršelių vaisiaus serumo (angl. *Fetal Bovine Serum*, FBS, *Gibco by Life Technologies*, Karlsbadas, JAV), 2 mM L-alanil-L-glutamino (*Glutamax*, *Gibco by Life Technologies*, Karlsbadas, JAV), 1× insulino-transferino-seleno mišinio (ITS-G, *Gibco by Life Technologies*, Karlsbadas, JAV), 10 ng/ml žmogaus epidermio augimo veiksnio (hEGF, *Lonza*, Volkersvilis, JAV), 25 ng/ml hidrokortizono (*Sigma-Aldrich*, Sent Luisas, JAV) ir 100 µg/ml G418 sulfato

(geneticino) (*Alfa Aesar*, Karlsrühė, Vokietija). HepG2 ląstelės kultivuotos DMEM mitybinėje terpėje su 2 mM L-alanil-L-glutamino (*Gibco by Life Technologies*, Karlsbadas, JAV), papildytoje 10 proc. FBS bei 1 proc. antibiotikų tirpalu (10 000 VV/ml penicilino, 10 mg/ml streptomicino). Ląstelės buvo auginamos inkubatoriuje, kuriame palaikoma pastovi 37 °C temperatūra, 5 proc. CO₂ koncentracija ir 95 proc. drėgmė.

2.3.2. Reagentai

Tripsino-EDTA tirpalas (0,5 proc., *Gibco by Life Technologies*, Karlsbadas, JAV), fosfatinis buferinis druskų tirpalas, pH 7,4 (angl. *Phosphate-Buffered Saline*, PBS, *Gibco by Life Technologies*, Karlsbadas, JAV), *e-Myco Mycoplasma PCR Detection Kit* rinkinys (*iNtRON Biotechnology*, Pietų Korėja), rivaroksabanas (*Xarelto*® 20 mg tabletės, *Bayer*, Lėverkuzenas, Vokietija), galvijų serumo albuminas (angl. *bovine serum albumin*, BSA, *Abcam*, Kembridžas, Jungtinė Karalystė), natrio chloridas (0,9 proc., *B. Braun*, Melsungenas, Vokietija), tikagreloras (*Brilique*® 90 mg tabletės, *AstraZeneca*, Kembridžas, Jungtinė Karalystė), kaptoprilis (≥ 98 proc. grynumas, *Sigma-Aldrich*, Sent Luisas, JAV), losartano kalio druska (≥ 98 proc. grynumas, *Sigma-Aldrich*, Sent Luisas, JAV), MLN-4760 (99,78 proc. grynumas, *MedChemExpress*, Pietų Brunsvikas, JAV), dimetilsulfoksidas (DMSO, ≥ 99,9 proc. grynumas, *Sigma-Aldrich*, Sent Luisas, JAV), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio bromidas (MTT, *Invitrogen*, Valthamas, JAV), 0,4 proc. tripano mėlynasis (*Gibco by Life Technologies*, Karlsbadas, JAV), *Nitric Oxide Assay Kit* rinkinys (*Invitrogen*, Valthamas, JAV), *ROS/Superoxide Detection Assay Kit* rinkinys (*Abcam*, Kembridžas, JK), *PureLink RNA Mini Kit* rinkinys (*Invitrogen*, Valthamas, JAV), *TRIzol* reagentas (*Invitrogen*, Valthamas, JAV), deoksiribonukleazė I (DNazė I, *Invitrogen*, Valthamas, JAV), *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor* rinkinys (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lietuva), *Power SYBR Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*, Valthamas, JAV), citochromo P450 4F2 (CYP4F2) ELISA rinkinys (*Cloud-Clone Corp.*, Hiustonas, JAV), 2,6-di-tert-butil-4-metilfenolis (butilintas hidroksitoluenas, BHT) (*Dr. Ehrenstofer GmbH*, Augsburgas, Vokietija), acto rūgštis (≥ 99,5 proc. grynumas, *Honeywell Research Chemicals*, Seelze, Vokietija), etilacetatas (≥ 99,5 proc. grynumas, *Honeywell Research Chemicals*, Seelze, Vokietija), etanolis (96 proc. grynumas, Vilniaus degtinė, Vilnius, Lietuva), 20-HETE ELISA rinkinys (*Detroit R&D, Inc.*, Detroitas, JAV), ACE2 ELISA rinkinys (*Biovendor*, Brno, Čekijos Respublika), 20-HETE (≥ 98 proc. grynumas, *Cayman Chemical Company*, An Arboras, JAV), 19(R)-HETE (≥ 98 proc. grynumas, *Cayman Chemical Company*, An Arboras, JAV), para-

formaldehidas (*Sigma-Aldrich*, Sent Luisas, JAV), Triton X-100 (*Sigma-Aldrich*, Sent Luisas, JAV), 4',6-diamidino-2-fenilindolo dihidrochloridas (DAPI, *Thermo Fisher Scientific Baltics*, Valthamas, JAV), anti-GPR75 antikūnai (*Sigma-Aldrich*, Sent Luisas, JAV), rodaminu žymėti ožkos antikūnai prieš triušio IgG (*Sigma-Aldrich*, Sent Luisas, JAV), *ProLong™ Glass Antifade Mountant* (*Invitrogen*, Valthamas, JAV), *Genomic DNA Purification Kit* rinkinys (*Thermo Fisher Scientific*, Valthamas, JAV), *TaqMan™ SNP Genotyping Assays* (*Thermo Fisher Scientific*, Valthamas, JAV), *TaqMan® Universal Master Mix II* mišinys (*Thermo Fisher Scientific*, Valthamas, JAV), adenzino difosfatas (*Chrono-Log Corporation*, Havertown, JAV), epinefrinas (0,1 proc., *WZF POLFA*, Varšuva, Lenkija).

2.3.3. Priemonės

Ląstelių kultūrų kultivavimui ir tyrimams naudotos priemonės: serologinės pipetės (5, 10 ir 25 ml tūrio, pipėčių antgaliai (10, 20, 100, 200 ir 1 000 µl tūrio), centrifuginiai mėgintuvėliai, šaldymo mėgintuvėliai, mėgintuvėliai (15 ir 50 ml tūrio), 25 cm² (T-25) ir 75 cm² (T-75) ląstelių kultūrų flakonai (*Nunclon Delta Surface*, *Thermo Scientific*, Valthamas, JAV), 6, 12, 24 ir 96 šulinėlių kultūrų plokštelės (*Nunclon Delta Surface*, *Thermo Scientific*, Valthamas, JAV), 96 šulinėlių ląstelių kultūrų mikroplokštelės su juodomis sienelėmis (*Corning Inc.*, JAV), *Countess* ląstelių skaičiavimo stikleliai su kameromis (*Invitrogen*, Valthamas, JAV). Genų raiškos tyrimams naudotos *MicroAmp Optical* 96 šulinėlių plokštelės (*Applied Biosystems*, Valthamas, JAV). Veninis kraujas buvo paimamas į *BD Vacutainer®* vakuuminius mėgintuvėlius su K₂EDTA (dikalto etilendiamintetraacetatu) genetiniams tyrimams bei į mėgintuvėlius su 3,2 proc. natrio citrato tirpalu trombocitų agregacijos tyrimams (*Becton, Dickinson and Company (BD)*, Franklin Lakes, JAV).

2.3.4. Laboratorinė įranga

Tyrimams naudota laboratorinė įranga: *Heracell VIOS 160i* ląstelių kultūrų inkubatorius (*Thermo Electron LED GmbH*, Langensfeldas, Vokietija), *Countess II FL* ląstelių skaičiuotuvas (*Life Technologies*, Botelis, JAV), *EVOS XL Core* vaizdinimo sistema (*Invitrogen*, Botelis, JAV), *Infinite® M Plex* mikroplokštelių skaitytuvas (*Tecan Austria GmbH*, Grėdigas, Austrija), *SUB Aqua Pro* vandens vonelė (*Grant Instruments Ltd.*, Kembrižas, JK), *Heraeus Pico 21* centrifuga (*Thermo Electron LED GmbH*, Osterode, Vokietija), *MPS-1* plokštelių purtyklė (*Biosan SIA*, Ryga, Latvija), *S1* serologinių pipėčių dozatorius (*Thermo Scientific*, Valthamas, JAV), *Hera-safe 2030i II* klasės biologinės saugos vertikalaus srauto laminaras (*Thermo*

Electron LED GmbH, Langenselboldas, Vokietija), *MSC-Advantage II* klasės biologinės saugos vertikalus srauto laminaras (*Thermo Electron LED GmbH*, Langenselboldas, Vokietija), *Waters ACQUITY UPLC H-Class* efektyviosios skysčių chromatografijos sistema (*Waters Corporation*, Milfordas, JAV), *Waters Xevo TQD* trigubo kvadrupolio masių spektrometras (*Waters Corporation*, Milfordas, JAV), 3D lazerinis skenuojantis vibrometras (*Polytec GmbH*, Valdbronas, Vokietija), impedanso analizatorius (*Wayne Kerr Electronics Ltd.*, Bognor Regis, JK), *NanoDrop 2000* (*Thermo Scientific*, Valthamas, JAV), *Tprofessional* termocikleris (*Biometra GmbH*, Getingenas, Vokietija), *QuantStudio 5* tikro laiko PGR sistema (*Applied Biosystems*, Singapūras, Singapūro Respublika), *StatFax 4200* mikroplokštelių skaitytuvas (*Awareness Technologies*, Palm City, JAV), *EVOS M7000* vaizdinimo sistema (*Invitrogen*, Botelis, JAV), *Multivap* azoto garinimo įrenginys (*Organomation*, Berlin, JAV), *Platelet Aggregometer TA-8V* trombocitų agregometras (*SD Innovation*, Frouard, Prancūzija).

2.3.5. Programinė įranga

ImageJ v1.54d versija (Nacionalinis sveikatos institutas (NIH), Betesda, JAV), *Tecan i-control 2.0* versija (*Tecan Group Ltd.*, Männedorfas, Šveicarija), *Primer-BLAST* (Nacionalinis biotechnologinės informacijos centras (NCBI), Betesda, JAV), *UCSC In-Silico PCR V39x1* versija (Kalifornijos universitetas (UCSC), Santa Kruzas, JAV), *OligoAnalyzer 3.1* versija (*Integrated DNA Technologies*, Koralvilis, JAV), *ND-1000 v3.7.1* versija (*Thermo Fisher Scientific*, Valthamas, JAV), *ThromboSoft v.1.6.1.3* versija (*SD Innovation*, Frouard, Prancūzija), *GraphPad Prism v.8* versija (*GraphPad Software, Inc.*, San Diegas, JAV), *Microsoft Office LTSC Professional Plus 2024* (*Microsoft Corporation*, Redmondas, JAV), *IBM SPSS Statistics v.27.0* versija (*IBM Corporation*, Armonk, JAV). Iliustracijos buvo parengtos naudojant *BioRender.com* platformą (Torontas, Kanada).

2.4. Tyrimo metodai su ląstelių kultūromis

2.4.1. Ląstelių kultūrų kultivavimas

HUVEC, RPTEC/TERT1 bei HepG2 ląstelių kultūroms pasiekus apie 70–80 proc. paviršiaus ploto padengimą T-75 kultūrų flakonuose, ląstelės buvo perkeliamos į 6, 12, 24 arba 96 šulinėlių kultūrų plokšteles, priklausomai nuo eksperimento tipo, ir inkubuojamos įprastinėmis sąlygomis *Heracell VIOS 160i* ląstelių kultūrų inkubatoriuje. Ląstelių linijos nuo paviršiaus buvo atskiriamos fermentiniu būdu naudojant 0,05 proc. tripsino-EDTA tirpalą. Ląstelių koncentracija ir gyvybingumas buvo vertinami naudojant automatinį

Countess II FL ląstelių skaičiuotuvą, prieš persėjant jas į kultūrų plokšteles. Ląstelių proliferacija buvo stebima naudojant *EVOS XL Core* vaizdinimo sistemą. Ląstelės buvo periodiškai tiriamos dėl kontaminacijos mikoplazmosis naudojant *e-Myco Mycoplasma PCR Detection Kit* rinkinį. Visi eksperimentai su HUVEC ląstelėmis buvo atliekami naudojant 3–6 dalijimosi ciklo ląsteles. RPTEC/TERT1 ląstelės buvo naudojamos nuo 52-ojo dalijimosi ciklo, o HepG2 ląstelės – nuo 33-iojo dalijimosi ciklo.

2.4.2. Ląstelių kultūrų veikimas širdies ir kraujagyslių sistemą veikiančiais vaistais

I tyrimo etapo pradžioje buvo įvertintas dviejų kliniškai plačiai vartojamų vaistų, dažnai skiriamų IŠL sergantiems pacientams – antikoagulianto rivaroksabano ir antiagreganto tikagreloro – poveikis endotelio ir kepenų ląstelėms. Šie tyrimai leido nustatyti junginių pleotropinį poveikį, susijusį su RAS ašies komponentais ir optimizuoti tyrimo sąlygas tolesniems I etapo darbams. Tyrimai, atlikti su endotelio, inkstų ir kepenų ląstelėmis, buvo skirti sistemingai charakterizuoti RAS inhibitorių inicijuojamus specifinius molekulinis veikimo mechanizmus ir jų pleotropinius bei klinikinę reikšmę turintį poveikį, ypač aktualų pacientams, sergantiems IŠL.

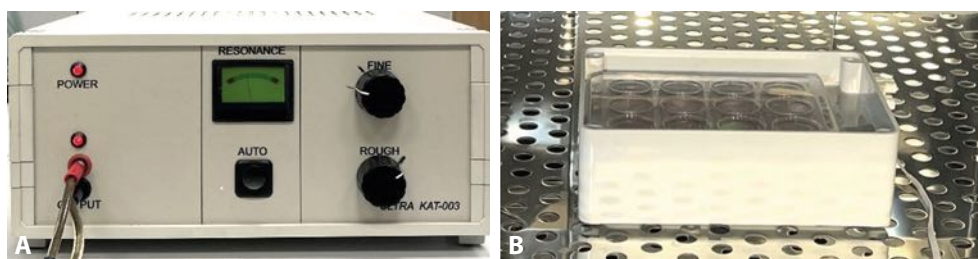
Rivaroksabano tirpalas buvo paruoštas ištirpinus vieną 20 mg *Xarelto* tabletę 9 mg/ml natrio chlorido tirpale su albuminu, palaikant 37 °C temperatūrą. Albumino tirpalas buvo paruoštas ištirpinus 100 mg galvijų serumo albumino (angl. *bovine serum albumin*, BSA) 900 µl natrio chlorido tirpalo. Vaisto ir albumino tirpalai buvo sumaišyti, atsižvelgiant į tai, kad rivaroksabano jungimasis prie serumo albumino yra 92–95 proc. Tiksliai paruošto pradinio rivaroksabano tirpalo koncentracija nustatyta naudojant efektyviosios skysčių chromatografijos ir tandeminės masių spektrometrijos sistemą, sudarytą iš *Waters Acquity H-Class* skysčių chromatografo ir trigubo kvadrupolio *Waters Xevo TQD* masių spektrometro, veikiančio neigiamos elektropurškimo jonizacijos režimu. HUVEC ląstelės buvo veikiamos 0,1–10 µmol/l (µM) rivaroksabano tirpalu ir inkubuotos 24 val.

Tikagreloro pradinis tirpalas buvo paruoštas ištirpinus 90 mg tikagreloro tabletę dvigubai distiliuotame vandenyje. Ištirpinto tikagreloro kiekybinė analizė buvo atlikta naudojant UPLC-QTOF-MS (angl. *Ultra-Performance Liquid Chromatography–Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry*) metodą. Skirtingų koncentracijų tikagreloro tirpalai (0,5, 1, 2, 3 ir 5 µM) buvo paruošti praskiedus apskaičiuotą pradinio tirpalo kiekį 0,9 proc. natrio chloridu. HUVEC ir HepG2 ląstelės 24 val. buvo inkubuojamos su 10 µl kiekvieno tikagreloro tirpalo – galutinės tikagreloro koncentracijos HUVEC ir HepG2 ląstelių terpėje atitinkamai siekė 2,5, 5, 10, 15 ir 25 nM.

Kaptoprilio pradinis tirpalas buvo paruoštas ištirpinus medžiagą PBS (pH 7,4). Losartano kalio druska ir MLN-4760 buvo ištirpinti DMSO. Galutiniai junginių tirpalai, kuriais buvo veikiamos ląstelių kultūros, paruošti atliekant skiedimus pilnos sudėties ląstelių kultūrų mitybine terpe. HUVEC, RPTEC/TERT1 ir HepG2 ląstelių linijos buvo paveiktos kaptoprilio galutinėmis koncentracijomis nuo 0,25 iki 2,25 μM , losartano – nuo 0,75 iki 2,75 μM , o MLN-4760 – nuo 0,05 iki 1 μM ląstelių mitybinėje terpėje. Kaptoprilio ir losartano koncentracijos buvo parinktos atsižvelgiant į jų terapines koncentracijas žmogaus plazmoje, pasiekiamas gydymo metu, siekiant užtikrinti, kad *in vitro* rezultatai būtų tinkamai interpretuojami klinikiniame kontekste [210–213]. MLN-4760 koncentracijų intervalas buvo pagrįstas ankstesniais tyrimais, kuriuose buvo nagrinėjamas šio junginio poveikis *in vitro*, ir pasirinktas detalesniam ACE2 inhibicijos bei su ja susijusių signalinių kelių poveikiui endotelio, inkstų bei kepenų ląstelėse tirti [214]. Ląstelių kultūros su nurodytais junginiais buvo inkubuojamos 24 val.

2.4.3. Ląstelių kultūrų sinerginis veikimas vaistais ir žemo dažnio ultragarsu

Nepatologines endotelio ir inkstų ląstelių linijas paveikus RAS inhibitoriais kaptoprilium ir losartanu, ląstelių kultūrų plokštelės netrukus buvo inkubuojamos specialiai sukurtame UG vonelės įrenginyje, pripildytame distiliuoto vandens (2.4.3.1 pav.). Šiame įrenginyje buvo taikomas 69 kHz dažnio ir žemo intensyvumo (5–10 mW/cm^2) UG 5 min. trukmės intervalu, siekiant nepakenkti ląstelių struktūrai. Tuomet ląstelės dar 24 val. buvo inkubuojamos ląstelių kultūrų inkubatoriuje įprastinėmis sąlygomis.



2.4.3.1 pav. Žemo dažnio UG įrenginys su vonele, pritaikyta ląstelių kultūrų plokštelėms

A – Ultragarso vonelės signalo valdiklis; B – Ultragarso vonelė su pjezoelementais, pripildyta distiliuotu vandeniu.

Ultragarsinei stimuliacijai buvo sukonstruota specialių matmenų vonelė su dviem disko formos bimorfinio tipo pjezoelektriniais keitikliais, pritvirtintais prie dugno, siekiant optimalaus energijos perdavimo į ląstelių kultūrų plokštelę (2.4.3.1 lentelė). Tokia konstrukcija buvo pasirinkta dėl trijų techninių privalumų: (1) bimorfinė struktūra, įtvirtinta kraštuose, generuoja didesnes virpesių amplitudes; (2) radialinio režimo virpesiai sudaro tolygesnį ir mažiau išsisklaidžiusį akustinį lauką; (3) aukštesniame UG dažnyje radialinio režimo virpesiai sukuria daugiau energijos. Pjezoelektriniams keitikliams valdyti buvo sukurtas specialus valdiklis, leidžiantis juos veikti rezonansiniu 69 kHz dažniu, nustatytu naudojant 3D lazerinį skenuojantį vibrometrą ir impedanso analizatorių. Tyrimai patvirtino, kad būtent šiame dažnyje pasiekiamos didžiausios virpesių amplitudės, todėl jis buvo pasirinktas tolesnei ląstelių kultūrų sonifikacijai.

2.4.3.1 lentelė. Žemo dažnio UG įrenginio charakteristikos

Dažnis	~69 kHz
Galia	40 W
Galios reguliavimas	40–100 proc.
Talpa	0,5 l
Vonelės dydis (mm)	120 × 80 × 10
Matmenys (mm)	130 × 90 × 60
Maitinimo šaltinis	220 V/50 Hz
Laikmatis	1–99 min.
Priedai	laikiklis

2.4.4. Ląstelių kultūrų metabolinio aktyvumo nustatymas

Ląstelių metabolinis aktyvumas buvo vertinamas taikant kolorimetrinį 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio bromido (MTT) redukcijos metodą [215]. Metaboliniu požiūriu aktyvių (gyvybingų) ląstelių mitochondrijų fermentai, NAD(P)H priklausomos oksidoreduktazės, redukuoja vandenyje tirpią geltonos spalvos MTT druską į netirpius violetinės spalvos formazano kristalus. Susidaręs formazano kiekis tiesiogiai koreliuoja su gyvų ląstelių skaičiumi bei jų metaboliniu aktyvumu. Į 96 šulinėlių plokšteles buvo sėjama po 2×10^4 HUVEC ar RPTEC/TERT1 ląstelių. Po 24 val. inkubacijos ląstelės buvo veikiamos RAS inhibitoriais ar šiais junginiais kartu su žemo dažnio UG. Po 24 val. inkubacijos buvo atliekamas MTT testas – į šulinėliuose esančią mitybinę terpę be serumo buvo pridedama 5 mg/ml MTT tirpalo ir inkubuojama 3,5 val. [216]. Tuomet susidarę formazano kristalai, naudojant plokštelių purtyklę, buvo 15 min. tirpinti DMSO. Optinis tankis

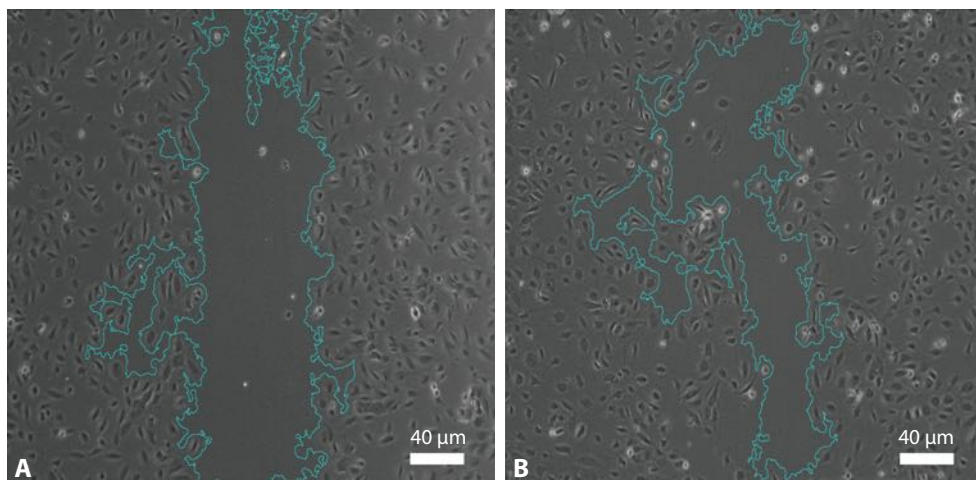
buvo matuojamas mikroplokštelių skaitytuvu, taikant 550 nm matavimo ir 620 nm referentinį šviesos bangos ilgį. Ląstelės, inkubuotos terpėje be tiriamųjų medžiagų, buvo naudojamos kaip kontrolinės (100 proc. gyvybingumas). Šulinėliai be ląstelių buvo naudojami foniniam optiniam tankiui nustatyti, kuris buvo atimtas iš visų matavimų. Kiekvienam tiriamojo junginio koncentracijos mėginiui, taip pat kontroliniams ir fono mėginiams buvo ruošiama po tris pakartotinius šulinėlius.

2.4.5. Ląstelių kultūrų proliferacijos ir ląstelių dydžio įvertinimas

HUVEC ląstelių kultūrų proliferacija buvo vertinta naudojant *Countess II FL* automatinį ląstelių skaičiuotuvą. Ląstelių skaičius nustatytas taikant dažo ekskliuzijos testą su tripano mėlynuoju. Metodo principas grindžiamas tuo, kad gyvų ląstelių plazminė membrana yra selektyviai pralaidi ir nepraleidžia dažų molekulių, todėl ląstelės išlieka nenusidažiusios. HUVEC ląstelės prieš RNR išskyrimą genų raiškos analizei buvo atskirtos nuo paviršiaus ir suskaičiuotos. Trumpai, ląstelių suspensijos dalis buvo praskiesta santykiu 1:1 (v/v) su 0,4 proc. tripano mėlynojo dažu ir įleista į *Countess* ląstelių skaičiavimo kamerą. Ląstelių skaičius buvo nustatomas pagal jų dažymosi ypatybes, atskiriant gyvas ir negyvas ląsteles. Ląstelių skaičiuotuvą taip pat pateikė gyvų ir negyvų ląstelių dydžio matmenis, išreikštus mikrometrais (μm).

2.4.6. Ląstelių kultūrų migracijos tyrimas „žaizdos gijimo“ metodu

Ląstelių migracijos tyrimui, pasitelkus „žaizdos gijimo“ modelį, HUVEC ląstelės buvo sėjamos 4×10^4 ląstelių/cm², o RPTEC/TERT1 – 6×10^4 ląstelių/cm² tankiu. Po 24 val. inkubacijos, kai susidarė vientisas ląstelių vienasluoksnis, jame buvo suformuotas 0,5 mm pločio įbrėžimas, imituojantis žaizdą [217]. Ląstelės šulinėliuose atsargiai praplautos PBS ir užpiltos serumo neturinčia mitybine terpe, papildyta RAS inhibitoriais. Ląstelės buvo veikiamos žemo dažnio UG, kaip aprašyta anksčiau. Ląstelių migracija į pažeistas vietas buvo fiksuota naudojant fazinio kontrasto mikroskopiją. Žaizdos srities vaizdai buvo užfiksuoti 0 ir 4 val. po įbrėžimo naudojant *EVOS XL Core* ląstelių vaizdinimo sistemą. Žaizdos ploto sumažėjimas buvo kiekybiškai įvertintas matuojant jos plotą kiekvienu laiko momentu *ImageJ v1.54d* programine įranga (2.4.6.1 pav.).



2.4.6.1 pav. Endotelio ląstelių žaizdos ploto įvertinimas po 4 val. inkubacijos

A – kontrolinės ląstelės (ląstelės inkubuotos auginimo terpėje be kaptoprilio); **B** – ląstelės, veiktos 1,75 μM kaptoprilu.

Žaizdos ploto sumažėjimo procentas buvo apskaičiuotas pagal pradinį žaizdos plotą, naudojant formulę:

$$\text{Žaizdos ploto sumažėjimas} = \frac{\text{Žaizdos plotas } t_0 \text{ laiku} - \text{žaizdos plotas } t_4 \text{ laiku}}{\text{Žaizdos plotas } t_0 \text{ laiku}} \times 100$$

2.4.7. Azoto oksido kiekio nustatymas

Bendras NO kiekis HUVEC ląstelių, paveiktų RAS inhibitoriais kartu su žemo dažnio UG, ląstelių kultūrų terpės supernatantuose buvo nustatytas vadovaujantis *Nitric Oxide Assay Kit* rinkinio gamintojo pateiktu protokolu. Šis tyrimo metodas leido aptikti ir kiekybiškai nustatyti nitritą (NO_2^-) ir nitratą (NO_3^-) – pagrindinius stabilius NO metabolitus. Rinkinyje naudojamas nitrato reduktazės fermentas, kuris katalizuoja nitrato virtimą nitritu. Tuomet nitritas nustatomas atliekant Griso (angl. *Griess*) reakciją, kurios metu susidaro spalvotas azo junginys. Reakcijos produktų optinis tankis buvo matuojamas esant 540 nm bangos ilgiui naudojant mikroplokštelių skaitytuvą. Nitrito ir nitrato koncentracijos buvo apskaičiuotos pagal standartines kalibracijos kreives, sudarytas naudojant žinomų koncentracijų standartus. Bendras NO kiekis mėginyje buvo apskaičiuotas sumuojant nustatytas nitrito ir nitrato koncentracijas. Teigiamai NO sintezės kontrolei HUVEC ląstelės buvo paveiktos acetilcholinu (10 μM). Pagal gamintojo pateiktus duomenis, metodo pakartojamumas yra aukštas – vidinis tyrimo (angl. *intra-assay*)

kintamumas neviršija 1,7 proc. (vidutinė variacijos koeficiento proc. reikšmė), o tarp tyrimų (angl. *inter-assay*) kintamumas neviršija 4 proc. tiek nitrito, tiek nitrato koncentracijos matavimuose, užtikrinant rezultato patikimumą.

2.4.8. Aktyvių deguonies junginių nustatymas

ADJ susidarymas RPTEC/TERT1 ląstelėse, paveiktose RAS inhibitoriais kartu su žemo dažnio UG, buvo nustatytas *ROS/Superoxide Detection Assay Kit* rinkiniu, vadovaujantis gamintojo pateiktomis instrukcijomis. Į 96-šulinėlių juodas polistirenines plokšteles buvo sėjama po 2×10^4 RPTEC/TERT1 ląstelių. Po 24 val. inkubacijos ląstelės paveiktos kaptoprilu, losartanu bei MLN-4760 kartu su žemo dažnio UG. Junginiais ląstelės buvo veikiamos 1 val., vėliau atliktas indukcijos etapas su oksidacinio streso nustatymo reagentu. Po 1 val. inkubacijos fluorescencijos intensyvumas buvo matuojamas mikroplokštelių skaitytuvu, taikant standartinius fluoresceino filtro parametrus (žadinimo bangos ilgis – 488 nm, emisijos – 520 nm) galutinio matavimo (angl. *endpoint*) režimu. Kiekvieno tyrimo metu buvo įtrauktos kontrolės: teigiama kontrolė (ADJ induktorius piocianinas, 25 μ M), neigiama kontrolė (ADJ inhibitorius N-acetil-L-cisteinas, 5 mM), kontroliniai mėginiai (ląstelės su tirpikliu dimetilformamidu), kontroliniai mėginiai autofluorescencijos matavimui (ląstelės su mitybine terpe) bei fono kontrolės šulinėliai (tik su oksidacinio streso nustatymo reagentu). Kontroliniai mėginiai rodė tik žemus autofluorescencijos signalus. Ląstelės, veiktos ADJ inhibitoriumi (N-acetil-L-cisteinu), taip pat pasižymėjo mažu fluorescencijos intensyvumu. Santykinis fluorescencijos intensyvumas kiekvienam RPTEC/TERT1 ląstelių poveikio variantui buvo normalizuotas pagal atitinkamus eksperimento kontrolės mėginius.

2.4.9. Genų raiškos tyrimas

RNR išskyrimas ir kopijinės DNR sintezė

Visuminė RNR iš HUVEC, RPTEC/TERT1 ir HepG2 ląstelių buvo išskirta naudojant *PureLink RNA Mini Kit* rinkinį kartu su *TRIzol* reagentu [218], vadovaujantis gamintojo pateiktomis rekomendacijomis. Rinkinio veikimo principas grindžiamas organiniu išskyrimu ir vėlesniu visuminės RNR imobilizavimu ant silicio pagrindo membranos. Išgrynintos RNR koncentracija ir grynumas nustatyti naudojant bekiuvetį spektrofotometrą *NanoDrop 2000*, matuojant UV spinduliuotės absorbciją ties 260 nm bangos ilgiu (A260) bei absorbcijos santykius (A260/A280; A260/A230). Genominė DNR buvo pilnai pašalinta išgrynintą RNR paveikus deoksiribonukleaze I (DNaze I). Iki 0,5 μ g RNR buvo paveikta 1 vieneto (U)/ μ l koncentracijos

DNazės I tirpalu. Mėginiai atitiko tikro laiko polimerazės grandinės reakcijos (PGR) tyrimui rekomenduojamą kokybę [219]. Santykinei genų raiškai nustatyti buvo atlikta atsitiktinių heksamerinių pradmenų (angl. *random hexamer primers*) inicijuota atvirkštinė transkripcija naudojant *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor* rinkinį, reakcijai naudojant 0,5 µg RNR. Paruošti mėginiai perkelti į *Tprofessional* termociklerį, kuriame reakcija buvo vykdoma pagal šią programą: 10 min. esant 25 °C temperatūrai, 2 val. esant 37 °C ir 5 min. esant 85 °C.

Kiekybinis tikro laiko polimerazės grandinės reakcijos tyrimas

Genų raiškos kiekybiniai tikro laiko polimerazės grandinės reakcijos (PGR) tyrimai buvo atlikti vadovaujantis MIQE gairėmis [220]. Reakcijos buvo vykdomos *MicroAmp Optical 96* šulinėlių plokštelėse naudojant *QuantStudio 5* tikro laiko PGR sistemą. Reakcijos buvo atliekamos 10 µl bendrame tūryje, sudarytame iš 5 µl 2× *Power SYBR Green PCR Master Mix*, 2,5 µl PGR grynumo vandens, 250 nM (galutinė koncentracija) kiekvieno pradmens ir 10 ng kopijinės DNR (kDNR). Santykinės genų raiškos tyrimams naudotų pradmenų sekos pateiktos 2.4.9.1 lentelėje. Tikro laiko PGR buvo vykdomos termociklyje pagal šiuos temperatūros parametrus: 95 °C 10 min., 40 ciklų po 95 °C 15 s, 60,6 °C 30 s ir 72 °C 1 min. Reakcijos pabaigoje buvo atlikta lydimosi kreivės analizė. Tyrimai buvo atlikti mėginius kartojant tris kartus pagal gamintojo rekomendacijas, apskaičiuojant C_T (angl. *threshold cycle*) reikšmių vidurkius. Tikro laiko PGR metodika buvo patvirtinta tiek *in silico*, tiek eksperimentiniu būdu, įvertinant pradmenų specifiškumą ir efektyvumą. Pradmenų specifiškumas ir tinkamumas buvo tikrinamas naudojant *Primer-BLAST* ir *UCSC In-Silico PCR* įrankius, atsižvelgiant į pradmenų ilgį, lydimosi temperatūrą bei GC nukleotidų kiekį. Atrinktos pradmenų poros buvo papildomai įvertintos naudojant *OligoAnalyzer* įrankį, siekiant įvertinti galimų antrinių struktūrų, homodimerų ar heterodimerų susidarymo riziką. Normalizuota santykinė tiriamų genų raiška buvo apskaičiuota taikant $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodą [221]. Genų raiškos normalizavimui buvo naudojamas stabilus referentinis (angl. *housekeeping gene*) transferino receptoriaus (TFRC) genas. *TFRC* pasižymėjo amplifikacijos efektyvumu (E) artimu 100 proc., nustatytas platus linijinis dinaminis intervalas (angl. *linear dynamic range*) ir aukšta tiesiškumo koreliacija ($R^2 \geq 0,99$), tiriant eksperimentinių sąlygų kDNR mėginius. Santykinės genų raiškos rezultatai pateikti kaip ΔC_T ($\Delta C_T = C_T \text{ tiriamojo geno} - C_T \text{ referentinio geno}$) ir kaip pokytis kartais (PK, angl. *fold change*, FC), apskaičiuotas – $PK = 2^{-\Delta\Delta C_t}$.

2.4.9.1 lentelė. PGR pradmenys, naudoti genų raiškos kiekybiniam įvertinimui

Genas	NCBI prieiga	Pavadinimas	Pradmuo	Pradmens seka (5'-3')
<i>ACE</i>	NM_000789.4	Angiotenziną konvertuojantis fermentas	Tiesioginis	5'-CCTGGGACTTCTACAACGGCAA-3'
			Atvirkštinis	5'-AGACACTGAGAGGGCTAGCACG-3'
<i>ACE2</i>	NM_001371415.1	Angiotenziną konvertuojantis fermentas 2	Tiesioginis	5'-TGGGTCTTCAGTGTCTCTCAG-3'
			Atvirkštinis	5'-AGCATCTTGTGGATTATCTGGGT-3'
<i>VCAM-1</i>	NM_001078.4	Kraujagyslių ląstelių adhezijos molekulė 1	Tiesioginis	5'-AGGTGGAGATCTACTCTTTTCCT-3'
			Atvirkštinis	5'-ACACTTGACTGTGATCGGCT-3'
<i>ICAM-1</i>	NM_000201.3	Tarpląstelinė adhezijos molekulė 1	Tiesioginis	5'-GGTGTGGTGAGGAGAGATCA-3'
			Atvirkštinis	5'-AGTCGCTGGCAGGACAAAGG-3'
<i>PTGS1</i>	NM_000962.4	Prostaglandino-endoperoksido sintazė 1	Tiesioginis	5'-CTGTTGGATGCCTTCTCTCG-3'
			Atvirkštinis	5'-CATCTCCCCGAGACTCCCTGA-3'
<i>PTGS2</i>	NM_000963.4	Prostaglandino-endoperoksido sintazė 2	Tiesioginis	5'-CGGTGAAACTCTGGCTAGACAG-3'
			Atvirkštinis	5'-GCAAAACCGTAGATGCTCAGGGA-3'
<i>CYP4F2</i>	NM_001082.5	Citochromo P450 4 šeimos F pošeimio 2 polipeptidas	Tiesioginis	5'-GACAGCCATTGTCAGGAGAAACC-3'
			Atvirkštinis	5'-TGCAGGAGGATCTCATGGTGTCTC-3'
<i>CYP4A11</i>	NM_000778.4	Citochromo P450 4 šeimos A pošeimio 11 polipeptidas	Tiesioginis	5'-CTCAACACAGCCACGCTTTC-3'
			Atvirkštinis	5'-ACAAAGTCGTGCAATGGGGAT-3'
<i>GPR75</i>	NM_006794.4	G baltymą jungiantis receptoriaus 75	Tiesioginis	5'-GCCACCCGGCAGGCTTATCT-3'
			Atvirkštinis	5'-TTCGGAGAGAAATGTCTCCTTC-3'
<i>TFRC</i>	NM_003234.4	Transferino receptoriaus	Tiesioginis	5'-ACTTGCCACAGATGTTCTCAGAT-3'
			Atvirkštinis	5'-CGAAAGGTATCCCCTCTAGCCAT-3'

2.4.10. CYP4F2 nustatymas

CYP4F2 baltymo koncentracija HUVEC ląstelių, veikėtų rivaroksabanu ir tikagreloru, lizatuose buvo nustatyta naudojant komercinį „sumuštinio“ tipo imunofermentinės analizės (ELISA) CYP4F2 rinkinį. HUVEC ląstelių lizatai po ląstelių atskyrimo buvo ruošti ląsteles suspenduojant šaltame PBS (4 °C) ir centrifuguojant 5 min. 1500 × g greičiu. Vėliau ląstelės buvo resuspenduotos 300 µl lizės buferio, 10 min. inkubuotos ant ledo, 10 min. centrifuguotos 10000 × g greičiu 4 °C temperatūroje, o surinkti supernatantai užšaldyti –80 °C temperatūroje iki tolesnės analizės. ELISA analizė buvo atlikta pagal gamintojo pateiktą protokolą (SEL399Hu). CYP4F2 koncentracija buvo nustatyta matuojant optinį tankį 450 nm bangos ilgyje, naudojant mikroplokštelių skaitytuvą. CYP4F2 koncentracijos mėginiuose buvo apskaičiuotos pagal standartinės kreivės duomenis.

2.4.11. Eikozanoidų išskyrimas ir 20-HETE nustatymas

20-hidroksieikozatetraeno rūgšties (20-HETE) išskyrimas iš HUVEC kultūrų mitybinės terpės buvo atliktas taikant skysčių-skysčių ekstrakcijos metodą, pritaikytą mažo tūrio biologiniams mėginiams. Tyrimui naudotos HUVEC ląstelių, 24 val. veikėtų RAS inhibitoriais, mitybinės terpės. Siekiant pašalinti ląsteles bei jų fragmentus, terpės 20 min. centrifuguotos 2500 × g greičiu 4 °C temperatūroje. Po centrifugavimo gautas supernatantas, kuriame yra ląstelių išskirti metabolitai, įskaitant 20-HETE, buvo atskirtas nuo nuosėdų ir panaudotas tolesnei eikozanoidų ekstrakcijai. Ekstrakcijos metu mėginiai buvo stabilizuoti butilintu hidroksitoluenu (10 mg/ml), apsaugančiu nuo lipidų oksidacijos, ir parūgštinti acto rūgštimi (≥ 99,5 proc.) iki pH 4. Eikozanoidų frakcijos buvo ekstrahuotos etilacetatu santykiu 1:1 (v/v). Mėginiai maišyti purtyklėje ir centrifuguoti 20 min. 2500 × g greičiu kambario temperatūroje. Po centrifugavimo viršutinė organinė fazė buvo atskirta, surinkta ir išgarinta azoto srove *Multivap* garinimo įrenginiu, palaikant 40 °C temperatūrą iki visiško tirpiklio pašalinimo. Gauti sausi ekstraktai buvo ištirpinti 20 µl 96 proc. etanolio ir praskiesti 130 µl 1 × mėginių skiedimo buferiu, kad būtų gauta tinkama koncentracija tolesnei imunofermentinei analizei (ELISA). Paruošti mėginiai buvo laikomi –80 °C temperatūroje iki analizės, atliktos per 24 val.

20-HETE kiekis HUVEC kultūrų terpės ekstraktuose buvo nustatytas naudojant *Detroit R&D* konkurencinio tipo *in vitro* 20-HETE ELISA rinkinį, laikantis gamintojo protokolo. Šis metodas pagrįstas 20-HETE ir fermentiškai (krienų peroksidaze) konjuguoto analogo konkurencija dėl prisijungimo prie specifinio antikūno. Po inkubacijos ir plovimo etapų pridėtas substratas, kurio optinis tankis buvo matuojamas 450 nm bangos ilgyje naudojant mikro-

plokštelių skaitytuvą ir buvo atvirkščiai proporcingas mėginyje esančiai 20-HETE koncentracijai. Gautų rezultatų analizė atlikta pagal standartinės kreivės duomenis, leidžiančius kiekybiškai įvertinti 20-HETE koncentraciją.

2.4.12. GPR75 vertinimas netiesioginės imunofluorescencijos metodu

Ląstelių kultūros buvo dažomos netiesioginės imunofluorescencijos metodu, siekiant nustatyti GPR75 baltymo lokalizaciją ir raišką. Ląstelės buvo auginamos ant 13 mm skersmens stiklelių, patalpintų ląstelių kultūrų plokštelės šulinėliuose. Prieš dažymą iš šulinėlių buvo pašalinta terpė, o ląstelės tris kartus praplautos kambario temperatūros PBS. Ląstelės fiksuotos 4 proc. paraformaldehydu 10 min. kambario temperatūroje, po to tris kartus praplautos PBS, švelniai vartant plokštelę. Permeabilizacija atlikta inkubuojant ląsteles 0,2 proc. Triton X-100/PBS tirpale 10 min. kambario temperatūroje, po to ląstelės praplautos PBS. Nespecifiniam antikūnų prisijungimui blokuoti ląstelės inkubuotos 1 proc. BSA tirpale 45 min. kambario temperatūroje. Po blokavimo ląstelės inkubuotos su pirminiu anti-GPR75 antikūnu (10 µg/ml) 20 val. 4 °C temperatūroje. Po inkubacijos ląstelės tris kartus praplautos PBS. Rodaminu žymėti antriniai anti-IgG antikūnai (2 µg/ml) buvo inkubuojami 1 val. kambario temperatūroje tamsoje. Po inkubacijos ląstelės tris kartus plautos PBS tamsoje. Branduolio DNR vizualizuoti buvo naudojamas DAPI tirpalas (1 µg/ml), inkubuojant 10 min. kambario temperatūroje, po to ląstelės dar kartą praplautos PBS. Preparatai paruošti fluorescencinei mikroskopijai naudojant *ProLong™ Glass Antifade Mountant* terpę: terpė užlašinta ant objektinio stiklelio, o stiklelis su nudažytomis ląstelėmis apvertus uždėtas ant terpės. Paruošti preparatai buvo analizuojami *EVOS M7000* fluorescenciniu mikroskopu, o stikleliai laikyti 4 °C temperatūroje tamsoje.

2.5. Tyrimo metodai su žmonių biologine medžiaga

2.5.1. Tiriamųjų pacientų grupės

Tyrimai buvo atlikti su 122 ligoniais, sergančiais IŠL, kurie buvo hospitalizuoti Kauno klinikų Kardiologijos klinikoje nuo 2021 iki 2024 m. Ligoniai buvo suskirstyti į dvi grupes pagal Lietuvoje taikomas Europos kardiologų draugijos (angl. *European Society of Cardiology*, ESC) gaires. Grupės sudarytos atsižvelgiant į klinikinę ligos išraišką (stabilią IŠL ir ūmų koronarinį sindromą (ŪKS)). Tiriamiesiems buvo vertinami VA pažeidimo požymiai, kurie nustatyti atliekant VA angiografijos (VAA) bei VA daugia-

sluoksnės kompiuterinės tomografijos angiografijos (VA DKTA) tyrimus [222].

I grupę sudarė sergantys stabilia krūtinės angina (SKA) ($n = 30$; 17,0 proc. imties). II grupę sudarė sergantys ŪKS (miokardo infarktu arba nestabilia krūtinės angina) ($n = 92$; 52,3 proc. imties).

Į I grupę įtraukti ligoniai, kuriems būdingi fizinio krūvio sukelti krūtinės anginos simptomai, nekintantys ≥ 6 savaites. Ligoniai neturėjo klinikinių, elektrokardiografinių ar biocheminių ŪKS požymių. Diagnostika atlikta įvertinus kardiologo apžiūros ir VAA tyrimo duomenis, nustatant VA pažeidimo požymius. Šioje grupėje taip pat buvo pacientų, kuriems nustatyta lėtinė VA okliuzija (angl. *chronic total occlusion*, CTO) ir aukštos rizikos aterosklerozinės plokštelės (angl. *high-risk plaque*, HRP). Lėtinė VA okliuzija, diagnozuota pagal VAA duomenis, taikant tarptautinį CTO apibrėžimą – > 3 mėn. trunkanti visiška (100 proc.) VA okliuzija, kai nėra antegradinės distalinės kraujotakos (TIMI kriterijus 0 (angl. *Thrombolysis in Myocardial Infarction*)). Į šią grupę priskirti pacientai, kuriems nustatyta izoliuota CTO arba CTO kartu su kitomis epikardinėmis stenozėmis ir klinikinė būklė atitiko SKA kriterijus. Ligoniai, kuriems nustatytos aukštos rizikos aterosklerozinės plokštelės, priskirti pagal VA DKTA radinius, atitinkančius HRP kriterijus [222, 223]. HRP buvo apibrėžta, jei nustatyta bent viena iš šių savybių:

- 1) hipodensinė plokštelė ($HU < 50$ (Hounsfieldo vienetai)), rodanti lipidinę nekrozinę šerdį,
- 2) teigiama remodeliacija, kai remodeliacijos indeksas $> 1,1$,
- 3) taškinė kalcifikacija (angl. *spotty calcification*),
- 4) „servetėlės“ arba „žiedo“ požymis (angl. *napkin-ring sign*), kai mažo tankio plokštelės centrinę dalį supa didesnio tankio žiedas.

II grupei buvo priskirti ŪKS ligoniai, hospitalizuoti dėl ūminio miokardo infarkto (STEMI arba NSTEMI) arba nestabilios krūtinės anginos, vadovaujantis ESC gairėmis [224, 225]. Visiems ligoniams buvo atlikta perkutaninė VA intervencija (angl. *percutaneous coronary intervention*, PCI) ir VA stento implantacija. Pacientams buvo skiriama DAPT – tikagreloro arba klopidoogrelio derinys kartu su aspirinu. Pacientams, atsižvelgiant į klinikines indikacijas, taip pat buvo skiriami statinai (atorvastatinas, rozuvastatinas, simvastatinas), AKFi (arba ARB) ir β -adrenoblokatoriai.

Atmetimo kriterijai. Į tyrimą nebuvo įtraukti pacientai, turintys veiksnius, galinčius reikšmingai padidinti kraujo krešėjimo aktyvumą, įskaitant piktybinius navikus ar sisteminės uždegimines ligas (C reaktyviojo baltymo koncentracija > 100 mg/l), taip pat pacientai, kuriems neseniai buvo skirta antibiotikų terapija infekcijoms gydyti, nustatytas inkstų funkcijos nepakankamumas, hipotirozė, hipovolemija arba tie, kurie atsisakė dalyvauti tyrime.

Visi klinikiniai, laboratoriniai ir instrumentiniai duomenys buvo surinkti iš pacientų medicininių įrašų. Veninio kraujo mėginiai biocheminiams ir trombocitų funkcijos tyrimams buvo paimti laikantis standartizuoto protokolo. ŪKS sergantiems pacientams kraujo mėginiai buvo paimti praėjus maždaug 24 val. po pradinės antiagregantų dozės skyrimo. SKA sergantiems pacientams kraujo mėginiai buvo paimti planinio klinikinio ištyrimo metu.

2.5.2. Palyginamoji grupė

Palyginamoji grupė buvo atrinkta iš tarptautinio *International Health, Alcohol and Psychosocial Factors in Eastern Europe* (HAPIEE) tyrimo Kauno kohortos. Klinikinė ir demografinė informacija gauta iš pradinės Kauno HAPIEE duomenų bazės, sudarytos 2006–2008 m. Buvo atrinkti 69 tyrimo dalyviai, nesirgę IŠL, cukriniu diabetu ir neturėję metabolinių sutrikimų.

Stebėjimo laikotarpiu, 2008–2024 m., 15 asmenų iš pradinės palyginamosios grupės mirė, todėl nebuvo toliau tiriami. Dokumentuotos mirties priežastys buvo: 1 asmuo mirė dėl COVID-19 komplikacijų, 3 – cerebrovaskulinės išemijos, 1 – hipertenzijos komplikacijų, 1 – lėtinės obstrukcinės plaučių ligos (LOPL), 1 – plautinės širdies ligos, 1 – tulžies akmenligės, 2 – skirtingų onkologinių ligų, 1 – sepsio, 1 – kraujagyslinės demencijos.

Atmetus stebėjimo laikotarpiu mirusius asmenis, galutinę palyginamąją grupę sudarė 54 asmenys (30,7 proc. imties), kurių klinikiniai duomenys ir saugoti kraujo plazmos mėginiai buvo prieinami biožymenų analizei. Šie asmenys anamnezėje ir iki 2024 m. neturėjo išeminės ligos įvykių. Palyginamosios grupės tiriamųjų asmenų amžius – jų įtraukimo į HAPIEE tyrimą metu. Į šią grupę įtraukti asmenys buvo vyresnio amžiaus, siekiant įvertinti, kurie veiksniai gali būti reikšmingi IŠL vystymuisi, atsižvelgiant į skirtingus išeminio pažeidimo etapus. Plazmos mėginiai iki biožymenų analizės laikyti –80 °C temperatūroje.

2.5.3. Genominės DNR išskyrimas ir genų variantų tyrimas tikro laiko polimerazės grandininės reakcijos metodu

Veninio kraujo mėginiai buvo surinkti į vakuuminius mėgintuvėlius su K₂EDTA. Genominė DNR išskirta iš leukocitų taikant išdruskinimo metodą arba naudojant *Genomic DNA Purification Kit* pagal gamintojo rekomendacijas.

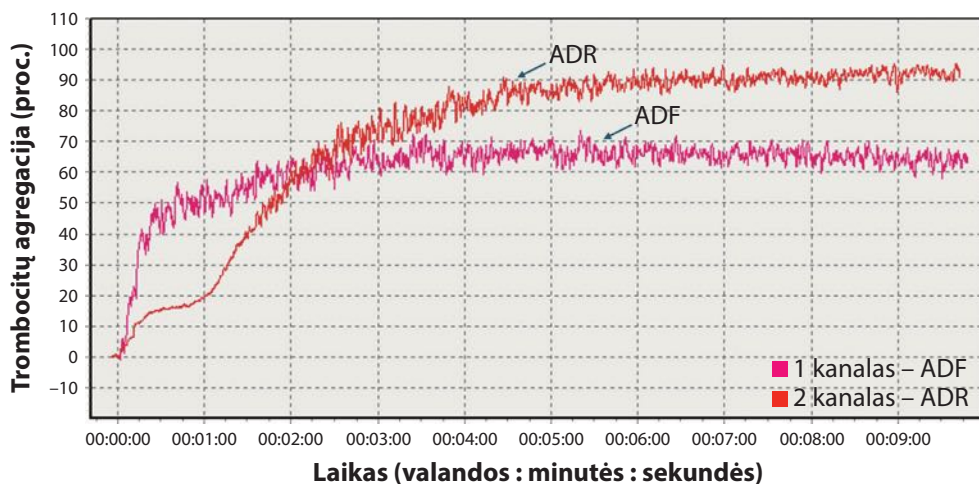
Tiriamųjų *CYP4F2* geno variantų (rs2108622, rs1558139, rs3093135 ir rs2074902) nustatymas atliktas tikro laiko PGR metodu, naudojant *TaqMan*TM *SNP Genotyping Assays* rinkinius. Rinkinius sudarė du aleliams specifiniai fluorescenciškai žymėti *TaqMan*[®] molekuliniai hidrolizės žymenys ir prad-

menys, amplifikuojantys tiriamą geno polimorfizmo sritį. Pagal gamintojo rekomendacijas standartinę PGR reakciją sudarė *TaqMan® Universal Master Mix II* mišinys, *TaqMan™ SNP Genotyping Assay* reagentas, PGR grynumo vanduo ir 1 µl genominės DNR (10 ng reakcijai).

PGR reakcijos mišinys buvo paskirstomas į 96 šulinėlių plokšteles. Siekiant užtikrinti genotipavimo tikslumą ir rezultatų patikimumą, kiekvienos reakcijų serijos metu buvo įtraukiami žinomų genotipų kontroliniai mėginiai bei neigiama kontrolė be šablono (angl. *no template control*, NTC). PGR amplifikacijos temperatūros režimas: 95 °C – 10 min., 95 °C – 15 s, 60 °C – 90 s. Pastarieji du etapai kartoti 40 ciklų. Amplifikacija ir fluorescencijos signalų registravimas atlikti naudojant *QuantStudio™ 5* tikro laiko PGR sistemą.

2.5.4. Trombocitų agregacijos tyrimas

Trombocitų agregacijos tyrimas buvo atliktas taikant klasikinį Borno metodą, kuris leidžia įvertinti kraujo krešėjimo dinamiką, naudojant trombocitų agregometrą *Platelet Aggregometer TA-8V*. Veninis kraujas buvo paimamas į specialius vakuuminius mėgintuvėlius su 3,2 proc. natrio citrato tirpalu. Kraujo mėginiai buvo tiriami per 1 val. nuo paėmimo. Prieš agregacijos tyrimą kraujo mėginiai buvo centrifuguoti, siekiant gauti dvi plazmos frakcijas: trombocitų turinčią plazmą (angl. *platelet-rich plasma*, PRP) ir trombocitų neturinčią plazmą (angl. *platelet-poor plasma*, PPP). Trombocitų turinti plazma buvo naudojama agregacijos reakcijoms indukuoti ir tirti, o trombocitų neturinti plazma – kaip referentinis mėginys, skirtas pradiniam šviesos pralaidumui kalibruoti bei rezultatams normalizuoti. Toliau trombocitų turintys plazmos mėginiai buvo veikiami adenoizino difosfatu (ADF) ir epinefrinu (adrenalinu, ADR), kurie buvo naudojami kaip trombocitų agregaciją indukuojantys reagentai. Šie induktoriai atlieka esminį vaidmenį aktyvuojant trombocitus ir skatindami jų agregaciją, imituojančią fiziologinį krešulio formavimosi procesą. Agregometre trombocitų agregacijos procesas (šviesos pralaidumo pokyčiai) buvo fiksuojamas 10 min. (2.5.4.1 pav.). Trombocitams susijungiant į agregatus, šviesos pralaidumas didėjo.



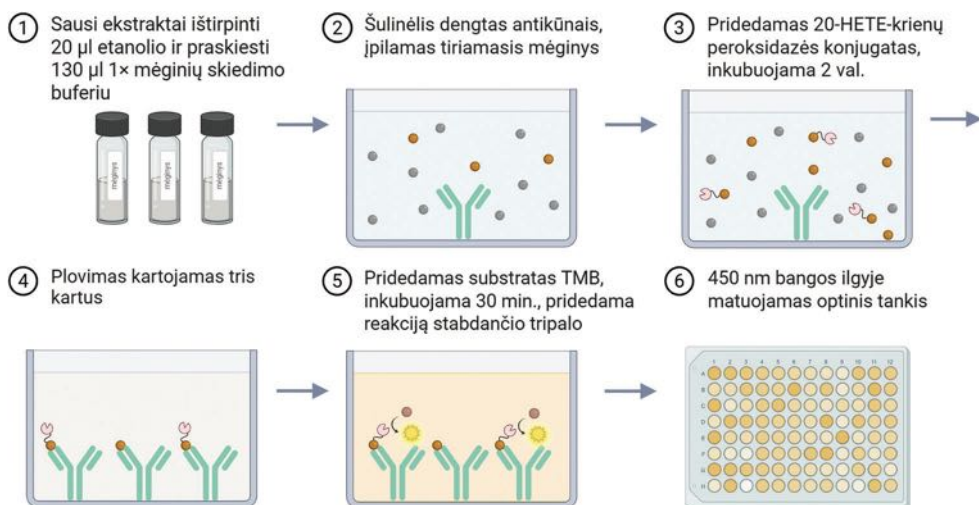
2.5.4.1 pav. Kraujo plazmos trombocitų agregacija indukuota ADF ir ADR

2.5.5. Eikozanoidų išskyrimas iš kraujo plazmos mėginių

176 tiriamiesiems 20-HETE buvo išskirta ir išgryninta taikant skysčių-skysčių ekstrakcijos metodą iš kraujo plazmos mėginių. Mėginiai buvo paveikti antioksidantu butilintu hidroksitoluenu (10 mg/ml) ir parūgštinti acto rūgštimi ($\geq 99,5$ proc.) iki pH 4. Eikozanoidai buvo ekstrahuoti etilacetatu santykiu 1:1 (v/v). Mėginiai intensyviai 2 min. maišyti purtyklėje ir centrifuguoti 20 min. $2500 \times g$ greičiu kambario temperatūroje. Po centrifugavimo išsiskyrė trys fazės, iš kurių viršutinė organinė fazė buvo surinkta ir išgarinta azoto srove kaitinant 40°C temperatūroje *Multivap* azoto garinimo įrenginiu iki sausų ekstraktų. Prieš atliekant imunofermentinę analizę (ELISA tyrimą), gauti sausi ekstraktai ištirpinti 20 μl etanolio (96 proc.) ir praskiesti 130 μl $1\times$ mėginių skiedimo buferiu.

2.5.6. 20-HETE nustatymas ELISA metodu

20-HETE kiekybinė analizė eikozanoidų ekstraktuose iš kraujo plazmos mėginių buvo atlikta naudojant *Detroit R&D* konkurencinio tipo *in vitro* 20-HETE ELISA rinkinį, laikantis gamintojo nurodymų. Tyrimo eiga pavaizduota 2.5.6.1 pav. Gamintojo duomenimis, reikšmingo kryžminio reaktyvumo ar sąveikos tarp 20-HETE ir struktūriškai giminingų arachidono, linolo bei linoleno rūgščių nenustatyta. Nustatyta mažiausia aptinkama 20-HETE koncentracija yra 10 pg/ml. Optinis tankis buvo matuojamas mikroplokštelių skaitytuvu, taikant 450 nm bangos ilgį.



2.5.6.1 pav. 20-HETE ELISA tyrimo eiga

2.5.7. ACE2 nustatymas ELISA metodu

176 tiriamiesiems ACE2 koncentracija kraujo plazmoje buvo nustatyta naudojant „sumuštinio“ tipo ACE2 ELISA rinkinį. 96 šulinėlių mikroplokštelės buvo padengtos žmogaus ACE2 atpažįstančiu polikloniniu antikūnu. Į šulinėlius buvo pridedami žinomos koncentracijos standartai ir mėginiai. Po šulinėlių plovimo ACE2 buvo atpažintas biotinu konjuguotu monokloniniu antikūnu prieš ACE2. Po perteklinio antikūno pašalinimo buvo pridėtas streptavidino ir krienų peroksidazės (STREP-HRP) kompleksas. Fermento-substrato reakcijoje buvo naudotas substratas 3,3',5,5'-tetrametilbenzidinas (TMB), kurio spalvos intensyvumas, išmatuotas 450 nm bangos ilgyje mikroplokštelių skaitytuvu, buvo tiesiogiai proporcingas ACE2 koncentracijai mėginyje.

2.6. Statistinė duomenų analizė

Statistinė duomenų analizė buvo atlikta naudojant programinę įrangą *GraphPad Prism v.8* bei *IBM SPSS Statistics v.27.0*. Rezultatams grafiškai pateikti buvo naudoti *GraphPad Prism v.8* ir *Microsoft Office LTSC Professional Plus 2024* programiniai paketai.

Atliekant eksperimentus su HUVEC, RPTEC/TERT1 ir HepG2 ląstelių linijomis, kiekvienam tiriamajam poveikiui atlikta ne mažiau kaip 4 nepriklausomi eksperimentai. Duomenų pasiskirstymas vertintas taikant Šapiro–Vilko (angl. *Shapiro–Wilk*) normalumo testą. Kadangi duomenys neatitiko normaliojo skirstinio, skirtumams tarp dviejų nepriklausomų grupių vertinti

taikytas neparametrinis Mano–Vitnio (angl. *Mann–Whitney U*) kriterijus. Kiekybiniai duomenys pateikiami kaip mediana (mažiausia–didžiausia reikšmė). Skirtumai laikyti statistiškai reikšmingais, kai $p < 0,05$.

Tiriamųjų imties analizėje kategorinių klinikinių charakteristikų pasiskirstymui tarp grupių vertinti taikytas Fišerio–Frimeno–Haltono (angl. *Fisher–Freeman–Halton*) testas, o kiekybinių kintamųjų palyginimui – Kruskalo–Voliso (angl. *Kruskal–Wallis*) testas. Tarpgrupiniams skirtumams įvertinti atlikta porinė *post hoc* analizė, taikant Mann–Whitney U testą su Bonferroni korekcija. Genotipų pasiskirstymo atitiktis Hardy–Weinberg pusiausvyrai vertinta taikant χ^2 testą. Ryšiams tarp biožymenų ir klinikinių parametrų nustatyti taikyta Spirmeno (angl. *Spearman*) ranginė koreliacija. Vienaveiksni logistinė regresija taikyta siekiant įvertinti demografinių, klinikinių ir biocheminių kintamųjų ryšį su ŪKS pasireiškimo tikimybe, apskaičiuojant galimybių santykius (GS) ir 95 proc. pasikliautinuosius intervalus (PI). Modelio tinkamumas vertintas taikant Hosmerio–Lemešou (angl. *Hosmer–Lemeshow*) kriterijų ir Nagelkerke R^2 koeficientą. Daugiaveiksnei logistinei regresijai į modelį įtraukti kintamieji, atrinkti pagal vienaveiksnės analizės rezultatus. Prieš sudarant modelį įvertintas nepriklausomųjų kintamųjų multikolinearumas, naudojant tolerancijos ir VIF (angl. *variance inflation factor*) rodiklius. Biožymenų diagnostinei ir prognozei vertei įvertinti taikyta ROC (angl. *receiver operating characteristic*) kreivės analizė. Apskaičiuotas plotas po kreive (AUC) su 95 proc. PI, o optimali ribinė vertė nustatyta pagal Youden indeksą ($J = \text{jautrumas} + \text{specifiškumas} - 1$).

3. REZULTATAI

3.1. *In vitro* tyrimų su ląstelių kultūromis rezultatai

3.1.1. *CYP4F2* raiškos pokyčių vertinimas endotelio ir kepenų ląstelėse

Pradiniame *in vitro* tyrimų etape, naudojant HUVEC ląsteles, buvo vertinamas nuo rivaroksabano ir tikagreloro koncentracijos priklausomas poveikis *CYP4F2* raiškai ląstelių kultūrose.

Rivaroksabano poveikis

Norint nustatyti rivaroksabano poveikį HUVEC ląstelėms ir įvertinti jo galimas sąsajas su kraujagyslių uždegiminiais procesais, ląstelės buvo paveiktos 0,1–10 μM rivaroksabano koncentracijomis. *CYP4F2* mRNR raiškos pokyčiai, išreikšti kaip ΔC_T reikšmės bei santykinis pokytis kartais (PK), pateikti 3.1.1.1 lentelėje. Rezultatai parodė, kad po 24 val. inkubacijos rivaroksabanu nustatytas nuo koncentracijos priklausomas *CYP4F2* raiškos sumažėjimas [226]. Vis dėlto skirtingų koncentracijų rivaroksabano poveikis nedarė įtakos *CYP4F2* baltymo kiekiui HUVEC ląstelėse (2 priedas).

3.1.1.1 lentelė. Santykinis *CYP4F2* raiškos pokytis HUVEC ląstelėse, paveiktose 0,1–10 μM rivaroksabano koncentracijomis

Ląstelių mėginiai	<i>CYP4F2</i> ΔC_T pokyčiai		Sumažėjusi <i>CYP4F2</i> raiška (PK $\pm$ SN)	p^*
	mediana	min.–maks. reikšmė		
Kontrolė – 0 μM rivaroksabanas	14,6	14,3–15,6	–	–
0,1 μM rivaroksabanas	15,4	15,0–15,7	1,44 karto (0,69 $\pm$ 0,14)	0,046
0,2 μM rivaroksabanas	15,4	15,3–15,8	1,71 karto (0,58 $\pm$ 0,10)	0,026
0,5 μM rivaroksabanas	15,4	15,3–16,3	1,89 karto (0,53 $\pm$ 0,17)	0,028
1 μM rivaroksabanas	15,6	15,2–16,8	1,93 karto (0,52 $\pm$ 0,17)	0,013
2 μM rivaroksabanas	15,8	15,2–16,8	2,05 karto (0,49 $\pm$ 0,15)	0,004
5 μM rivaroksabanas	15,9	15,2–16,9	2,4 karto (0,42 $\pm$ 0,21)	0,009
10 μM rivaroksabanas	16,1	15,3–17,2	2,72 karto (0,37 $\pm$ 0,21)	0,009

* p reikšmė palyginti su kontroline grupe (ląstelės inkubuotos auginimo terpėje be rivaroksabano), atlikus $n = 6$ nepriklausomus eksperimentus. PK – pokytis kartais; SN – standartinis nuokrypis.

Tikagreloro poveikis

Norint įvertinti tikagreloro poveikį *CYP4F2* ir *CYP4A11* transkripcijai, HUVEC ląstelės buvo paveiktos 2,5–25 nM tikagreloro koncentracijomis. Po 24 val. inkubacijos nustatyta, kad tikagreloras mažino *CYP4F2* raišką priklausomai nuo vaisto koncentracijos (3.1.1.2 lentelė) [227]. Reikšmingas *CYP4F2* raiškos sumažėjimas buvo stebėtas naudojant 5–25 nM tikagreloro koncentracijas, tačiau didžiausią poveikį sukėlė 25 nM koncentracija, sumažinusi raišką 2,38 karto ($p = 0,009$). *CYP4A11* raiška HUVEC ląstelėse nebuvo nustatyta.

3.1.1.2 lentelė. Santykinis *CYP4F2* raiškos pokytis HUVEC ląstelėse, paveiktose 2,5–25 nM tikagreloro koncentracijomis

Ląstelių mėginiai	<i>CYP4F2</i> ΔC_T pokyčiai		Sumažėjusi <i>CYP4F2</i> raiška (PK $\pm$ SN)	p^*
	mediana	min.–maks. reikšmė		
Kontrolė – 0 nM tikagreloras	15,7	14,2–15,9	–	–
2,5 nM tikagreloras	16,2	15,5–16,9	1,54 karto (0,65 $\pm$ 0,28)	0,240
5 nM tikagreloras	16,3	15,6–16,8	1,61 karto (0,62 $\pm$ 0,20)	0,041
10 nM tikagreloras	16,5	15,7–16,9	1,72 karto (0,58 $\pm$ 0,12)	0,026
15 nM tikagreloras	16,3	15,8–17,5	1,72 karto (0,58 $\pm$ 0,25)	0,032
25 nM tikagreloras	17,0	15,8–18,0	2,38 karto (0,42 $\pm$ 0,21)	0,009

* p reikšmė palyginti su kontroline grupe (ląstelės inkubuotos auginimo terpėje be tikagreloro), atlikus $n = 6$ nepriklausomus eksperimentus. PK – pokytis kartais; SN – standartinis nuokrypis.

CYP4F2 baltymo kiekis HUVEC ląstelėse paveikus vaistu taip pat mažėjo. *CYP4F2* baltymo koncentracija, tiriant ELISA metodu (3.1.1.3 lentelė), esant žemiausiai tirtai 2,5 nM tikagreloro koncentracijai, sumažėjo iki 20,6 (6,7–23,3) ng/ml ($p = 0,039$), o esant 5–25 nM koncentracijoms toliau mažėjo nuo 18,0 iki 16,5 ng/ml, palyginti su kontrolinėmis vaistu neveiktomis ląstelėmis (41,9 (9,4–42,9) ng/ml).

3.1.1.3 lentelė. *CYP4F2* baltymo koncentracija HUVEC ląstelėse, paveiktose 2,5–25 nM tikagreloro koncentracijomis

Ląstelių mėginiai	CYP4F2 koncentracija (ng/ml)		<i>p</i> *
	mediana	min.–maks. reikšmė	
Kontrolė – 0 nM tikagreloras	41,9	9,4–42,9	–
2,5 nM tikagreloras	20,6	6,7–23,3	0,039
5 nM tikagreloras	18,0	6,2–22,7	0,045
10 nM tikagreloras	19,5	7,0–25,4	0,041
15 nM tikagreloras	18,2	5,2–25,4	0,043
25 nM tikagreloras	16,5	5,5–20,9	0,036

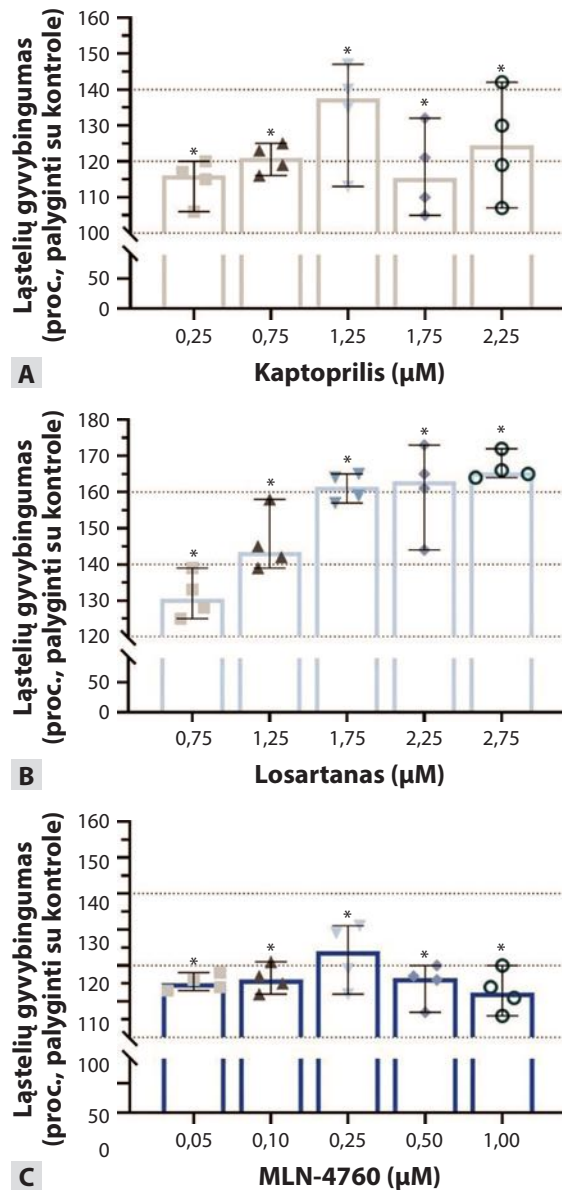
**p* reikšmė palyginti su kontroline grupe (ląstelės inkubuotos auginimo terpėje be tikagreloro), atlikus *n* = 6 nepriklausomus eksperimentus.

Norint įvertinti tikagreloro poveikį kepenų ląstelėse, buvo tirta *CYP4F2* ir *CYP4A11* genų raiška HepG2 ląstelėse. Rezultatai parodė, kad naudojant 5–25 nM tikagreloro koncentracijas, mažėjo tiek *CYP4F2*, tiek *CYP4A11* raiška, palyginti su šių genų raiška kontrolinėse ląstelėse. Minėti pokyčiai nebuvo reikšmingi (*p* > 0,4).

3.1.2. RAS inhibitorių poveikis endotelio ląstelių funkcijai

Poveikis ląstelių gyvybingumui

HUVEC ląstelių kultūroms 24 val. buvo leidžiama prisitvirtinti prie šulinėlių paviršiaus, tuomet ląstelės 24 val. buvo inkubuojamos su RAS veikiančiais junginiais (kaptoprilu, losartanu ir MLN-4760). Ląstelių gyvybingumui stebėti buvo naudojamas MTT tyrimas. Tyrimas parodė, kad kiekvieno naudoto RAS inhibitoriaus poveikis gali būti pasiektas po 24 val. inkubacijos, tačiau ne visos terapinės koncentracijos turėjo tokį patį efektyvumą. Paveikus kaptoprilu pastebėtas reikšmingas gyvybingumo padidėjimas su visomis tirtomis vaisto koncentracijomis, palyginti su kontroline grupe (3.1.2.1 pav. A). Paveikus 1,25 μM kaptoprilu, stebėtas stipriausias poveikis – ląstelių gyvybingumas didėjo 38 proc. (*p* = 0,029). Losartanas HUVEC metabolinį gyvybingumą didino priklausomai nuo vaisto koncentracijos (3.1.2.1 pav. B). Ląstelių gyvybingumas didėjo nuo 31 proc. iki 66 proc., esant atitinkamoms losartano koncentracijoms (0,75–2,75 μM). Po veikimo MLN-4760, reikšmingiausias metabolinio gyvybingumo didėjimas buvo pasiektas naudojant 0,25 μM MLN-4760 – didėjo 24 proc. (*p* = 0,029) (3.1.2.1 pav. C). Poveikis gyvybingumui buvo stebėtas ir naudojant kitas MLN-4760 koncentracijas.



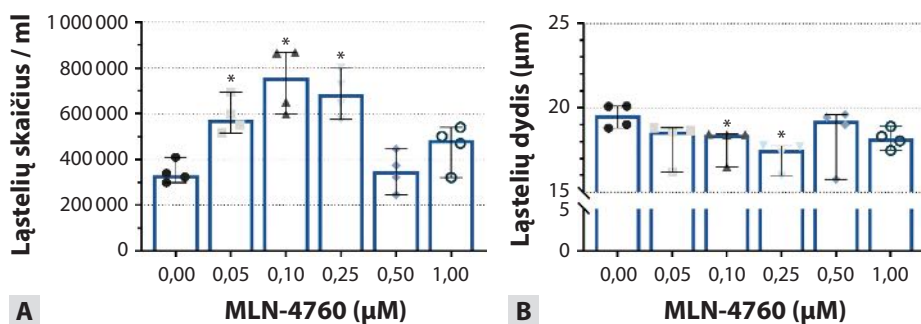
3.1.2.1 pav. RAS veikiančių junginių poveikis HUVEC ląstelių gyvybingumui

A – HUVEC metabolinis gyvybingumas procentais po 24 val. veikimo kaptopriliumi (0,25–2,25 μM); **B** – HUVEC metabolinis gyvybingumas procentais po 24 val. veikimo losartanu (0,75–2,75 μM); **C** – HUVEC metabolinis gyvybingumas procentais po 24 val. veikimo MLN-4760 (0,05–1 μM). Duomenys pateikiami kaip mediana su reikšmių intervalu ($n = 4$). * $p < 0,05$, palyginti su kontrole (kontrolinė grupė – ląstelės inkubuotos auginimo terpėje be RAS veikiančių junginių, prilyginamos 100 proc. gyvybingumui).

Poveikis ląstelių proliferacijai ir ląstelių dydžiui

Ląstelių proliferacija įvertinta skaičiuojant gyvybingų ląstelių skaičių praėjus 24 val. nuo HUVEC ląstelių inkubacijos su kaptoprilu, losartanu ir MLN-4760 pradžios. Reikšmingas gyvybingų HUVEC ląstelių skaičiaus padidėjimas nustatytas tik veikiant MLN-4760 (3.1.2.2 pav. A). Šis padidėjimas, palyginti su kontrole, stebėtas esant 0,05–0,25 μM koncentracijoms, tačiau esant 0,5 ir 1 μM koncentracijoms nebuvo nustatytas.

Siekiant ištirti kaptoprilio, losartano ir MLN-4760 poveikį gyvybingų ląstelių dydžiui, buvo įvertintas junginiais veiktų HUVEC ląstelių skersmuo. Paveikus 0,1 ir 0,25 μM MLN-4760 koncentracijomis, buvo stebėtas ląstelių dydžio sumažėjimas (3.1.2.2 pav. B).

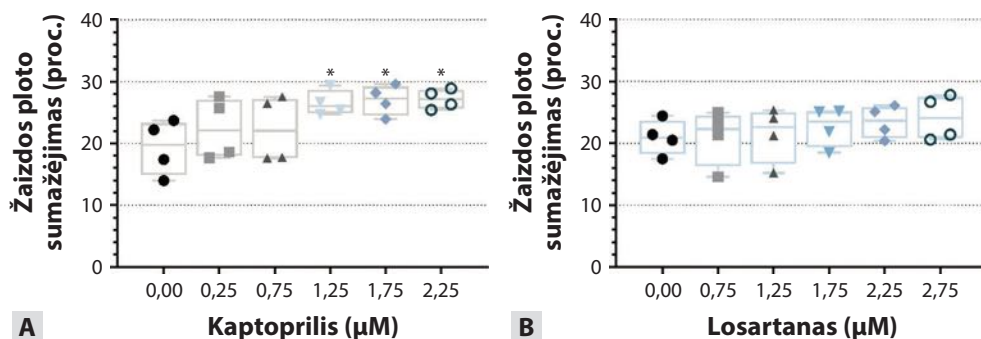


3.1.2.2 pav. MLN-4760 poveikis HUVEC ląstelių proliferacijai ir ląstelių dydžiui

A – Gyvybingų HUVEC ląstelių skaičius po 24 val. veikimo MLN-4760 (0,05–1 μM); **B** – Gyvybingų HUVEC ląstelių dydis po 24 val. veikimo MLN-4760 (0,05–1 μM). Duomenys pateikiami kaip mediana su reikšmių intervalu ($n = 4$). * $p < 0,05$, palyginti su kontrole (kontrolinė grupė – ląstelės inkubuotos auginimo terpėje be MLN-4760).

Poveikis ląstelių migracijai

„Žaizdos gijimo“ procesas po 4 val. HUVEC ląstelių inkubacijos su kaptoprilu, losartanu ir MLN-4760 buvo įvertintas pagal žaizdos ploto sumažėjimą, kuris atspindi endotelio ląstelių migraciją į pažeistą vietą. Rezultatai parodė, kad kaptoprilis skatina HUVEC ląstelių migraciją ir taip prisideda prie „žaizdos gijimo“ proceso. Kaptoprilis, esant 1,25–2,25 μM koncentracijai ląstelių terpėje, skatino žaizdos ploto sumažėjimą, palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis (3.1.2.3 pav. A). Tuo tarpu paveikus losartanu, buvo stebima tendencija, kad žaizdos plotas sumažėjo, bet reikšmingo skirtumo tarp vaistu veiktų ląstelių ir kontrolinių ląstelių nenustatyta (3.1.2.3 pav. B). Paveikus MLN-4760, kurio koncentracijos buvo nuo 0,05 iki 1 μM , reikšmingas poveikis „žaizdos gijimo“ procesui nebuvo stebėtas, o HUVEC ląstelių migracija išliko panaši kaip kontrolinėse sąlygose.

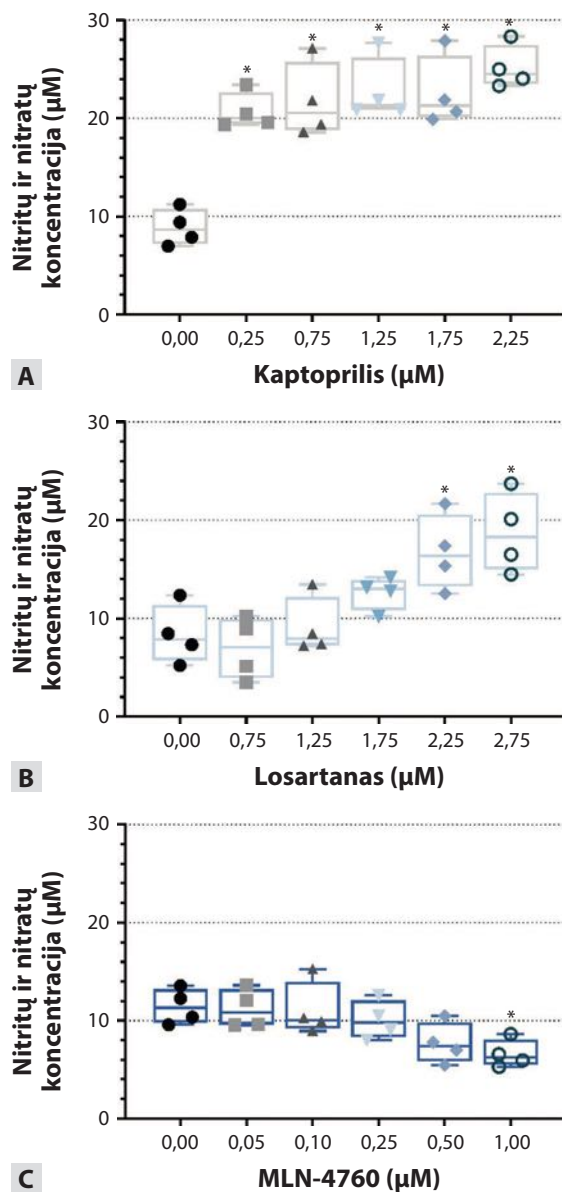


3.1.2.3 pav. RAS veikiančių junginių poveikis HUVEC ląstelių migracijai

A – Žaizdos ploto HUVEC ląstelių vienasluoksnyje sumažėjimas procentais po 4 val. veikimo kaptoprilio (0,25–2,25 μM); **B** – Žaizdos ploto HUVEC ląstelių vienasluoksnyje sumažėjimas procentais po 4 val. veikimo losartanu (0,75–2,75 μM). Duomenys pateikiami kaip mediana su reikšmių intervalu ($n = 4$). * $p < 0,05$, palyginti su kontrole (kontrolinė grupė – ląstelės inkubuotos auginimo terpėje be RAS veikiančių junginių).

Poveikis azoto oksido susidarymui

NO susidarymas po 24 val. HUVEC ląstelių inkubacijos su kaptoprilio, losartanu ir MLN-4760 buvo vertintas nustatant bendrą nitritų ir nitratų koncentraciją ląstelių auginimo terpėje. Tyrimo rezultatai parodė, kad tiek kaptoprilis, tiek losartanas skatina NO susidarymą HUVEC ląstelėse. Visose tirtose kaptoprilio koncentracijose (0,25–2,25 μM) nustatytas reikšmingas NO kiekio padidėjimas, palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis (3.1.2.4 pav. A). Palyginus su kontrolinėmis ląstelėmis (8,65 (6,98–11,25) μM), nustatyta, kad kaptoprilis, esant 2,25 μM koncentracijai, didino NO koncentraciją iki 24,53 (23,32–28,32) μM ($p = 0,029$). Inkubuojant ląsteles su losartanu, reikšmingas NO kiekio didėjimas fiksuotas tik esant 2,25 ir 2,75 μM koncentracijoms, palyginti su nepaveiktomis ląstelėmis (3.1.2.4 pav. B). Esant 2,75 μM losartano koncentracijai, NO koncentracija padidėjo iki 18,31 (14,5–23,73) μM, palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis (7,9 (5,23–12,36) μM, $p = 0,029$). MLN-4760 poveikis buvo priešingas: stebėta nuo koncentracijos priklausoma tendencija, kai didėjant junginio koncentracijai, NO koncentracija ląstelių kultūros terpėje palaipsniui mažėjo. Reikšmingas NO kiekio sumažėjimas nustatytas esant 1 μM MLN-4760 – NO koncentracija siekė 6,27 (5,31–8,63) μM, palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis (11,32 (9,59–13,57) μM, $p = 0,029$) (3.1.2.4 pav. C).



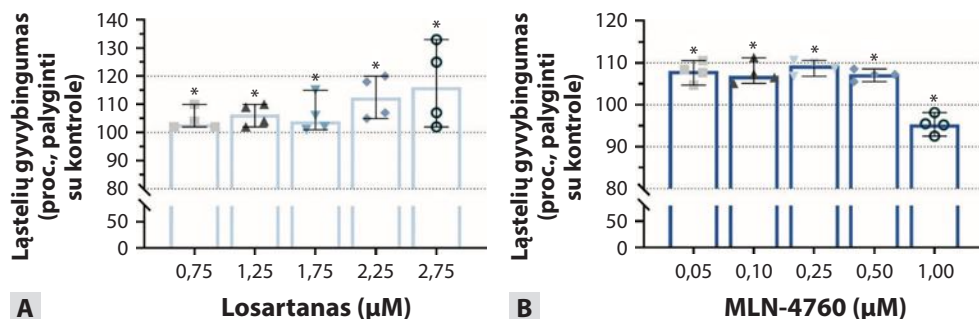
3.1.2.4 pav. RAS veikiančių junginių poveikis HUVEC ląstelių NO susidarymui

A – Nitritų ir nitratų koncentracija HUVEC ląstelių auginimo terpėje po 24 val. veikimo kaptopriliu (0,25–2,25 µM); B – Nitritų ir nitratų koncentracija HUVEC ląstelių auginimo terpėje po 24 val. veikimo losartanu (0,75–2,75 µM); C – Nitritų ir nitratų koncentracija HUVEC ląstelių auginimo terpėje po 24 val. veikimo MLN-4760 (0,05–1 µM). Duomenys pateikiami kaip mediana su reikšmių intervalu ($n = 4$). $*p < 0,05$, palyginti su kontrole (kontrolinė grupė – ląstelės inkubuotos auginimo terpėje be RAS veikiančių junginių).

3.1.3. RAS inhibitorių poveikis inkstų proksimalinių kanalėlių epitelinių ląstelių funkcijai

Poveikis ląstelių gyvybingumui

Inkstų proksimalinių kanalėlių epitelinėms ląstelėms RPTEC/TERT1 buvo atliktas metabolinio gyvybingumo tyrimas MTT metodu. Ląstelės buvo paveiktos skirtingomis junginių koncentracijomis 24 val., o rezultatai išreikšti kaip gyvybingumas procentais, palyginti su vaistu neveiktomis ląstelėmis, kurių gyvybingumas laikytas 100 proc. Kaptoprilio 0,25–2,25 μM koncentracijos nedarė reikšmingos įtakos RPTEC/TERT1 ląstelių gyvybingumui – gyvybingumo rodikliai išliko artimi kontrolei. Losartanas, priešingai, didino RPTEC/TERT1 ląstelių gyvybingumą su visomis vaisto koncentracijomis (0,75–2,75 μM) (3.1.3.1 pav. A). Didžiausias gyvybingumo didėjimas stebėtas paveikus 2,75 μM – gyvybingumas didėjo 16 proc., palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis ($p = 0,029$). MLN-4760 0,05–0,5 μM koncentracijos didino RPTEC/TERT1 ląstelių gyvybingumą vidutiniškai 7–9 proc., palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis ($p = 0,029$) (3.1.3.1 pav. B). Kita vertus, didžiausia tirta koncentracija (1 μM), priešingai, sumažino ląstelių gyvybingumą iki 94,4 proc., o tai parodė, jog MLN-4760 pasižymėjo dvilypiu poveikiu RPTEC/TERT1 ląstelių gyvybingumui.



3.1.3.1 pav. RAS veikiančių junginių poveikis RPTEC/TERT1 ląstelių gyvybingumui

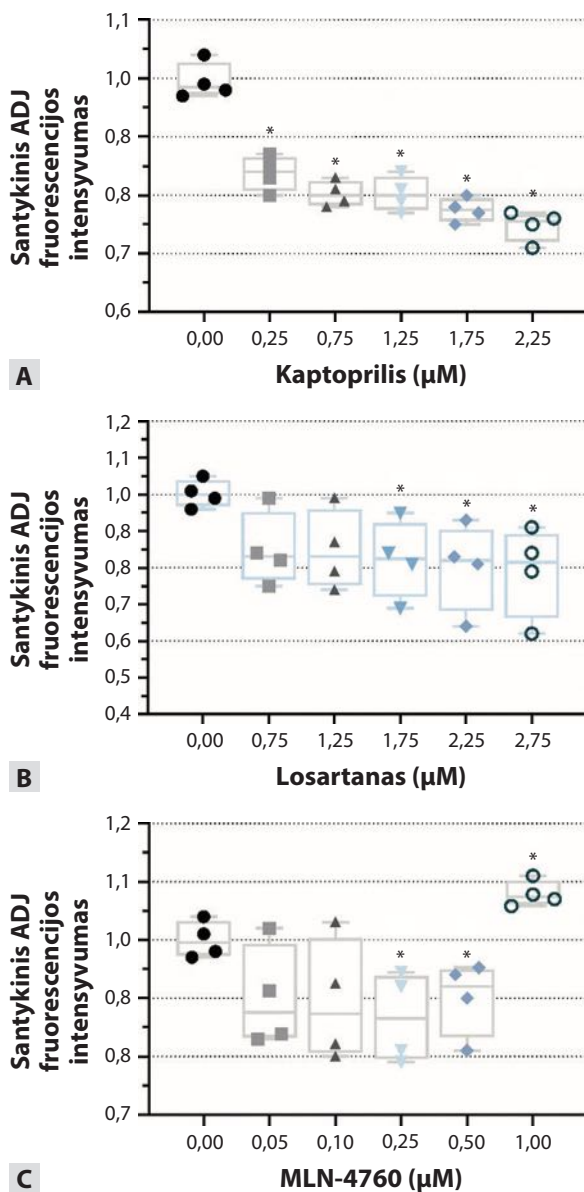
A – RPTEC/TERT1 ląstelių metabolinis gyvybingumas procentais po 24 val. veikimo losartanu (0,75–2,75 μM); **B** – RPTEC/TERT1 ląstelių metabolinis gyvybingumas procentais po 24 val. veikimo MLN-4760 (0,05–1 μM). Duomenys pateikiami kaip mediana su reikšmių intervalu ($n = 4$). * $p < 0,05$, palyginti su kontrole (kontrolinė grupė – ląstelės inkubuotos auginimo terpėje be RAS veikiančių junginių, prilyginamos 100 proc. gyvybingumui).

Poveikis ląstelių migracijai

Inkstų proksimalinių kanalėlių epitelinėse ląstelėse RPTEC/TERT1 buvo atliktas „žaizdos gijimo“ tyrimas. RPTEC/TERT1 ląstelių vienasluoksnyje buvo padaryta žaizda, o ląstelės buvo veikiamos kaptoprilu, losartanu ir MLN-4760. Kaptoprilis ir losartanas nedarė reikšmingo nuo koncentracijos priklausomo poveikio RPTEC/TERT1 ląstelių migracijai ar „žaizdos gijimui“. MLN-4760 koncentracijos taip pat nedarė įtakos RPTEC/TERT1 ląstelių migracijai.

Poveikis aktyvių deguonies junginių susidarymui

Paveikus kaptoprilu, ADJ susidarymas reikšmingai sumažėjo su visomis tirtomis koncentracijomis (0,25–2,25 μM), palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis (3.1.3.2 pav. A). Didžiausias poveikis buvo stebėtas veikiant 2,25 μM koncentracija – ADJ sumažėjo 1,33 karto, palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis ($p = 0,029$). Losartanas taip pat mažino ADJ susidarymą RPTEC ląstelėse paveikus nuo 1,75 iki 2,75 μM koncentracijomis (3.1.3.2 pav. B). Didėjant losartano koncentracijai (iki 2,75 μM), ADJ kiekis mažėjo. 0,25–0,5 μM MLN-4760 koncentracijos mažino ADJ susidarymą ($p = 0,029$), o 1 μM turėjo priešingą poveikį – ADJ kiekis padidėjo 8 proc. ($p = 0,029$), palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis (3.1.3.2 pav. C).



3.1.3.2 pav. RAS veikiančių junginių poveikis RPTEC/TERT1 ląstelių ADJ susidarymui

A – Santykinis ADJ fluorescencijos intensyvumas RPTEC/TERT1 ląstelėse po 1 val. veikimo kaptoprilium (0,25–2,25 μM); **B** – Santykinis ADJ fluorescencijos intensyvumas RPTEC/TERT1 ląstelėse po 1 val. veikimo losartanu (0,75–2,75 μM); **C** – Santykinis ADJ fluorescencijos intensyvumas RPTEC/TERT1 ląstelėse po 1 val. veikimo MLN-4760 (0,05–1 μM). Duomenys pateikiami kaip mediana su reikšmių intervalu ($n = 4$). * $p < 0,05$, palyginti su kontrole (kontrolinė grupė – ląstelės inkubuotos auginimo terpėje be RAS veikiančių junginių).

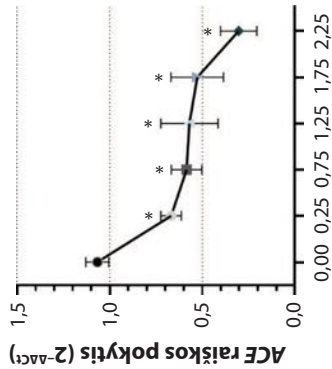
3.1.4. RAS inhibitorių poveikis su RAS, uždegimu ir eikozanoidų metabolismu susijusių žymenų genų raiškai endotelio ląstelėse

Kaptoprilio poveikis genų raiškai

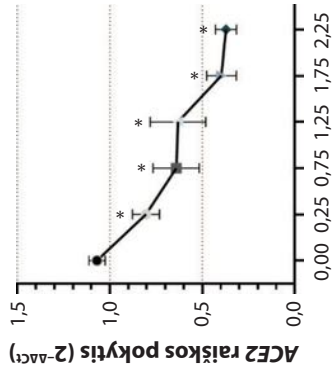
Kaptoprilio poveikis *ACE*, *ACE2*, *VCAM-1*, *ICAM-1*, *PTGS1*, *PTGS2*, *CYP4F2* ir *GPR75* genų transkripcijai buvo vertintas analizuojant šių genų mRNR raišką HUVEC ląstelėse. Raiškos pokyčių reikšmės, išreikštos kaip pokytis kartais ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), po poveikio skirtingomis terapinėmis kaptoprilio koncentracijomis (0,25–2,25 μM) pateiktos 3.1.4.1 pav. (A–H). Po 24 val. inkubacijos su kaptopriliumi HUVEC ląstelėse nustatytas nuo koncentracijos priklausomas *ACE*, *ACE2*, *VCAM-1* ir *ICAM-1* genų raiškos sumažėjimas, palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis (3.1.4.1 pav. A–D). Didžiausias mRNR raiškos sumažėjimas buvo stebimas naudojant didžiausią tirtą kaptoprilio koncentraciją (2,25 μM): *ACE*, *ACE2*, *VCAM-1* ir *ICAM-1* genų santykinė raiška mažėjo atitinkamai 2,94, 2,78, 3,85 ir 4,55 karto ($p = 0,03$). Didėjant kaptoprilio koncentracijoms (1,75 μM ir 2,25 μM), *CYP4F2* ir *GPR75* raiška didėjo (3.1.4.1 pav. G, H). Paveikus 2,25 μM kaptoprilio koncentracijomis, *CYP4F2* ir *GPR75* raiška didėjo atitinkamai 1,28 ir 1,34 karto ($p = 0,03$).

Losartano poveikis genų raiškai

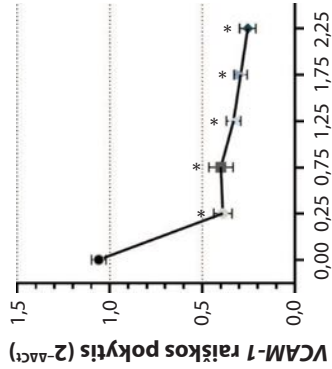
Po 24 val. inkubacijos su 0,75–2,75 μM losartanu buvo nustatytas reikšmingas *ACE*, *PTGS2* ir *CYP4F2* genų raiškos mažėjimas HUVEC ląstelėse (3.1.4.2 pav. A, F, G). Genų santykinė raiška mažėjo priklausomai nuo losartano koncentracijos, palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis. Didžiausias raiškos mažėjimas stebėtas veikiant 2,75 μM losartano koncentracija – *ACE*, *PTGS2* ir *CYP4F2* genų raiška mažėjo atitinkamai 3,03, 2,7 ir 4,76 karto ($p = 0,03$).



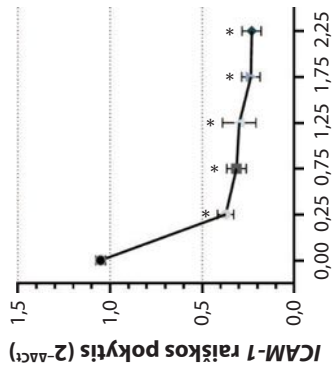
A Kaptoprilis (μM)



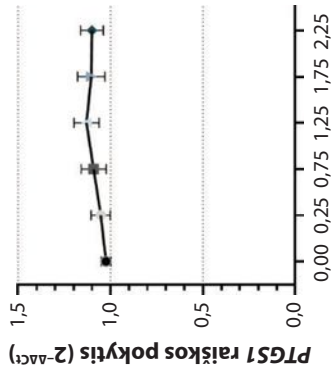
B Kaptoprilis (μM)



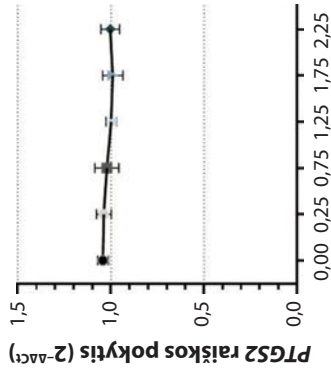
C Kaptoprilis (μM)



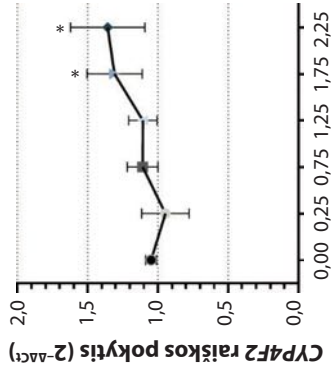
D Kaptoprilis (μM)



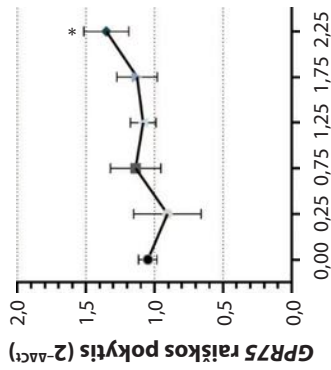
E Kaptoprilis (μM)



F Kaptoprilis (μM)



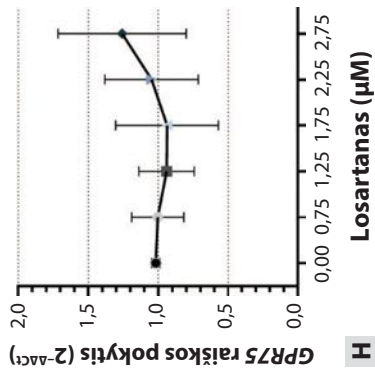
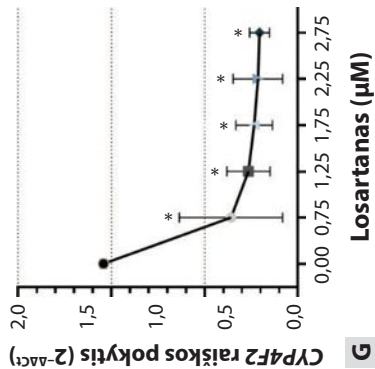
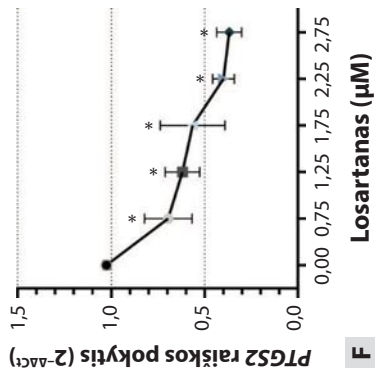
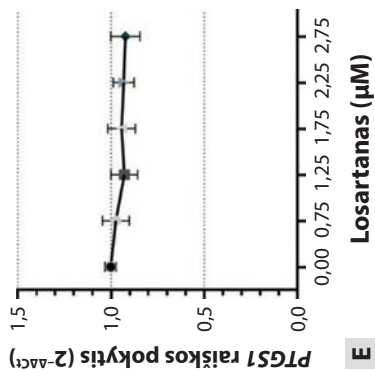
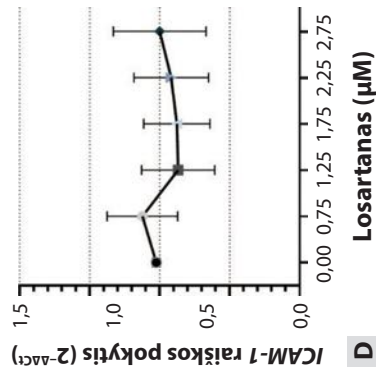
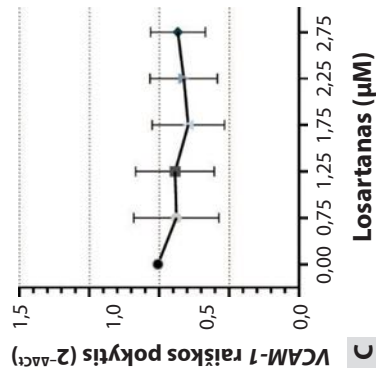
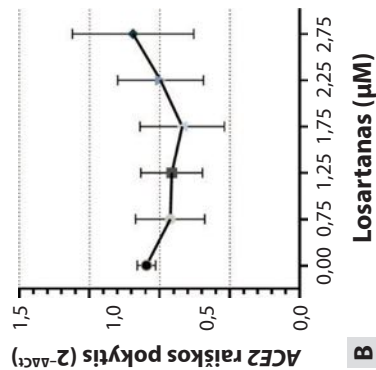
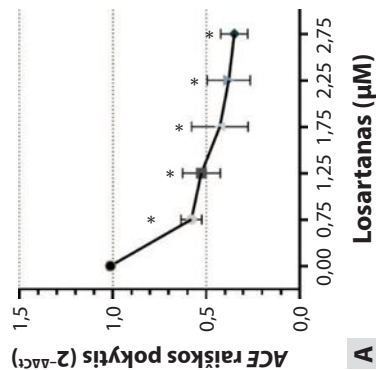
G Kaptoprilis (μM)



H Kaptoprilis (μM)

3.1.4.1 pav. Terapinių kaptoprilio koncentracijų (0,25–2,25 μM) poveikis HUVEC ląstelėms ACE, ACE2, VCAM-1, ICAM-1, PTGS1, PTGS2, CYP4F2 ir GPR75 genų raškos pokyčiams

Genų raška išreiškiama pokyčių kartais ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), palyginti su kontrole (kontrolinė grupė – ląstelės inkubuotos auginimo terpėje be kaptoprilio). Duomenys pateikiami kaip mediana su reikšmių intervalu ($n = 4$). * $p < 0,05$, palyginti su kontrole.

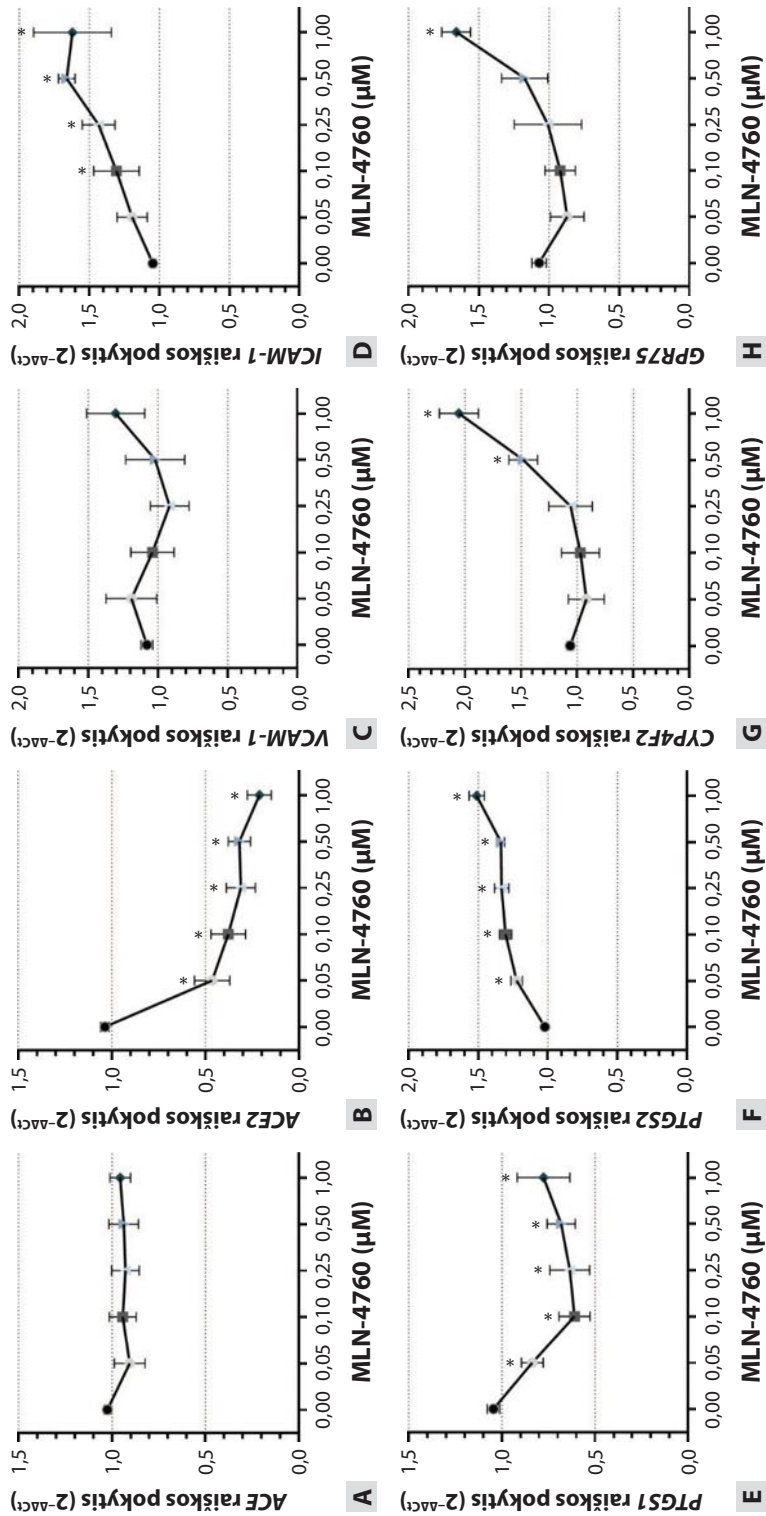


3.1.4.2 pav. Terapinių losartano koncentracijų (0,75–2,75 μM) poveikis HUVEC ląstelių *ACE*, *ACE2*, *VCAM-1*, *ICAM-1*, *PTGS1*, *PTGS2*, *CYP4F2* ir *GPR75* genų raiškos pokyčiams

Genų raiška išreiškiama pokyčių kartais ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), palyginti su kontrole (kontrolinė grupė – ląstelės inkubuotos auginimo terpėje be losartano). Duomenys pateikiami kaip mediana su reikšmių intervalu ($n = 4$). * $p < 0,05$, palyginti su kontrole.

MLN-4760 poveikis genų raiškai

Po 24 val. inkubacijos su 0,05–1 μM MLN-4760, HUVEC ląstelėse buvo nustatytas *ACE2* ir *PTGS1* genų raiškos mažėjimas bei *ICAM-1*, *PTGS2*, *CYP4F2* ir *GPR75* genų raiškos didėjimas, palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis (3.1.4.3 pav. A–H). MLN-4760, priklausomai nuo junginio koncentracijos, mažino *ACE2* geno santykinę raišką, palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis – raiška mažėjo nuo 1,22 iki 2,78 karto ($p = 0,03$) (3.1.4.3 pav. B). *PTGS1* raiška labiausiai mažėjo (1,59 karto) veikiant 0,1 μM MLN-4760 palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis ($p = 0,03$) (3.1.4.3 pav. E). Priešingai, *ICAM-1* ir *PTGS2* genų raiška didėjo, priklausomai nuo MLN-4760 koncentracijos, palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis (3.1.4.3 pav. D, F). Paveikus 1 μM MLN-4760 stebėtas stipriausias poveikis – *ICAM-1* ir *PTGS2* raiška didėjo atitinkamai 1,7 ir 1,5 karto ($p = 0,03$). Be to, tik didesnės MLN-4760 koncentracijos (0,5 μM ir 1 μM) skatino *CYP4F2* ir *GPR75* raiškos didėjimą (3.1.4.3 pav. G, H). Veikiant 1 μM MLN-4760, *CYP4F2* ir *GPR75* raiška didėjo atitinkamai 2,0 ir 1,64 karto ($p = 0,03$).



3.1.4.3 pav. MLN-4760 (0,05–1 μM) poveikis HUVEC ląstelių ACE, ACE2, VCAM-1, ICAM-1, PTGS1, PTGS2, CYP4F2 ir GPR75 genų raiškos pokyčiams

Genų raiška išreiškiama pokyčių kartais ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), palyginti su kontrole (kontrolinė grupė – ląstelės inkubuotos auginimo terpėje be MLN-4760). Duomenys pateikiami kaip mediana su reikšmių intervalu ($n = 4$). * $p < 0,05$, palyginti su kontrole.

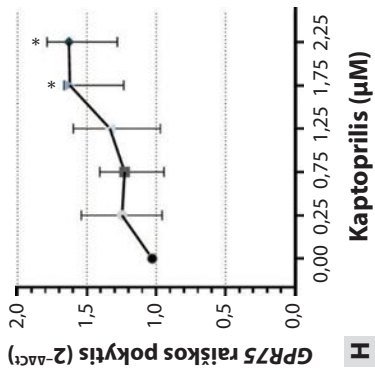
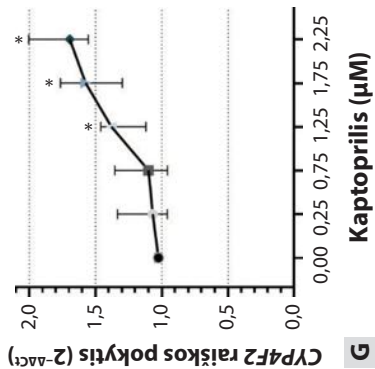
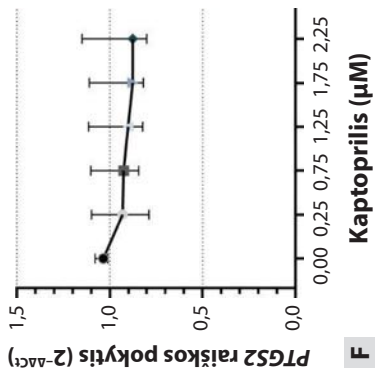
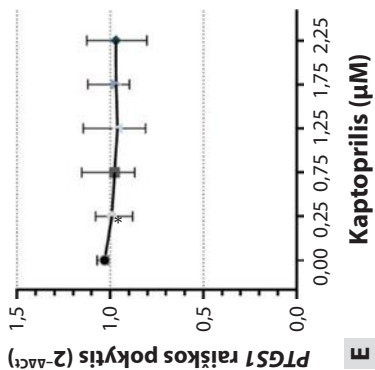
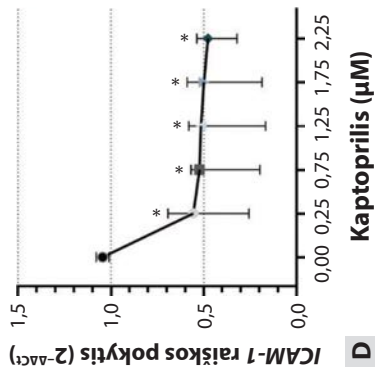
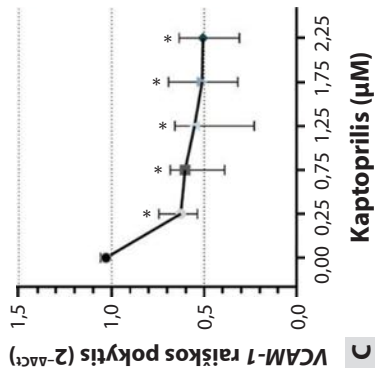
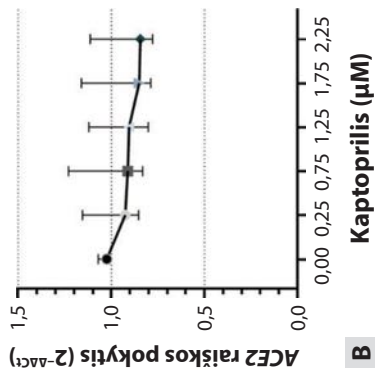
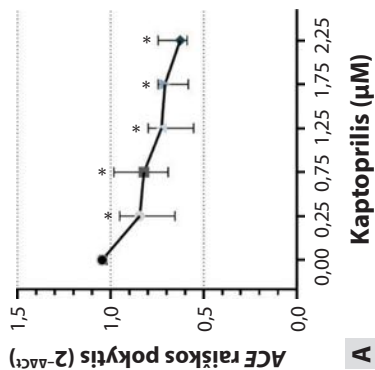
3.1.5. RAS inhibitorių poveikis su RAS, uždegimu ir eikozanoidų metabolismu susijusių žymenų genų raiškai inkstų proksimalinių kanalėlių epitelinėse ląstelėse

Kaptoprilio poveikis genų raiškai

Po inkubacijos su kaptopriliumi *ACE*, *VCAM-1* ir *ICAM-1* genų raiška RPTEC/TERT1 ląstelėse mažėjo priklausomai nuo vaisto koncentracijos, palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis (3.1.5.1 pav. A, C, D). Šių genų raiškos mažėjimas buvo reikšmingas su visomis tirtomis kaptoprilio koncentracijomis, o didžiausias slopinimas stebėtas esant 2,25 μM koncentracijai – *ACE*, *VCAM-1* ir *ICAM-1* raiška mažėjo atitinkamai 1,6, 1,98 ir 2,1 karto ($p = 0,03$). Stebėta, jog 1,75 μM ir 2,25 μM kaptoprilio koncentracijos darė įtaką *CYP4F2* ir *GPR75* raiškai (3.1.5.1 pav. G, H). Paveikus 2,25 μM kaptopriliumi, *CYP4F2* ir *GPR75* raiška didėjo atitinkamai 1,69 ir 1,63 karto ($p = 0,03$).

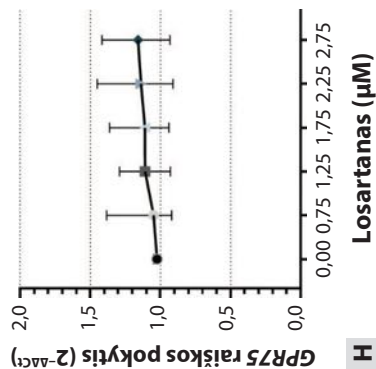
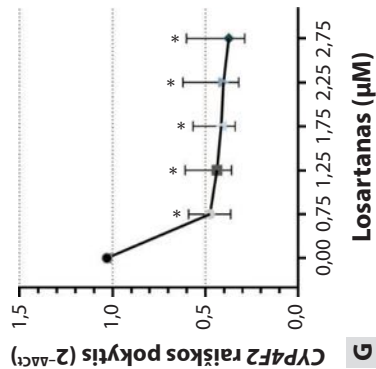
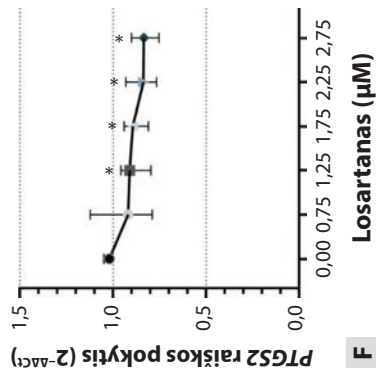
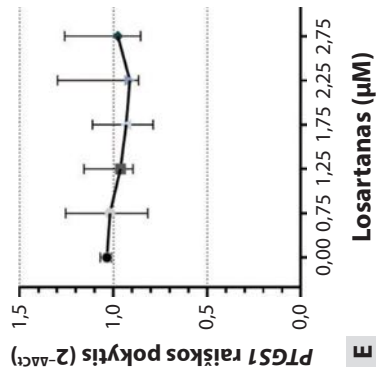
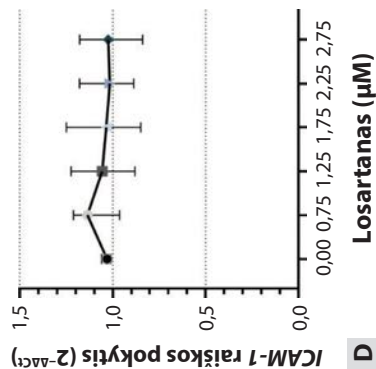
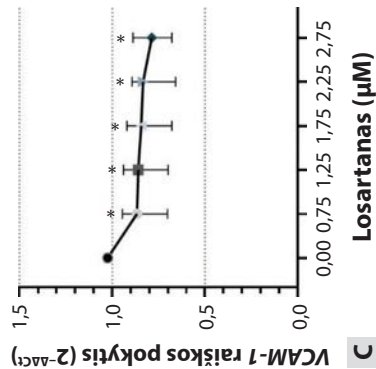
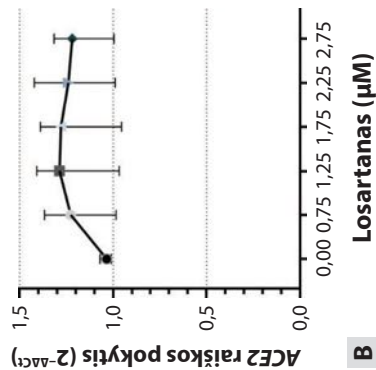
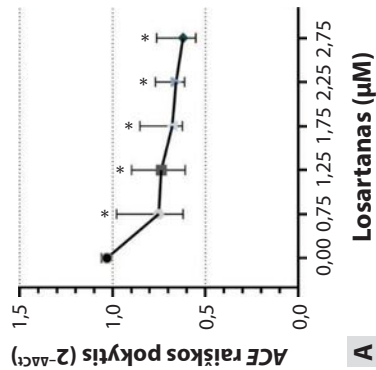
Losartano poveikis genų raiškai

Po 24 val. inkubacijos su 0,75–2,75 μM losartanu buvo nustatytas reikšmingas *ACE*, *VCAM-1*, *PTGS2* ir *CYP4F2* genų raiškos mažėjimas RPTEC/TERT1 ląstelėse, palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis (3.1.5.2 pav. A, C, F, G). *ACE*, *VCAM-1* ir *CYP4F2* raiška mažėjo priklausomai nuo losartano koncentracijos. Reikšmingas raiškos slopinimas stebėtas su visomis tirtomis koncentracijomis, o didžiausias pokytis nustatytas paveikus 2,75 μM losartano koncentracija: *ACE*, *VCAM-1*, *PTGS2* ir *CYP4F2* raiška mažėjo atitinkamai 1,61, 1,27, 1,2 ir 2,67 karto ($p = 0,03$). *ACE2*, *ICAM-1*, *PTGS1* ir *GPR75* genų raiška nekito (3.1.5.2 pav. B, D, E, H).



3.1.5.1 pav. Terapijų kaptoprilio koncentracijų (0,25–2,25 μM) poveikis RPTEC/TERT1 ląstelių ACE, ACE2, VCAM-1, ICAM-1, PTGS1, PTGS2, CYP4F2 ir GPR75 genų raiškos pokyčiams

Genų raiška išreiškiama pokyčių kartais ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), palyginti su kontrole (kontrolinė grupė – ląstelės inkubuotos auginimo terpėje be kaptoprilio). Duomenys pateikiami kaip mediana su reikšmių intervalu ($n = 4$). * $p < 0,05$, palyginti su kontrole.

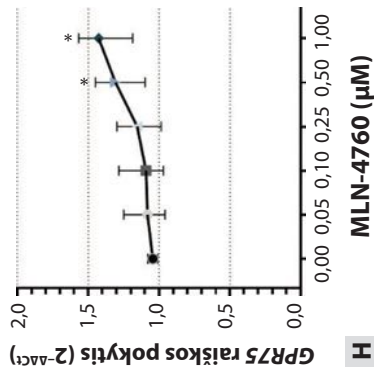
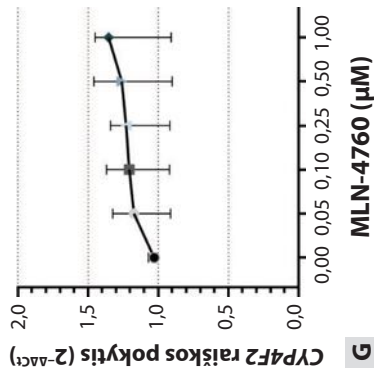
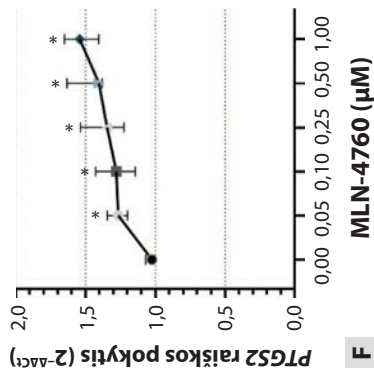
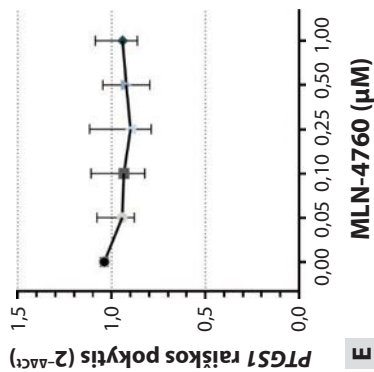
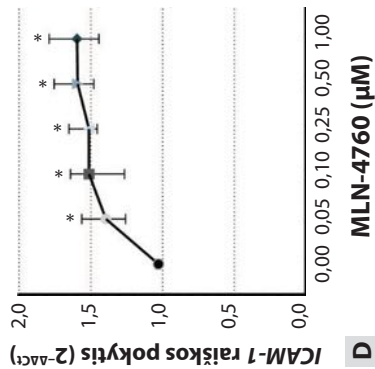
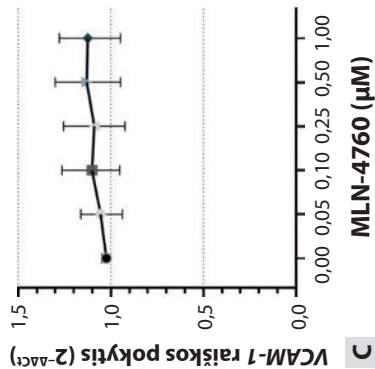
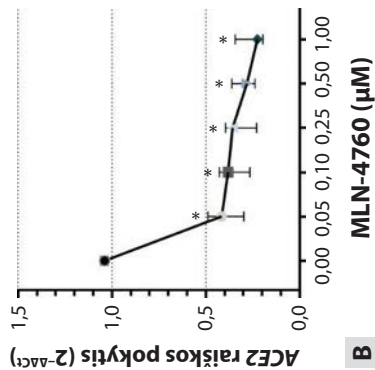
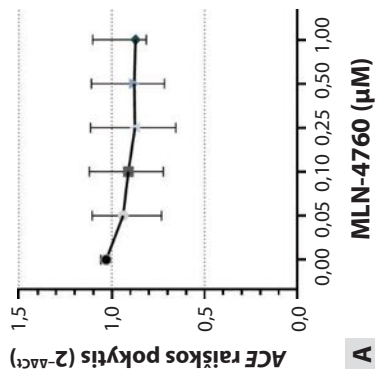


3.1.5.2 pav. Terapijų losartano koncentracijų (0,75–2,75 μM) poveikis *RPTEC/TERT1* ląstelių *ACE*, *ACE2*, *VCAM-1*, *ICAM-1*, *PTGS1*, *PTGS2*, *CYP4F2* ir *GPR75* genų raiškos pokyčiams

Genų raiška išreiškiama pokyčių kartais ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), palyginti su kontrole (kontrolinė grupė – ląstelės inkubuotos auginimo terpėje be losartano). Duomenys pateikiami kaip mediana su reikšmių intervalu ($n = 4$). * $p < 0,05$, palyginti su kontrole.

MLN-4760 poveikis genų raiškai

Po 24 val. inkubacijos su 0,05–1 μ M MLN-4760 RPTEC/TERT1 ląstelėse buvo nustatytas *ACE2*, *ICAM-1*, *PTGS2* ir *GPR75* genų raiškos pokytis, palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis (3.1.5.3 pav. B, D, F, H). MLN-4760, priklausomai nuo junginio koncentracijos, mažino *ACE2* geno raišką nuo 2,4 iki 4,44 karto, palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis ($p = 0,03$) (3.1.5.3 pav. B). *ICAM-1* raiška didėjo su visomis koncentracijomis – stipriausias poveikis stebėtas paveikus 1 μ M koncentracija – raiška didėjo 1,6 karto ($p = 0,03$) (3.1.5.3 pav. D). *PTGS2* raiška taip pat didėjo priklausomai nuo MLN-4760 koncentracijos – esant 1 μ M koncentracijai, raiška didėjo 1,54 karto ($p = 0,03$) (3.1.5.3 pav. F). *GPR75* raiška didėjo paveikus 0,5 μ M ir 1 μ M MLN-4760 koncentracijomis – didžiausias didėjimas (1,43 karto) stebėtas esant 1 μ M koncentracijai ($p = 0,03$) (3.1.5.3 pav. H).



3.1.5.3 pav. MLN-4760 (0,05–1 μM) poveikis *RPTEC/TERT1* ląstelėse *ACE*, *ACE2*, *VCAM-1*, *ICAM-1*, *PTGS1*, *PTGS2*, *CYP4F2* ir *GPR75* genų raiškos pokyčiams

Genų raiška išreiškiama pokyčių kartais ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), palyginti su kontrole (kontrolinė grupė – ląstelės inkubuotos auginimo terpėje be MLN-4760). Duomenys pateikiami kaip mediana su reikšmių intervalu ($n = 4$). * $p < 0,05$, palyginti su kontrole.

3.1.6. RAS inhibitorių poveikis su RAS, uždegimu ir eikozanoidų metabolizmu susijusių žymenų genų raiškai kepenų ląstelėse

Kaptoprilio poveikis genų raiškai HepG2 ląstelėse

Kaptoprilio poveikis su RAS ir oksilipinų metabolizmu susijusių genų *ACE*, *ACE2*, *ICAM-1*, *CYP4F2* ir *GPR75* raiškai buvo vertintas praėjus 24 val. nuo inkubacijos pradžios paveikus HepG2 ląsteles nuo 0,25 iki 2,25 μM kaptoprilio koncentracijomis (3.1.6.1 pav. A–E). *PTGS1* ir *PTGS2* raiška HepG2 ląstelėse nebuvo nustatyta. Po inkubacijos su kaptopriliumi *ACE* raiška HepG2 ląstelėse reikšmingai mažėjo, palyginti su kontrolinėmis vaistu nepaveiktomis ląstelėmis (3.1.6.1 pav. A). Didžiausias poveikis nustatytas esant 2,25 μM kaptoprilio koncentracijai – *ACE* raiška sumažėjo apie 1,4 karto ($p = 0,029$). Priešingai, *ACE2* raiška didėjo priklausomai nuo koncentracijos (3.1.6.1 pav. B). Nustatyta, kad didesnės kaptoprilio koncentracijos (1,25–2,25 μM) reikšmingai didino *ACE2* raišką, o esant 2,25 μM , mRNR raiška padidėjo 1,36 karto, palyginti su kontrole ($p = 0,029$). *ICAM-1* raiška paveikus kaptopriliumi, palyginti su kontrole, nepakito (3.1.6.1 pav. C). Panaši tendencija nustatyta ir tiriant *GPR75* raišką (3.1.6.1 pav. E). Kita vertus, *CYP4F2* raiška didėjo reikšmingai ir priklausomai nuo vaisto koncentracijos (3.1.6.1 pav. D). Esant 2,25 μM kaptoprilio koncentracijai, mRNR raiška buvo 2,42 karto aukštesnė nei kontrolinėse ląstelėse ($p = 0,029$).

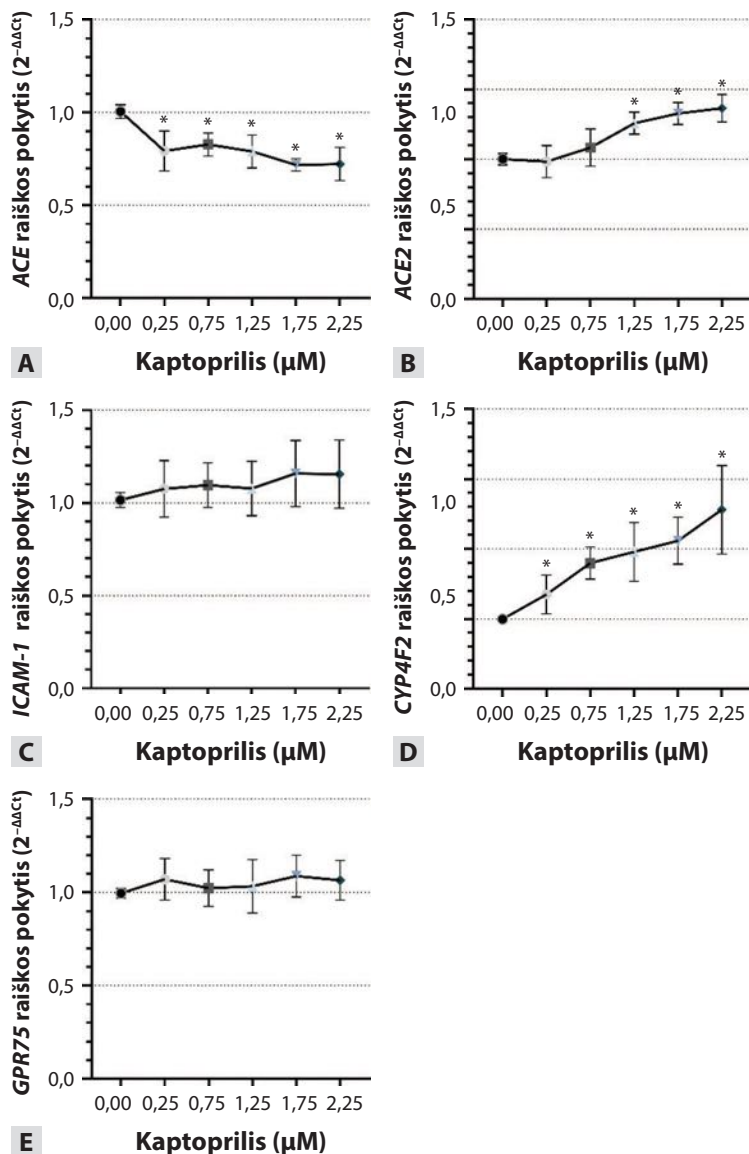
Losartano poveikis genų raiškai HepG2 ląstelėse

Paveikus losartanu, kurio koncentracijos buvo nuo 0,75 iki 2,75 μM , įvertinta *ACE*, *ACE2*, *ICAM-1*, *CYP4F2* ir *GPR75* genų raiška (3.1.6.2 pav. A–E). *PTGS1* ir *PTGS2* genų raiška nebuvo nustatyta. Losartanas nedarė įtakos HepG2 *ACE*, *ACE2* ir *ICAM-1* genų raiškai (3.1.6.2 pav. A–C), bet mažino *CYP4F2* raišką (3.1.6.2 pav. D). Didžiausias poveikis *CYP4F2* raiškai stebėtas naudojant 2,75 μM losartano koncentraciją – raiška sumažėjo 1,7 karto ($p = 0,029$). Tiriant *GPR75* taip pat nustatyta žemesnė raiška (3.1.6.2 pav. E). Losartanas reikšmingai mažino *GPR75* raišką, o didžiausias raiškos sumažėjimas nustatytas paveikus 2,75 μM losartanu.

MLN-4760 poveikis genų raiškai HepG2 ląstelėse

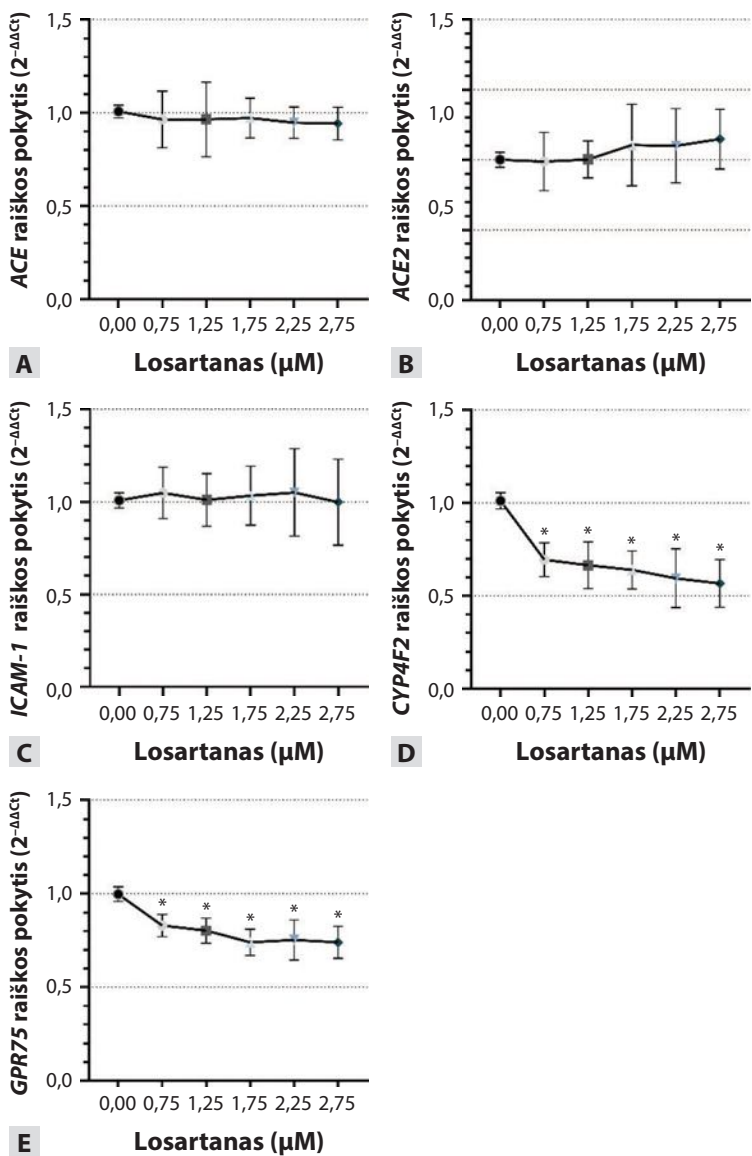
Įvertinus MLN-4760 poveikį HepG2 ląstelėse, praėjus 24 val. nuo inkubacijos pradžios, nustatyta, kad *ACE*, *ICAM-1* ir *CYP4F2* raiška nekito, palyginti su kontrole (3.1.6.3 pav. A, C, D). MLN-4760, veikiant koncentracijomis nuo 0,25 iki 1 μM , didino *ACE2* raišką, o didžiausias pokytis nustatytas esant 1 μM – raiška didėjo 1,72 karto ($p = 0,029$) (3.1.6.3 pav. B). Veikiant MLN-4760 koncentracijomis nuo 0,25 iki 1 μM , junginys slo-

pino *GPR75* raišką – ryškiausias raiškos mažėjimas stebėtas esant 1 μM MLN-4760 (3.1.6.3 pav. E).



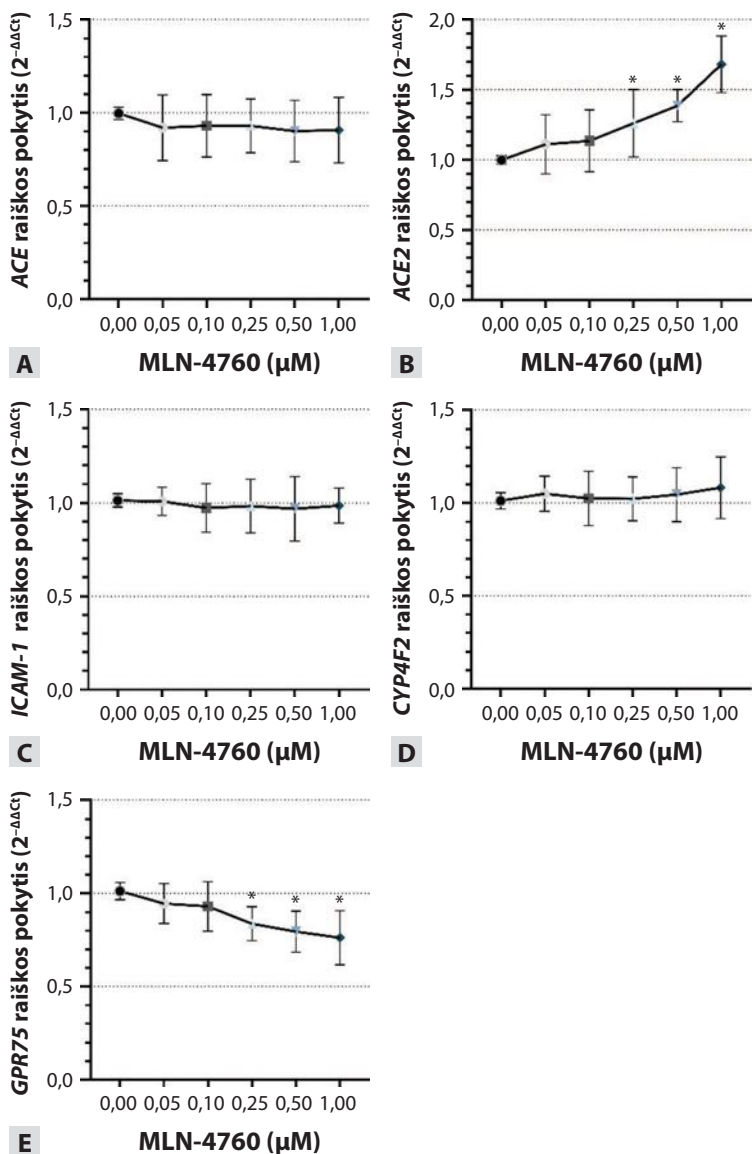
3.1.6.1 pav. Terapinių kaptoprilio koncentracijų (0,25–2,25 μM) poveikis HepG2 ląstelių ACE, ACE2, ICAM-1, CYP4F2 ir GPR75 genų raiškos pokyčiams

Genų raiška išreiškiama pokyčiu kartais ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), palyginti su kontrole (kontrolinė grupė – ląstelės inkubuotos auginimo terpėje be kaptoprilio). Duomenys pateikiami kaip mediana su reikšmių intervalu ($n = 4$). * $p < 0,05$, palyginti su kontrole.



3.1.6.2 pav. Terapinių losartano koncentracijų (0,75–2,75 μM) poveikis HepG2 ląstelių ACE, ACE2, ICAM-1, CYP4F2 ir GPR75 genų raiškos pokyčiams

Genų raiška išreiškiama pokyčiu kartais ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), palyginti su kontrole (kontrolinė grupė – ląstelės inkubuotos auginimo terpėje be losartano). Duomenys pateikiami kaip mediana su reikšmių intervalu ($n = 4$). * $p < 0,05$, palyginti su kontrole.



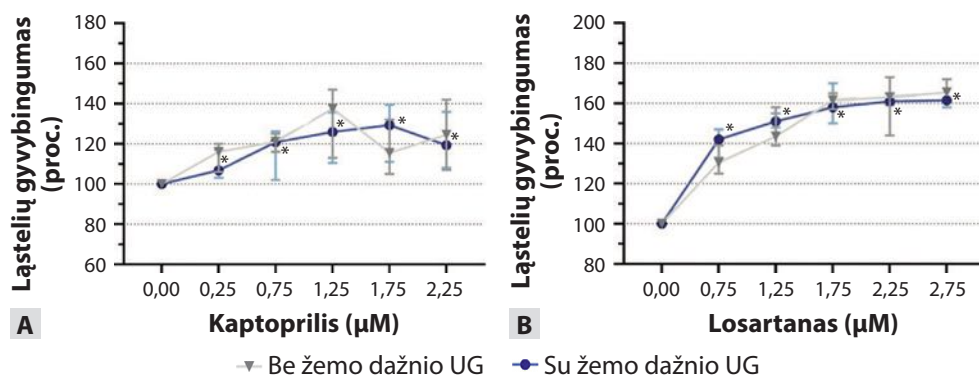
3.1.6.3 pav. MLN-4760 (0,05–1 μM) poveikis HepG2 ląstelių ACE, ACE2, ICAM-1, CYP4F2 ir GPR75 genų raiškos pokyčiams

Genų raiška išreiškiama pokyčiu kartais ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), palyginti su kontrole (kontrolinė grupė – ląstelės inkubuotos auginimo terpėje be MLN-4760). Duomenys pateikiami kaip mediana su reikšmių intervalu ($n = 4$). * $p < 0,05$, palyginti su kontrole.

3.1.7. Žemo dažnio UG ir RAS inhibitorių poveikis endotelio ląstelių funkcijai

Poveikis ląstelių gyvybingumui

HUVEC ląstelių kultūros buvo 5 min. paveiktos žemo dažnio (69 kHz) ir žemo intensyvumo ($5\text{--}10\text{ mW/cm}^2$) UG. Ląstelių veikimas vien tik žemo dažnio UG, į terpę nepridedant RAS inhibitorių, nedarė reikšmingos įtakos HUVEC ląstelių metaboliniam gyvybingumui (3.1.7.1 pav.) [228]. Paveikus žemo dažnio UG kartu su kaptoprilu, didėjo HUVEC ląstelių gyvybingumas su visomis tirtomis kaptoprilio koncentracijomis ($0,25\text{--}2,25\text{ }\mu\text{M}$), palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis, veiktomis tik žemo dažnio UG (3.1.7.1 pav. A). Toks pats poveikis stebėtas ir su žemo dažnio UG bei losartanu – HUVEC ląstelių metabolinis gyvybingumas didėjo priklausomai nuo vaisto koncentracijos terpėje (3.1.7.1 pav. B).



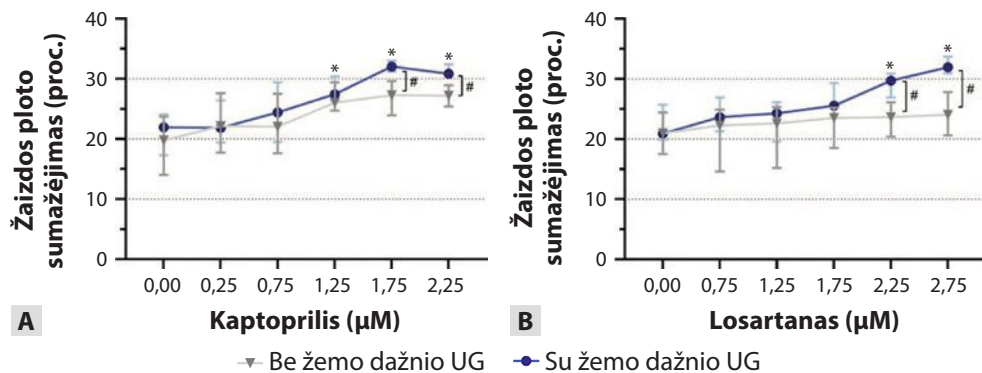
3.1.7.1 pav. Žemo dažnio UG ir RAS veikiančių junginių poveikis HUVEC ląstelių gyvybingumui

A – HUVEC metabolinis gyvybingumas procentais po 5 min. veikimo žemo dažnio UG ir 24 val. inkubacijos su kaptoprilu ($0,25\text{--}2,25\text{ }\mu\text{M}$); **B** – HUVEC metabolinis gyvybingumas procentais po 5 min. veikimo žemo dažnio UG ir 24 val. inkubacijos su losartanu ($0,75\text{--}2,75\text{ }\mu\text{M}$). Duomenys pateikiami kaip mediana su reikšmių intervalu ($n = 4$). * $p < 0,05$, palyginti su kontrole (kontrolinė grupė – ląstelės 5 min. veiktos žemo dažnio UG ir inkubuotos auginimo terpėje be RAS veikiančių junginių, prilyginamos 100 proc. gyvybingumui).

Poveikis ląstelių migracijai

HUVEC ląstelėse buvo atliktas „žaidos gijimo“ tyrimas – ląstelių vienasluoksnyje buvo sudaryta žaizda, kuri buvo 5 min. veikta žemo dažnio UG ir 4 val. inkubuota su skirtingomis terapinėmis kaptoprilio ir losartano koncentracijomis. Esant $1,75$ ir $2,25\text{ }\mu\text{M}$ kaptoprilio koncentracijai ląstelių terpėje, žemo dažnio UG didino „žaidos gijimo“ efektyvumą – stebėtas žaizdos ploto sumažėjimas, palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis ($p = 0,039$)

(3.1.7.2 pav. A). Esant 2,25 ir 2,75 μM losartano koncentracijoms ir paveikus žemo dažnio UG ląstelių migracija taip pat buvo didesnė, palyginti su atitinkamomis koncentracijomis netaikant UG (atitinkamai, $p = 0,047$, $p = 0,037$) (3.1.7.2 pav. B).

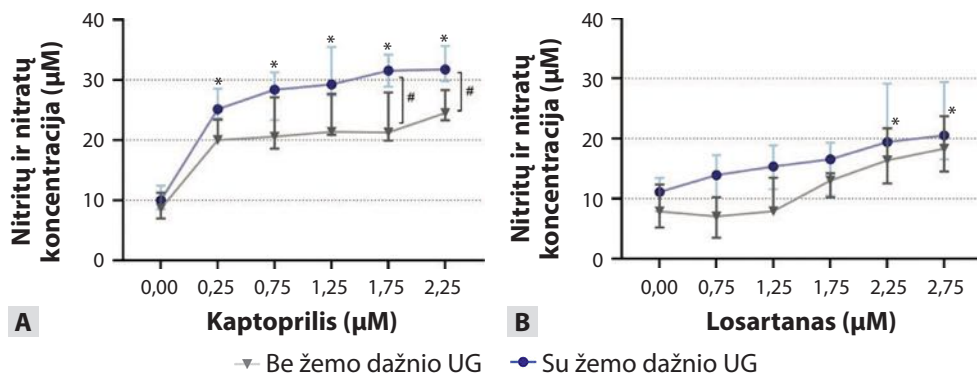


3.1.7.2 pav. Žemo dažnio UG ir RAS veikiančių junginių poveikis HUVEC ląstelių migracijai

A – Žaizdos ploto HUVEC ląstelėse sumažėjimas procentais po 5 min. veikimo žemo dažnio UG ir 4 val. inkubacijos su kaptopriliumi (0,25–2,25 μM); **B** – Žaizdos ploto HUVEC ląstelėse sumažėjimas procentais po 5 min. veikimo žemo dažnio UG ir 4 val. inkubacijos su losartanu (0,75–2,75 μM). Duomenys pateikiami kaip mediana su reikšmių intervalu ($n = 4$). * $p < 0,05$, palyginti su kontrole (kontrolinė grupė – ląstelės 5 min. veiktos žemo dažnio UG ir inkubuotos auginimo terpėje be RAS veikiančių junginių, prilyginamos 100 proc. gyvybingumui). # $p < 0,05$ tarp UG veikėtų ir neveiktų grupių.

Poveikis azoto oksido susidarymui

Kaptoprilio ir losartano kartu su žemo dažnio UG poveikis HUVEC ląstelių NO susidarymui buvo vertintas nustatant bendrą nitritų ir nitratų koncentraciją ląstelių auginimo terpėje. Veikiant žemo dažnio UG, sustiprėjo NO biosintezę skatinantis kaptoprilio poveikis. Žemo dažnio UG ir 1,75 bei 2,25 μM kaptopriliumi veikėtų endotelio ląstelių terpėje NO koncentracija buvo reikšmingai didesnė nei žemo dažnio UG neveiktų ląstelių – NO kiekis didėjo atitinkamai 1,48 ir 1,29 karto ($p = 0,039$; $p = 0,036$) (3.1.7.3 pav. A). Losartanas kartu su žemo dažnio UG didino NO kiekį esant 2,25 ir 2,75 μM losartano koncentracijoms ($p = 0,03$). Vien žemo dažnio UG poveikis ląstelėms, nenaudojant vaistų, tokio efekto nesukėlė (3.1.7.3 pav. B).



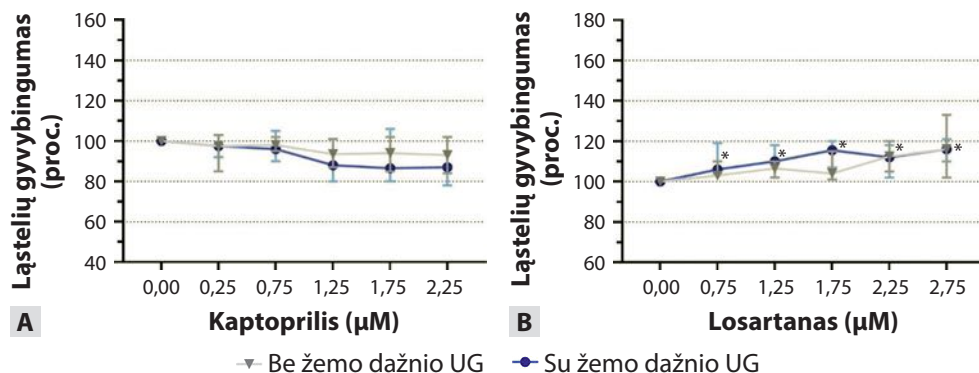
3.1.7.3 pav. Žemo dažnio UG ir RAS veikiančių junginių poveikis HUVEC ląstelių NO susidarymui

A – Nitritų ir nitratų koncentracija HUVEC ląstelių auginimo terpėje po 5 min. veikimo žemo dažnio UG ir 24 val. inkubacijos kaptoprilium (0,25–2,25 µM); **B** – Nitritų ir nitratų koncentracija HUVEC ląstelių auginimo terpėje po 5 min. veikimo žemo dažnio UG ir 24 val. inkubacijos losartanu (0,75–2,75 µM). Duomenys pateikiami kaip mediana su reikšmių intervalu ($n = 4$). * $p < 0,05$, palyginti su kontrole (kontrolinė grupė – ląstelės 5 min. veiktos žemo dažnio UG ir inkubuotos auginimo terpėje be RAS veikiančių junginių). # $p < 0,05$ tarp UG veiktų ir neveiktų grupių.

3.1.8. Žemo dažnio UG ir RAS inhibitorių poveikis inkstų proksimalinių kanalėlių epitelinių ląstelių funkcijai

Poveikis ląstelių gyvybingumui

Inkstų proksimalinių kanalėlių epitelinių ląstelių RPTEC/TERT1 metabolinis gyvybingumas buvo vertintas po 5 min. poveikio žemo dažnio ir intensyvumo UG bei 24 val. inkubacijos su kaptoprilium bei losartanu. Kaptoprilio 0,25–2,25 µM koncentracijos ląstelių terpėje nedarė reikšmingos įtakos ląstelių gyvybingumui, tiek veikiant kartu su žemo dažnio UG, tiek be jo (3.1.8.1 pav. A). Žemo dažnio UG kartu su losartanu (0,75–2,75 µM) didino ląstelių gyvybingumą, palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis ($p = 0,03$) (3.1.8.1 pav. B). Tačiau vien žemo dažnio UG poveikis ląstelėms, nenau-do-jant vaistų, tokio efekto nesukėlė.

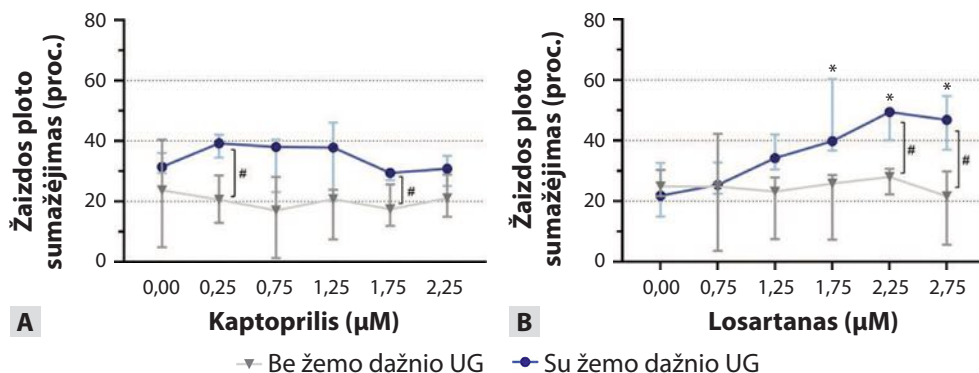


3.1.8.1 pav. Žemo dažnio UG ir RAS veikiančių junginių poveikis RPTEC/TERT1 ląstelių gyvybingumui

A – RPTEC/TERT1 ląstelių metabolinis gyvybingumas procentais po 5 min. veikimo žemo dažnio UG ir 24 val. inkubacijos su kaptopriliumi (0,25–2,25 µM); **B** – RPTEC/TERT1 ląstelių metabolinis gyvybingumas procentais po 5 min. veikimo žemo dažnio UG ir 24 val. inkubacijos su losartanu (0,75–2,75 µM). Duomenys pateikiami kaip mediana su reikšmių intervalu ($n = 4$). * $p < 0,05$, palyginti su kontrole (kontrolinė grupė – ląstelės 5 min. veiktos žemo dažnio UG ir inkubuotos auginimo terpėje be RAS veikiančių junginių, prilyginamos 100 proc. gyvybingumui).

Poveikis ląstelių migracijai

RPTEC/TERT1 ląstelėse buvo atliktas „žaizdos gijimo“ tyrimas – ląstelių vienasluoksnyje buvo sudaryta žaizda, kuri buvo 5 min. veikta žemo dažnio UG ir 4 val. inkubuota su skirtingomis terapinėmis kaptoprilio ir losartano koncentracijomis. Kaptoprilis kartu su žemo dažnio UG nedarė įtakos ląstelių migracijai (3.1.8.2 pav. A). Tačiau veikiant 0,25 ir 1,75 µM kaptoprilio koncentracijomis, stebėtas reikšmingas žaizdos ploto mažėjimas tarp žemo dažnio UG veiktų ir neveiktų ląstelių (atitinkamai, $p = 0,035$, $p = 0,046$). Kita vertus, aukštesnė losartano koncentracija veikiant žemo dažnio UG pagerino „žaizdos gijimą“ (3.1.8.2 pav. B). Esant 2,25 ir 2,75 µM losartano koncentracijoms ir veikiant žemo dažnio UG, ląstelių migracija buvo didesnė, palyginti su atitinkamų koncentracijų kontrolinėmis ląstelėmis nepaveikus UG (atitinkamai, $p = 0,004$, $p = 0,037$).

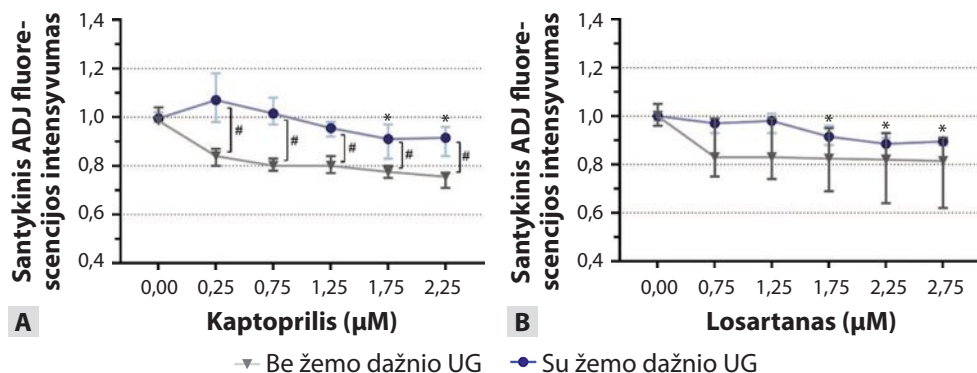


3.1.8.2 pav. Žemo dažnio UG ir RAS veikiančių junginių poveikis RPTEC/TERT1 ląstelių migracijai

A – Žaizdos ploto RPTEC/TERT1 ląstelėse sumažėjimas procentais po 5 min. veikimo žemo dažnio UG ir 4 val. inkubacijos su kaptoprilium (0,25–2,25 μM); **B** – Žaizdos ploto RPTEC/TERT1 ląstelėse sumažėjimas procentais po 5 min. veikimo žemo dažnio UG ir 4 val. inkubacijos su losartanu (0,75–2,75 μM). Duomenys pateikiami kaip mediana su reikšmių intervalu ($n = 4$). * $p < 0,05$, palyginti su kontrole (kontrolinė grupė – ląstelės 5 min. veiktos žemo dažnio UG ir inkubuotos auginimo terpėje be RAS veikiančių junginių). # $p < 0,05$ tarp UG veiktų ir neveiktų grupių.

Poveikis aktyvių deguonies junginių susidarymui

Kaptoprilio 1,75 ir 2,25 μM koncentracijos kartu su žemo dažnio UG mažino ADJ kiekį, palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis ($p = 0,03$) (3.1.8.3 pav. A). Be to, ląstelėse, esant visoms terapinėmis kaptoprilio koncentracijomis bei žemo dažnio UG buvo nustatytas reikšmingai didesnis ADJ išsiskyrimas, palyginti su UG neveiktomis ląstelėmis. Losartanas kartu su žemo dažnio UG taip pat mažino ADJ sintezę esant nuo 1,75 iki 2,75 μM losartano koncentracijoms ($p = 0,03$), tačiau veikiant tik žemo dažnio UG, toks poveikis nenustatytas (3.1.8.3 pav. B).

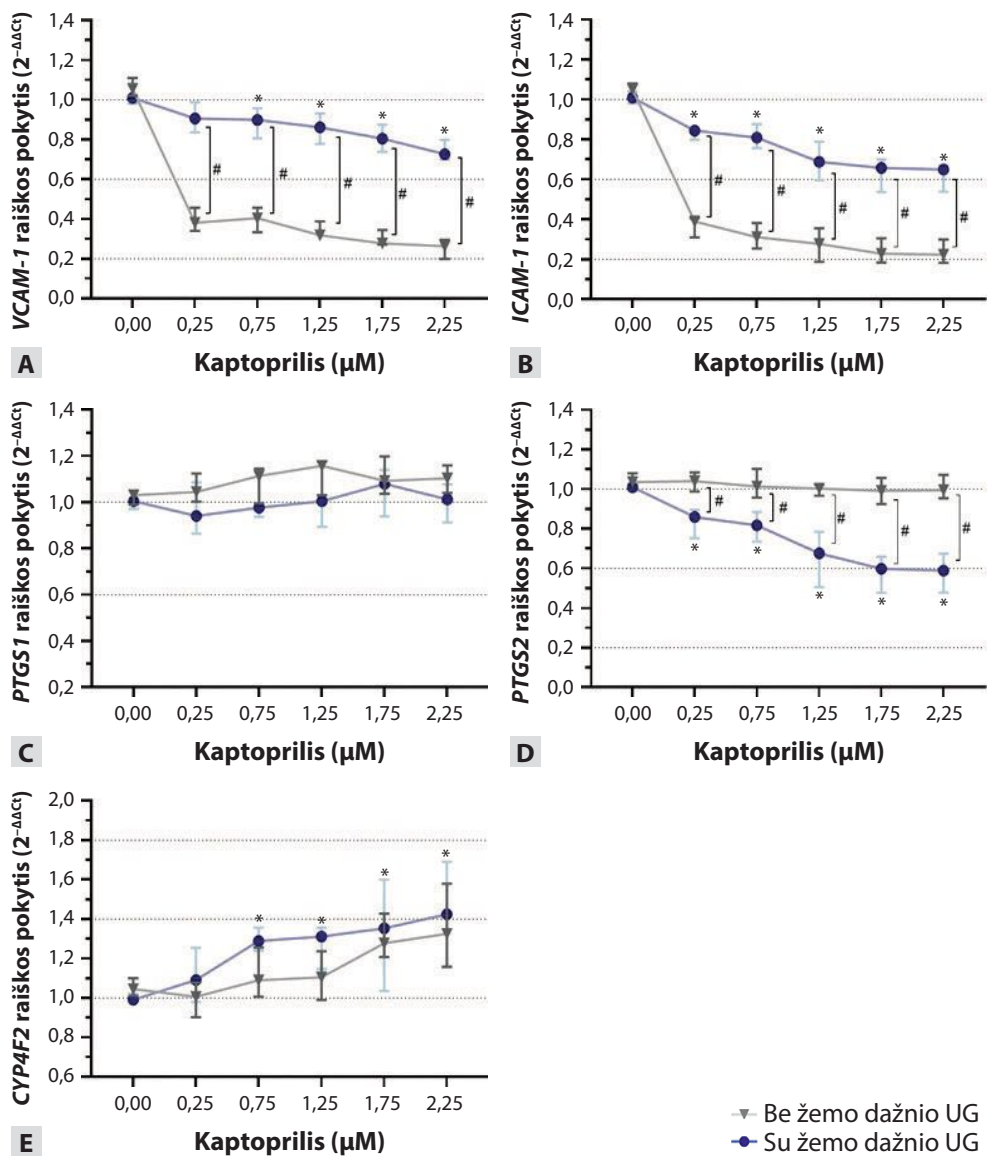


3.1.8.3 pav. Žemo dažnio UG ir RAS veikiančių junginių poveikis RPTEC/TERT1 ląstelių ADJ susidarymui

A – Santykinis ADJ fluorescencijos intensyvumas RPTEC/TERT1 ląstelėse po 5 min. veikimo žemo dažnio UG ir 1 val. inkubacijos kaptoprilu (0,25–2,25 μM); **B** – Santykinis ADJ fluorescencijos intensyvumas RPTEC/TERT1 ląstelėse po 5 min. veikimo žemo dažnio UG ir 1 val. inkubacijos losartanu (0,75–2,75 μM). Duomenys pateikiami kaip mediana su reikšmių intervalu ($n = 4$). * $p < 0,05$, palyginti su kontrole (ląstelės 5 min. veiktos žemo dažnio UG ir inkubuotos auginimo terpėje be RAS veikiančių junginių). # $p < 0,05$ tarp UG veikėtų ir neveiktų grupių.

3.1.9. Žemo dažnio UG ir RAS inhibitorių poveikis su uždegimu ir eikozanoidų metabolizmu susijusių žymenų genų raiškai endotelio ląstelėse

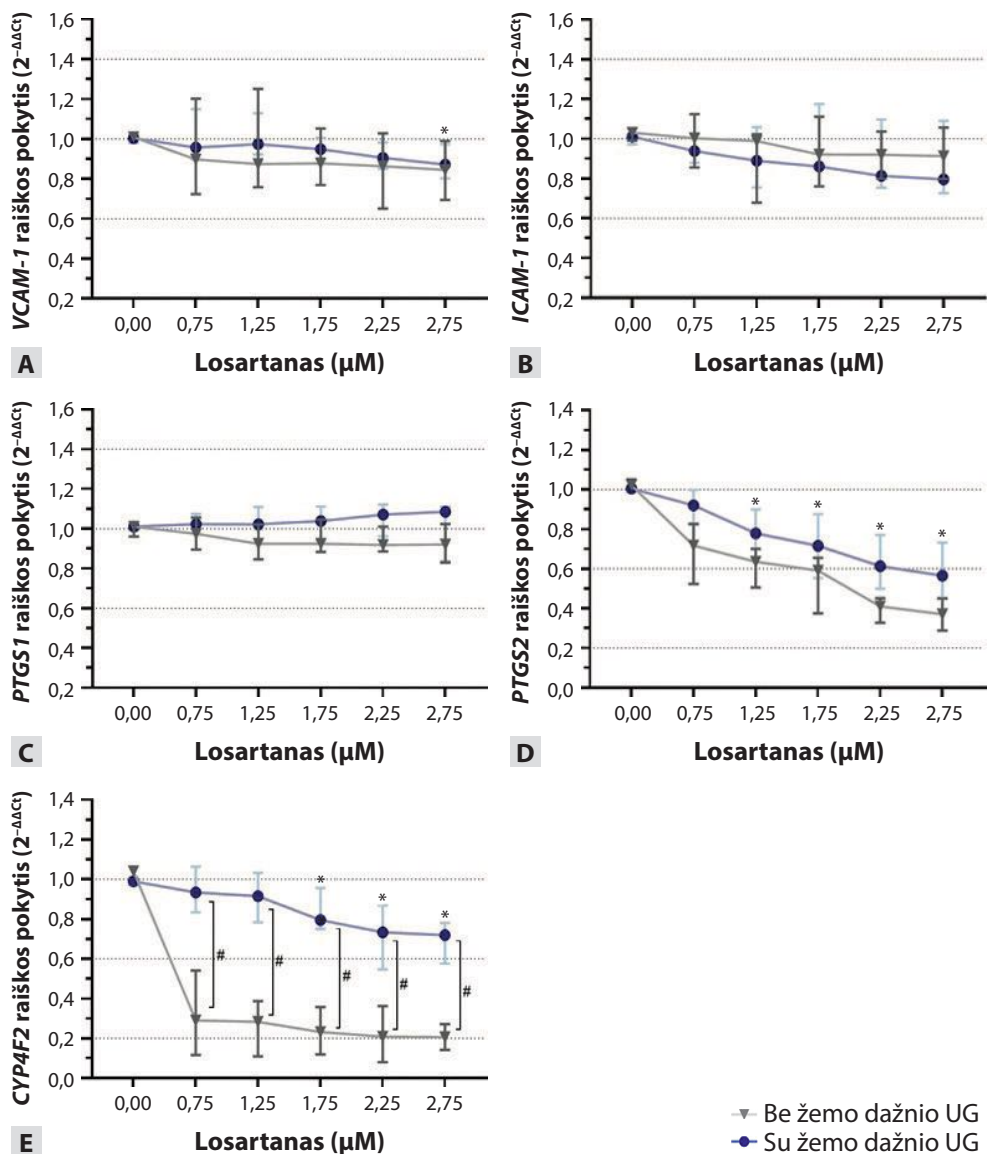
Kaptoprilio ir losartano kartu su žemo dažnio UG poveikis *VCAM-1*, *ICAM-1*, *PTGS1*, *PTGS2* ir *CYP4F2* genų transkripcijai buvo analizuotas vertinant šių genų mRNR raišką HUVEC ląstelėse. Žemo dažnio UG darė įtaką *VCAM-1*, *ICAM-1* ir *PTGS2* raiškai HUVEC ląstelėse (3.1.9.1 pav. A, B, D). Veikiant kaptoprilu kartu su žemo dažnio UG, mažėjo *VCAM-1*, *ICAM-1* ir *PTGS2* raiška priklausomai nuo vaisto koncentracijos, palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis, veiktomis tik žemo dažnio UG ($p = 0,03$). Veikiant kaptoprilu ir žemo dažnio UG, *PTGS2* raiška buvo slopinama labiau, nei veikiant tik kaptoprilu be žemo dažnio UG poveikio. Priešingai, kaptoprilis kartu su žemo dažnio UG nedarė įtakos *PTGS1* raiškai (3.1.9.1 pav. C). Kaptoprilio nuo 0,75 iki 2,25 μM koncentracijos kartu su žemo dažnio UG didino *CYP4F2* raišką, palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis ($p = 0,03$) (3.1.9.1 pav. E). Stipriausias poveikis *CYP4F2* raiškai stebėtas esant 2,25 μM kaptoprilio koncentracijai – raiška didėjo 1,42 karto ($p = 0,03$).



3.1.9.1 pav. Žemo dažnio UG ir terapinių kaptoprilio koncentracijų (0,25–2,25 μM) poveikis HUVEC ląstelių VCAM-1, ICAM-1, PTGS1, PTGS2 ir CYP4F2 genų raiškos pokyčiams

Genų raiška išreiškiama pokyčiais kartais ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) lyginant su kontrole (kontrolinė grupė – ląstelės 5 min. veiktos žemo dažnio UG ir inkubuotos auginimo terpėje be kaptoprilio). Duomenys pateikiami kaip mediana su reikšmių intervalu ($n = 4$). * $p < 0,05$, palyginti su kontrole. # $p < 0,05$ tarp UG veiktų ir neveiktų grupių.

Losartano derinys su žemo dažnio UG nedarė reikšmingos įtakos *ICAM-1* ir *PTGS1* raiškai HUVEC ląstelėse (3.1.9.2 pav. B, C). Tik 2,75 μ M losartano koncentracija ir žemo dažnio UG mažino *VCAM-1* raišką, palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis ($p = 0,03$) (3.1.9.2 pav. A). Be to, losartanas kartu su žemo dažnio UG mažino *PTGS2* raišką priklausomai nuo vaisto koncentracijos, palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis (3.1.9.2 pav. D). *CYP4F2* raiška losartanu paveiktose ląstelėse reikšmingai skyrėsi priklausomai nuo to, ar buvo taikytas žemo dažnio UG. Vis dėlto tik nuo 1,75 iki 2,75 μ M losartano derinys su žemo dažnio UG mažino *CYP4F2* raišką, palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis ($p = 0,03$) (3.1.9.2 pav. E).



3.1.9.2 pav. Žemo dažnio UG ir terapinių losartano koncentracijų (0,75–2,75 μM) poveikis HUVEC ląstelių VCAM-1, ICAM-1, PTGS1, PTGS2 ir CYP4F2 genų raiškos pokyčiams

Genų raiška išreiškiama pokyčiais kartais ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) lyginant su kontrole (kontrolinė grupė – ląstelės 5 min. veiktos žemo dažnio UG ir inkubuotos auginimo terpėje be losartano). Duomenys pateikiami kaip mediana su reikšmių intervalu ($n = 4$). * $p < 0,05$, palyginti su kontrole. # $p < 0,05$ tarp UG veiktų ir neveiktų grupių.

3.1.10. RAS inhibitorių poveikis 20-HETE susidarymui endotelio ląstelėse

Siekiant įvertinti, ar RAS moduliacija turi įtakos 20-HETE išsiskyrimui endotelio ląstelėse, HUVEC ląstelės buvo paveiktos skirtingomis kaptoprilio, losartano ir MLN-4760 koncentracijomis 24 val. laikotarpiui. 20-HETE koncentracijos ląstelių kultūrų terpės ekstraktuose pateiktos 3.1.10.1 lentelėje. Esant 1,25–2,25 μM kaptoprilio koncentracijai buvo stebimas reikšmingas 20-HETE koncentracijos sumažėjimas iki 6,45–6,93 ng/ml, palyginti su kontrolinių ląstelių verte (13,06 (10,28–15,23) ng/ml, $p = 0,029$). Priešingai, visame tirtame koncentracijų intervale (0,75–2,75 μM) losartanas nedarė reikšmingos įtakos 20-HETE išsiskyrimui. MLN-4760 parodė nuo dozės priklausomą 20-HETE koncentracijos didėjimą. Kontrolinėse ląstelėse 20-HETE koncentracija siekė 12,85 (11,72–15,51) ng/ml, o esant 0,1–1 μM MLN-4760 koncentracijoms didėjo iki 17,83–20,2 ng/ml ($p = 0,029$). Didžiausias 20-HETE koncentracijos didėjimas siekė 1,6 karto, palyginti su kontrolinių ląstelių lygiu.

3.1.10.1 lentelė. RAS inhibitorių poveikis 20-HETE koncentracijoms HUVEC ląstelių kultūrose

Ląstelių mėginiai	20-HETE koncentracija (ng/ml)		p^*
	mediana	min.–maks. reikšmė	
Kontrolinės ląstelės	13,06	10,28–15,23	–
0,25 μM kaptoprilis	7,32	4,31–14,1	0,200
0,75 μM kaptoprilis	7,93	6,22–15,44	0,343
1,25 μM kaptoprilis	6,93	6,13–9,62	0,029
1,75 μM kaptoprilis	6,67	5,55–9,54	0,029
2,25 μM kaptoprilis	6,45	5,32–7,96	0,029
Kontrolinės ląstelės	11,59	5,1–17,41	–
0,75 μM losartanas	13,79	10,64–16,7	0,686
1,25 μM losartanas	13,27	11,27–19,2	0,486
1,75 μM losartanas	12,18	7,62–23,32	0,886
2,25 μM losartanas	14,63	9,73–15,64	0,686
2,75 μM losartanas	14,91	10,54–16,01	0,686

3.1.10.1 lentelės tęsinys

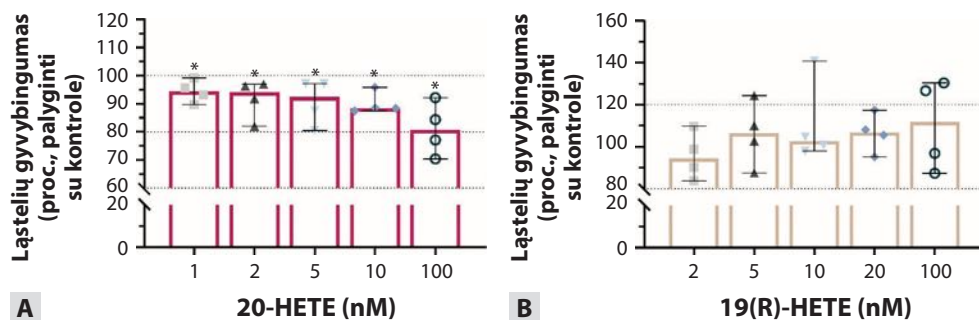
Ląstelių mėginiai	20-HETE koncentracija (ng/ml)		<i>p</i> *
	mediana	min.–maks. reikšmė	
Kontrolinės ląstelės	12,85	11,72–15,51	–
0,05 μM MLN-4760	15,0	10,71–18,33	0,486
0,1 μM MLN-4760	17,83	15,88–23,82	0,029
0,25 μM MLN-4760	18,9	15,9–21,27	0,029
0,5 μM MLN-4760	19,08	16,34–22,35	0,029
1 μM MLN-4760	20,2	16,55–22,84	0,029

**p* reikšmė palyginti su kontroline grupe (ląstelės inkubuotos auginimo terpėje be RAS inhibitorių), atlikus *n* = 4 nepriklausomus eksperimentus.

3.1.11. Hidroksieikozatetraeno rūgščių poveikis ląstelių funkcijai

Poveikis endotelio ląstelėms

Siekiant įvertinti CYP450 kilmės eikozanoidų – hidroksieikozatetraeno rūgščių – poveikį skirtingų tipų ląstelių funkcijai, buvo atliktas HUVEC, RPTEC/TERT1 bei HepG2 ląstelių metabolinio aktyvumo tyrimas MTT metodu. Ląstelių kultūros buvo veikiamos 20-HETE ir 19(R)-HETE. 20-HETE turėjo reikšmingą neigiamą poveikį endotelio ląstelių gyvybingumui (3.1.11.1 pav. A). Jau esant 1 nM koncentracijai, HUVEC metabolinis aktyvumas reikšmingai mažėjo, palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis (*p* = 0,029). Gyvybingumo mažėjimas išliko su visomis tirtomis koncentracijomis (iki 100 nM). Didžiausias poveikis stebėtas paveikus 100 nM – HUVEC metabolinis aktyvumas mažėjo 19 proc. (*p* = 0,029). Skirtingai nuo 20-HETE, jos antagonistas 19(R)-HETE reikšmingo poveikio HUVEC ląstelių gyvybingumui nedarė (3.1.11.1 pav. B).

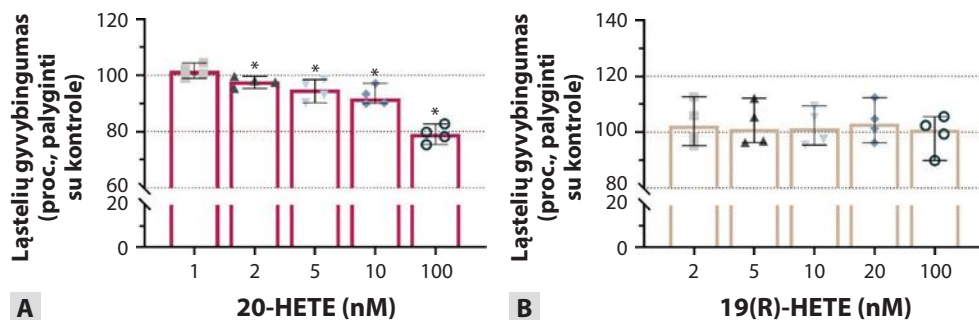


3.1.11.1 pav. Hidroksieikozatetraeno rūgščių poveikis HUVEC ląstelių gyvybingumui

A – HUVEC metabolinis gyvybingumas procentais po 24 val. veikimo 20-HETE (1–100 nM); **B** – HUVEC metabolinis gyvybingumas procentais po 24 val. veikimo 19(R)-HETE (2–100 nM). Duomenys pateikiami kaip mediana su reikšmių intervalu ($n = 4$). $*p < 0,05$, palyginti su kontrole (kontrolinė grupė – ląstelės inkubuotos auginimo terpėje be hidroksieikozatetraeno rūgščių, prilyginamos 100 proc. gyvybingumui).

Poveikis inkstų ląstelėms

Vertinant 20-HETE poveikį RPTEC/TERT1 ląstelių gyvybingumui, nustatyta, kad ląstelės veikiant 2–100 nM koncentracijomis, metabolinis aktyvumas reikšmingai sumažėjo, palyginti su kontrole ($p = 0,029$) (3.1.11.2 pav. A). Didžiausias poveikis stebėtas, inkubuojant ląsteles su 100 nM 20-HETE – gyvybingumas sumažėjo 21 proc., palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis ($p = 0,029$). Kita vertus, 19(R)-HETE 2–100 nM koncentracijos RPTEC/TERT1 ląstelių metabolinio aktyvumo neveikė (3.1.11.2 pav. B).

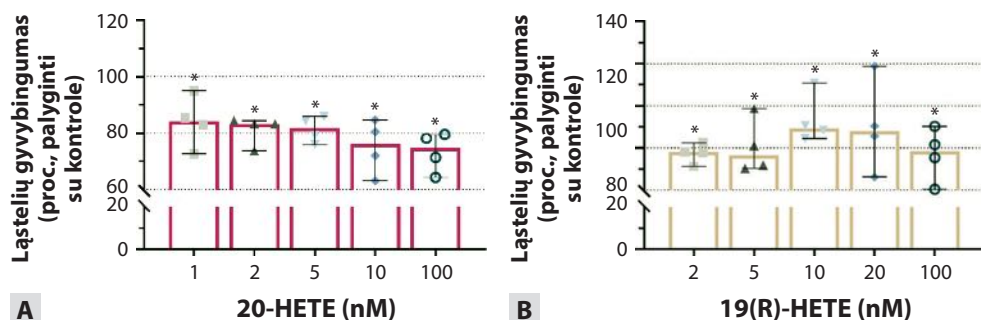


3.1.11.2 pav. Hidroksieikozatetraeno rūgščių poveikis RPTEC/TERT1 ląstelių gyvybingumui

A – RPTEC/TERT1 ląstelių metabolinis gyvybingumas procentais po 24 val. veikimo 20-HETE (1–100 nM); **B** – RPTEC/TERT1 ląstelių metabolinis gyvybingumas procentais po 24 val. veikimo 19(R)-HETE (2–100 nM). Duomenys pateikiami kaip mediana su reikšmių intervalu ($n = 4$). $*p < 0,05$, palyginti su kontrole (kontrolinė grupė – ląstelės inkubuotos auginimo terpėje be hidroksieikozatetraeno rūgščių, prilyginamos 100 proc. gyvybingumui).

Poveikis kepenų ląstelėms

Vertinant 20-HETE poveikį HepG2 ląstelėms, stebėtas panašus poveikis kaip ir su HUVEC bei RPTEC/TERT1 ląstelėmis – su visomis tirtomis koncentracijomis (1–100 nM) metabolinis ląstelių gyvybingumas buvo reikšmingai sumažėjęs, palyginti su kontrole ($p = 0,029$) (3.1.11.3 pav. A). Didžiausias poveikis, kaip ir su HUVEC bei RPTEC/TERT1 ląstelėmis, stebėtas paveikus 100 nM – HepG2 metabolinis aktyvumas mažėjo 25 proc. ($p = 0,029$). 19(R)-HETE poveikis buvo priešingas stebėtam su 20-HETE – paveikus ląsteles 2–100 nM 19(R)-HETE metabolinis ląstelių aktyvumas buvo padidėjęs, palyginti su kontrole ($p = 0,029$) (3.1.11.3 pav. B). Didžiausią poveikį gyvybingumui turėjo inkubacija su 10 nM 19(R)-HETE – ląstelių gyvybingumas didėjo 29 proc., palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis ($p = 0,029$).



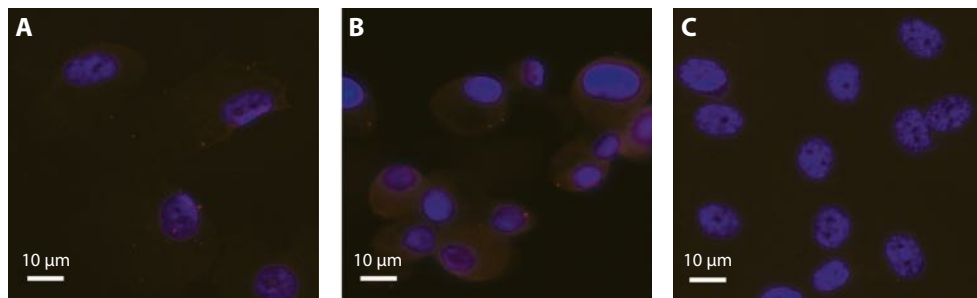
3.1.11.3 pav. Hidroksieikozatetraeno rūgščių poveikis HepG2 ląstelių gyvybingumui

A – HepG2 ląstelių metabolinis gyvybingumas procentais po 24 val. veikimo 20-HETE (1–100 nM); **B** – HepG2 ląstelių metabolinis gyvybingumas procentais po 24 val. veikimo 19(R)-HETE (2–100 nM). Duomenys pateikiami kaip mediana su reikšmių intervalu ($n = 4$). * $p < 0,05$, palyginti su kontrole (kontrolinė grupė – ląstelės inkubuotos auginimo terpėje be hidroksieikozatetraeno rūgščių, prilyginamos 100 proc. gyvybingumui).

3.1.12. Hidroksieikozatetraeno rūgščių poveikis receptoriaus *GPR75* raiškai

Prieš vertinant hidroksieikozatetraeno rūgščių poveikį *GPR75* geno raiškai, pirmiausia buvo atliktas *GPR75* baltymo lokalizacijos tyrimas fiksuotose HUVEC ir HepG2 ląstelėse netiesioginės imunofluorescencijos metodu. Abiejose ląstelių kultūrose nustatytas silpnas *GPR75* imunofluorescencinis signalas, pasiskirstęs daugiausia citoplazmoje, be aiškiai išreikštos membrininės ar branduolio srities lokalizacijos (3.1.12.1 pav. A, B). Tiek endotelio, tiek kepenų ląstelėse buvo nustatytas nedidelis *GPR75* raiškos lygis, atitinkantis receptoriaus audinių specifiškumą ir jo santykinai žemą raišką ne neuroninėse ląstelėse. Siekiant įvertinti dažymo specifiškumą, atlikta neigia-

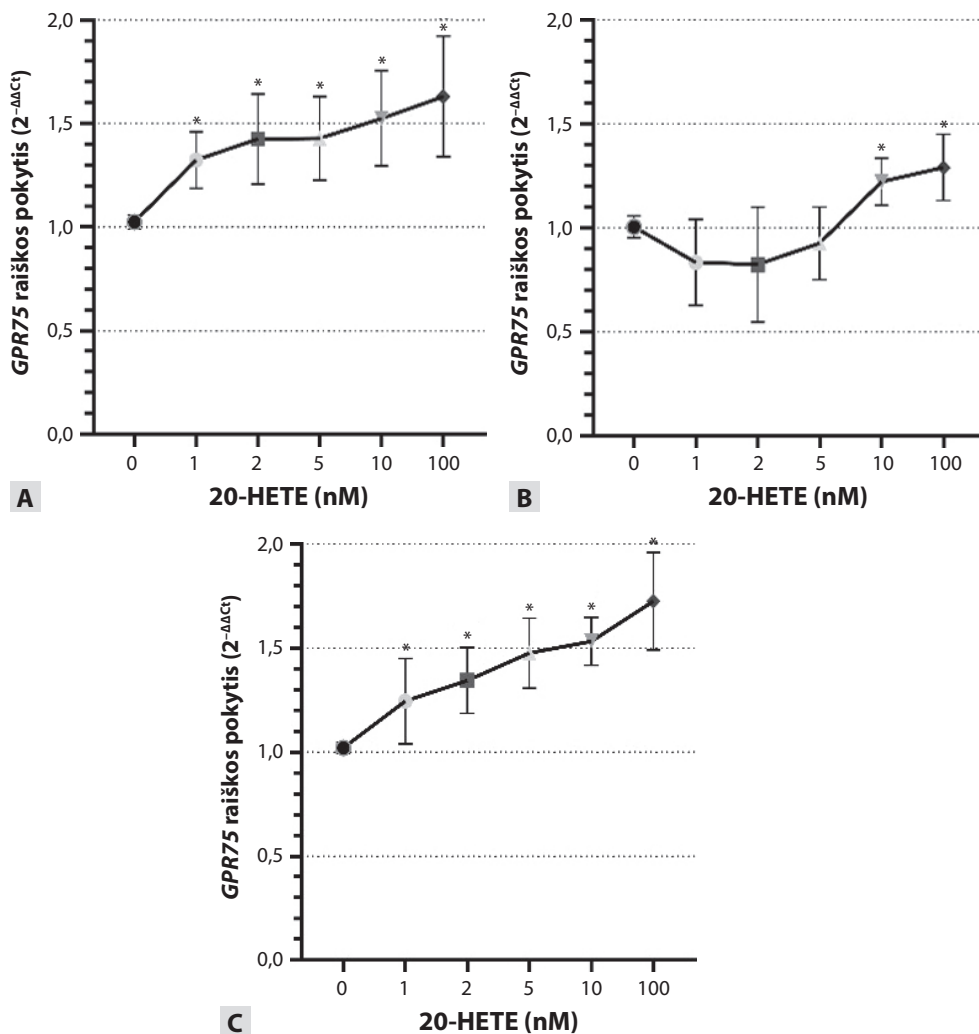
ma kontrolė, kai ląstelės dažytos tik antriniu IgG antikūnu (3.1.12.1 pav. C). Kontroliniame mėginyje nespecifinis fluorescencinis signalas nebuvo stebėtas, patvirtinant, kad stebėtas silpnas signalas HUVEC ir HepG2 ląstelėse nėra susijęs su foniniu dažymu.



3.1.12.1 pav. *GPR75 imunofluorescencinė raiška ląstelių kultūrose*

A – GPR75 raiškos vertinimas netiesioginiu imunofluorescencijos metodu HUVEC ląstelėse; **B** – GPR75 raiškos vertinimas imunofluorescencijos metodu HepG2 ląstelėse; **C** – Neigiamą kontrolę, dažyta tik antriniu IgG antikūnu, skirta įvertinti nespecifinį fluorescencijos signalą.

Šie rezultatai sudarė metodinį pagrindą tolesniems tyrimams, vertinantiems, kaip CYP450 kilmės eikozanoidai – 20-HETE ir 19(R)-HETE – moduliuoja *GPR75* raišką skirtingų tipų ląstelėse. Ištyrus *GPR75* mRNR raišką HUVEC ląstelėse (3.1.12.2 pav. A) 20-HETE sukėlė nuoseklų *GPR75* raiškos didėjimą. Didžiausias poveikis stebėtas 100 nM sąlygomis, kai *GPR75* raiška didėjo 1,62 karto, palyginti su kontrolinėmis ląstelėmis ($p = 0,029$). RPTEC/TERT1 ląstelėse (3.1.12.2 pav. B) reikšmingo atsako veikiant koncentracijomis nuo 1 iki 5 nM nenustatyta, tačiau 20-HETE poveikis tapo ryškesnis esant nuo 10 iki 100 nM koncentracijoms. Veikiant 100 nM koncentracija, *GPR75* raiška didėjo 1,3 karto ($p = 0,029$). HepG2 ląstelėse (3.1.12.2 pav. C) stebėta tendencija buvo panaši į endotelio ląstelių atsaką: *GPR75* raiškos pokytis taip pat nustatytas esant nuo 1 iki 100 nM koncentracijoms, o 100 nM koncentracija lėmė didžiausią *GPR75* raiškos didėjimą. Kita vertus, 19(R)-HETE neturėjo reikšmingo *GPR75* raiškos pokyčio nė vienoje iš tirtų ląstelių linijų. Tai leidžia manyti, jog 19(R)-HETE nedaro tiesioginio poveikio *GPR75* transkripcijai, o jos biologinis poveikis gali būti susijęs su konkurenciniu receptoriaus ligandų vietų blokavimu ir signalų perdavimo slopinimu.



3.1.12.2 pav. 20-HETE (1–100 nM) poveikis ląstelių kultūrų GPR75 geno raiškos pokyčiams

A – HUVEC ląstelių GPR75 raiškos pokytis po 24 val. veikimo 20-HETE (1–100 nM); **B** – RPTEC/TERT1 ląstelių GPR75 raiškos pokytis po 24 val. veikimo 20-HETE (1–100 nM); **C** – HepG2 ląstelių GPR75 raiškos pokytis po 24 val. veikimo 20-HETE (1–100 nM). Genų raiška išreiškiama pokyčiu kartais ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), palyginti su kontrole (kontrolinė grupė – ląstelės inkubuotos auginimo terpėje be 20-HETE). Duomenys pateikiami kaip mediana su reikšmių intervalu ($n = 4$). * $p < 0,05$, palyginti su kontrole.

In vitro tyrimų su ląstelių kultūromis apibendrinimas

Pirmojo etapo *in vitro* eksperimentai, atlikti HUVEC, RPTEC/TERT1 ir HepG2 ląstelių modeliuose, leido nustatyti biožymenis, kurie atspindėjo RAS moduliaciją ir galimus su uždegimu bei eikozanoidų metabolizmu susijusius mechanizmus. Ląstelių funkcijos ir genų raiškos tyrimai parodė, kad RAS aktyvumo pokyčiai yra glaudžiai susiję su *ACE2* reguliacija bei 20-HETE sintezės pokyčiais, o šie parametrai nuosekliai kito esant farmakologinei RAS inhibicijai. *ACE2* buvo vertintas kaip centrinis RAS biožymuo, galintis parodyti RAS aktyvumą, o 20-HETE pasirinktas dėl jo sąsajų su RAS ir vaidmens šios sistemos reguliuojamuose bei su uždegimu susijusiuose biologiniuose procesuose. Be to, galimybė šiuos biožymenis nustatyti kraujo plazmoje suteikia pagrindą jų taikymui transliaciniuose tyrimuose. Todėl *ACE2* ir 20-HETE buvo atrinkti kaip perspektyviausi kandidatai tolesnei analizei, siekiant įvertinti jų sąsajas su klinikinėmis IŠL formomis ir RAS inhibitorių vartojimu ligonių imtyje.

3.2. Tyrimų su žmonių biologine medžiaga rezultatai

3.2.1. Tiriamųjų imtis ir grupių charakteristika

Iš viso į tyrimą buvo įtraukti 176 tiriamieji. Ligonų, sirgusių IŠL, buvo 122. Iš jų ŪKS sirgo 92, o SKA – 30 ligonių. Palyginamoji grupė sudaryta iš sveikų tiriamųjų, nesirgusių IŠL ($n = 54$).

Tiriamųjų grupių charakteristika pateikta 3.2.1.1 lentelėje. Vyrai sudarė didžiąją dalį visų tiriamųjų. Tiriamųjų grupės pagal lytį reikšmingai nesiskyrė. Tiriamųjų amžiaus mediana buvo 70 metų. Palyginamosios grupės tiriamieji buvo vyresni nei SKA sergantys ($p < 0,001$).

3.2.1.1 lentelė. Tiriamųjų grupių demografiniai duomenys

Veiksnyss	Palyginamoji ($n = 54$)	SKA ($n = 30$)	ŪKS ($n = 92$)	Visi tiriamieji ($n = 176$)	p
Lytis, n (proc.)					
Vyrai	30 (55,6)	23 (76,7)	67 (72,8)	120 (68,2)	0,053 ¹
Moterys	24 (44,4)	7 (23,3)	25 (27,2)	56 (31,8)	
Amžius (metai), mediana (min.–maks.)	71 (46–72) ^a	62 (48–80) ^a	66,5 (39–85,2)	70 (39–85,2)	< 0,001 ²

p – statistinio reikšmingumo lygmuo tarp palyginamosios, SKA ir ŪKS grupių. ¹ taikytas Fisher–Freeman–Halton testas; ² taikytas Kruskal–Wallis testas. Statistinio reikšmingumo lygmuo pritaikius Bonferroni korekciją po porinio pažymėtų grupių palyginimo taikant Mann–Whitney U testą: ^a $p < 0,001$. SKA – stabili krūtinės angina; ŪKS – ūmus koronarinis sindromas.

Tarp tiriamųjų grupių buvo atliktas antropometrinių, gyvensenos ir klininių rodiklių palyginimas (3.2.1.2 lentelė). Nustatyti reikšmingi skirtumai pagal ūgį ir svorį ($p < 0,001$). Tiriamųjų grupėse nustatytos KMI reikšmės atitiko antsvorio arba I laipsnio nutukimo intervalą. ŪKS sergantys ligoniai turėjo mažesnę diastolinę AKS ($p = 0,009$), tačiau didesnę ŠSD ($p = 0,006$), palyginti su kontroline grupe. Tiriamųjų rūkymo įpročių pasiskirstymas pagal grupes parodė, kad didžiausia rūkančiųjų dalis nustatyta SKA grupėje (30 proc.), o mažiausia – palyginamojoje grupėje (1,9 proc.). MI anamnezėje nustatytas 57,6 proc. ŪKS sergančių ligonių, iš kurių 41,3 proc. patyrė MI su ST segmento pakilimu. ŪKS grupėje AH nustatyta rečiau nei SKA grupėje ($p = 0,003$). Cukrinis diabetas nustatytas 32,6 proc. ŪKS sergančių ligonių, tuo tarpu palyginamosios grupės asmenys šia liga nesirgo.

3.2.1.2 lentelė. Tiriamųjų antropometriniai, gyvensenos ir klinikiniai duomenys

Veiksny	Palyginamoji	SKA	ŪKS	<i>p</i>
Antropometriniai ir hemodinaminiai rodikliai , mediana (min.–maks.)				
Ūgis, cm	164,3 (144–178) ^{a, b}	172,5 (156–195) ^a	172 (150–195) ^b	< 0,001¹
Svoris, kg	77,3 (54–122) ^{c, d}	88 (60–123) ^c	86 (55–164) ^d	< 0,001¹
KMI, kg/m ²	28,9 (21,4–42,5)	28,4 (21,3–38,7)	29 (19,7–43,1)	0,956
Sistolinis AKS, mm Hg	135,3 (107–181)	133,5 (102–189)	135,5 (97–200)	0,69
Diastolinis AKS, mm Hg	84,7 (61–109) ^e	83 (65–110)	80 (52–128) ^e	0,01¹
ŠSD, k./min.	64,5 (44–99) ^f	68,5 (47–115)	70 (44–160) ^f	0,01¹
Rūkymas, <i>n</i> (proc.)				
Šiuo metu rūko	1 (1,9) ^{g, h}	9 (30,0) ^g	23 (25,0) ^h	< 0,001²
Anksčiau rūkė	0 (0,0)	7 (23,3)	0 (0,0)	–
Diagnozė, <i>n</i> (proc.)				
MI anamnezėje	0 (0,0)	0 (0,0)	53 (57,6)	–
MI, kai ST segmentas pakilęs	0 (0,0)	0 (0,0)	38 (41,3)	–
Gretutinės ligos, <i>n</i> (proc.)				
AH	41 (75,9) ⁱ	28 (93,3) ^j	34 (37,0) ^{ij}	< 0,001²
Cukrinis diabetas	0 (0,0)	6 (20,0)	30 (32,6)	–

p – statistinio reikšmingumo lygmuo palyginus palyginamąją, SKA ir ŪKS grupes. ¹ taikytas *Kruskal–Wallis* testas; ² taikytas *Fisher–Freeman–Halton* testas. Statistinio reikšmingumo lygmuo pritaikius Bonferroni korekciją po porinio pažymėtų grupių palyginimo taikant *Mann–Whitney U* ar *Fisher’s Exact* testą: ^{a, b, d, g–j} $p = 0,003$; ^c $p = 0,033$; ^e $p = 0,009$; ^f $p = 0,006$. AH – arterinė hipertenzija; AKS – arterinis kraujo spaudimas; KMI – kūno masės indeksas; MI – miokardo infarktas; SKA – stabili krūtinės angina; ŠSD – širdies susitraukimų dažnis; ŪKS – ūmus koronarinis sindromas.

Kliniškai reikšmingų VA pažeidimų (≥ 50 proc. stenozė) pasiskirstymas pagal segmentus, įvertinus VAA duomenis, pateikiamas 3 priede. Reikšmingi skirtumai tarp SKA ir ŪKS grupių nustatyti S7 ir S12 segmentuose, atitinkančiuose kairiosios priekinės nusileidžiančiosios arterijos vidurinę dalį ir dešinėsios VA vidurinę dalį. ŪKS grupėje kliniškai reikšmingos stenozės dažniau nustatytos S7 segmente (41,1 proc.), palyginti su SKA grupe (6,7 proc.; $p < 0,001$), taip pat S12 segmente (atitinkamai 40,0 proc. ir 13,3 proc.; $p = 0,007$).

Tiriamųjų laboratorinių kraujo tyrimų rodiklių pasiskirstymas pagal grupes pateiktas 3.2.1.3 lentelėje. Reikšmingi skirtumai tarp grupių nustatyti vertinant DTL ir MTL cholesterolio, hemoglobino, leukocitų, kreatinino koncentracijas bei AST aktyvumą. DTL ir MTL cholesterolio koncentracijos buvo žemesnės SKA grupėje (atitinkamai 1,2 (0,9–1,7) mmol/l ir 2,8 (0,7–5,0) mmol/l), palyginti su palyginamąja grupe (1,5 (0,9–2,4) mmol/l ir 3,6 (1,1–6,3) mmol/l; $p = 0,003$ ir $p = 0,03$). Kraujo hemoglobino koncentracija buvo žemesnė ŪKS grupėje (138,0 (94,0–165,0) g/l), palyginti su SKA grupe (147,0 (126,0–173,0) g/l; $p = 0,02$), o kreatinino koncentracija – aukštesnė ŪKS grupėje (94,0 (56,0–270,0) $\mu\text{mol/l}$), palyginti su SKA grupe (74,8 (55,0–120,0) $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,001$). Leukocitų skaičius buvo didesnis ŪKS grupėje ($8,5 (2,9–17,2) \times 10^9/\text{l}$), palyginti su SKA grupe ($6,9 (4,0–15,8) \times 10^9/\text{l}$; $p = 0,017$). Taip pat nustatytas didesnis AST aktyvumas ŪKS grupėje (31,0 (1,0–576,0) U/l), palyginti su SKA grupe (15,5 (2,0–64,4) U/l; $p = 0,004$).

3.2.1.3 lentelė. Tiriamųjų biocheminiai ir hematologiniai kraujo tyrimo rodikliai

Veiksny	Palyginamoji	SKA	ŪKS	<i>p</i>
Laboratoriniai tyrimai, mediana (min.–maks.)				
Gliukozė (mmol/l)	5,6 (4,3–7,0)	6,0 (4,7–7,3)	ND	0,305
DTL cholesterolis (mmol/l)	1,5 (0,9–2,4) ^a	1,2 (0,9–1,7) ^a	1,2 (1,1–1,4)	0,002¹
MTL cholesterolis (mmol/l)	3,6 (1,1–6,3) ^b	2,8 (0,7–5,0) ^b	2,7 (2,4–2,9)	0,012¹
Trigliceridai (mmol/l)	1,2 (0,5–4,5)	1,6 (0,6–4,3)	1,1 (1,0–1,2)	0,062
Hemoglobinas (g/l)	ND	147,0 (126,0–173,0)	138,0 (94,0–165,0)	0,002²
Leukocitai ($\times 10^9$)	ND	6,9 (4,0–15,8)	8,5 (2,9–17,2)	0,017²
Trombocitai ($\times 10^9$)	ND	235,0 (121,0–371,0)	216,0 (115,0–552,0)	0,107

3.2.1.3 lentelės tęsinys

Veiksny	Palyginamoji	SKA	ŪKS	p
CRB (mg/l)	ND	3,9 (0,5–7,0)	2,6 (1,0–177,9)	0,37
Kreatininas (μmol/l)	ND	74,8 (55,0–120,0)	94,0 (56,0–270,0)	< 0,001 ²
AST (U/l)	ND	15,5 (2,0–64,4)	31,0 (1,0–576,0)	0,004 ²
ALT (U/l)	ND	29,0 (9,0–57,0)	29,0 (2,0–138,0)	0,418
INR	ND	1,0 (1,0–1,1)	1,1 (0,9–2,5)	0,478

p – statistinio reikšmingumo lygmuo palyginus palyginamąją, SKA ir ŪKS grupes. ¹ taikytas *Kruskal–Wallis* testas; ² taikytas *Mann–Whitney* U testas. Statistinio reikšmingumo lygmuo pritaikius Bonferroni korekciją po porinio pažymėtų grupių palyginimo taikant *Mann–Whitney* U testą: ^a p = 0,003; ^b p = 0,03. ALT – alanino aminotransferazė; AST – aspartato aminotransferazė; CRB – C reaktyvusis baltymas; DTL cholesterolis – didelio tankio lipoproteinų cholesterolis; INR – tarptautinis normalizuotas santykis; MTL cholesterolis – mažo tankio lipoproteinų cholesterolis; ND – nėra duomenų; SKA – stabili krūtinės angina; ŪKS – ūmus koronarinis sindromas.

Tiriamųjų grupių vartoti vaistai pateikiami 3.2.1.4 lentelėje. Beveik visi ŪKS grupės ligoniai vartojo AKFi, statinus ir antiagregantus. Dažniausiai vartoti AKFi buvo perindoprilis ir zofenoprilis. Perindoprilį dažniau vartojo SKA grupės ligoniai (56,7 proc.), palyginti su ŪKS grupės ligoniais (30,4 proc.) (p = 0,003). ARB dažniau vartojo SKA grupės ligoniai (26,7 proc.), palyginti su ŪKS grupe (2,2 proc.) (p = 0,003). Statinai dažniausiai skirti ŪKS grupės ligoniams (97,8 proc.). Antiagregantus dažniau vartojo ŪKS ligoniai.

3.2.1.4 lentelė. Tiriamųjų vartoti vaistai

Veiksny	Palyginamoji	SKA	ŪKS	p
Skiriami vaistai, n (proc.)				
AKFi	0 (0,0)	18 (60,0) ^a	90 (97,8) ^a	< 0,001 ¹
Fosinoprilis	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (3,3)	–
Perindoprilis	0 (0,0)	17 (56,7) ^b	28 (30,4) ^b	< 0,001 ¹
Ramiprilis	0 (0,0)	1 (3,3)	1 (1,1)	–
Trandolaprilis	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,1)	–
Zofenoprilis	0 (0,0)	0 (0,0)	57 (62,0)	–
ARB	0 (0,0)	8 (26,7) ^c	2 (2,2) ^c	< 0,001 ¹
Statinai	2 (3,7) ^{d,e}	27 (90,0) ^d	90 (97,8) ^e	< 0,001 ¹
Atorvastatinas	ND	12 (40,0)	89 (96,7)	–
Rozuvastatinas	ND	15 (50,0)	1 (1,1)	–

3.2.1.4 lentelės tęsinys

Veiksny	Palyginamoji	SKA	ŪKS	p
Cholesterolio absorbcijos inhibitorius				
Ezetimibas	ND	9 (30,0)	1 (1,1)	–
Antiagregantai	0 (0,0)	18 (60,0) ^f	88 (95,7) ^f	< 0,001 ¹
Aspirinas	0 (0,0)	18 (60,0) ^g	82 (89,1) ^g	< 0,001 ¹
Aspirinas ir klopidoirelis	0 (0,0)	13 (43,3)	28 (30,4)	< 0,001 ¹
Aspirinas ir tikagreloras	0 (0,0)	0 (0,0)	59 (64,1)	–

p – statistinio reikšmingumo lygmuo palyginus palyginamąją, SKA ir ŪKS grupes. ¹ taikytas Fisher–Freeman–Halton testas. Statistinio reikšmingumo lygmuo pritaikius Bonferroni korekciją po porinio pažymėtų grupių palyginimo taikant Fisher's Exact testą: ^{a–g} p = 0,003. AKFi – angiotenziną konvertuojančio fermento inhibitorius; ARB – angiotenzino II receptorių blokatoriai; ND – nėra duomenų; SKA – stabili krūtinės angina; ŪKS – ūmus koronarinis sindromas.

Ligoniai, sergantys SKA ir ŪKS, vartojo antiagregantus, todėl jiems tirta trombocitų agregacija. Trombocitų agregacijos rodiklių reikšmės pateiktos 3.2.1.5 lentelėje. SKA grupės ligoniai turėjo aukštesnes, o ŪKS ligoniai – žemesnes trombocitų agregacijos tyrimų vertes.

3.2.1.5 lentelė. Tiriamųjų trombocitų agregacijos tyrimų rodikliai

Veiksny	Palyginamoji	SKA	ŪKS	p
Trombocitų agregacijos tyrimai, mediana (min.–maks.)				
Trombocitų agregacija paveikus ADF (proc. ^{Agr})	ND	67,5 (5,0–91,0)	19,0 (6,0–94,0)	< 0,001 ¹
Trombocitų agregacija paveikus epinefrinu (proc. ^{Agr})	ND	73,5 (8,0–95,0)	28,0 (6,0–94,0)	0,001 ¹

p – statistinio reikšmingumo lygmuo palyginus SKA ir ŪKS grupes. ¹ taikytas Mann–Whitney U testas. ADF – adenosino difosfatas; ND – nėra duomenų; proc.^{Agr} – procentinė agregacija; SKA – stabili krūtinės angina; ŪKS – ūmus koronarinis sindromas.

Atsižvelgiant į eksperimentiniuose ląstelių kultūrų modeliuose nustatytą RAS moduliacijos ir CYP4F2–20-HETE signalinės ašies sąveiką (ACE2/RAS–20-HETE), tolesnėje analizėje buvo įvertintos cirkuliuojančios ACE2 ir 20-HETE koncentracijos skirtingose klinikinėse tiriamųjų grupėse (3.2.1.6 lentelė). ŪKS sergančių ligonių ACE2 koncentracija (5,5 (2,1–28,2) ng/ml) buvo žemiausia ir reikšmingai žemesnė nei SKA bei palyginamosios grupės asmenų. ŪKS grupės ligoniai turėjo ir reikšmingai žemiausią 20-HETE koncentraciją kraujyje (6,1 (0,7–303,4) ng/ml), palyginti su SKA bei palyginamosios grupės asmenimis.

3.2.1.6 lentelė. ACE2 ir 20-HETE koncentracijos tiriamųjų kraujyje plazmoje

Veiksny	Palyginamoji	SKA	ŪKS	p
Koncentracijos nustatymas, mediana (min.–maks.)				
ACE2 (ng/ml)	8,0 (4,4–59,3) ^a	7,3 (4,2–21,3) ^b	5,5 (2,1–28,2) ^{a,b}	< 0,001 ¹
20-HETE (ng/ml)	52,7 (2,3–332,7) ^c	27,2 (6,4–368,5) ^d	6,1 (0,7–303,4) ^{c,d}	< 0,001 ¹

p – statistinio reikšmingumo lygmuo palyginus palyginamąją, SKA ir ŪKS grupes. ¹ taikytas *Kruskal–Wallis* testas. Statistinio reikšmingumo lygmuo pritaikius Bonferroni korekciją po porinio pažymėtų grupių palyginimo taikant *Mann–Whitney* U testą: ^{a, c, d} p = 0,003; ^b p = 0,027. 20-HETE – 20-hidroksieikozatetraeno rūgštis; ACE2 – angiotenziną konvertuojantis fermentas 2; SKA – stabili krūtinės angina; ŪKS – ūmus koronarinis sindromas.

CYP4F2 rs2108622, rs1558139, rs3093135 ir rs2074902 variantų genotipų ir alelių pasiskirstymas tiriamųjų grupėse pateiktas 3.2.1.7 lentelėje. Genotipų pasiskirstymas kiekvienoje tiriamojoje grupėje atitiko *Hardy–Weinberg* pusiausvyros dėsnį (p > 0,05). Reikšmingų genotipų pasiskirstymo skirtumų tarp palyginamosios, SKA ir ŪKS grupių nenustatyta.

3.2.1.7 lentelė. Tiriamųjų *CYP4F2* rs2108622, rs1558139, rs3093135 ir rs2074902 genotipų ir alelių pasiskirstymas

Veiksny	Palyginamoji	SKA	ŪKS	p
CYP4F2 rs2108622				
CC	33 (66,0)	15 (50,0)	57 (62,0)	0,69
CT	14 (28,0)	13 (43,3)	29 (31,5)	
TT	3 (6,0)	2 (6,7)	6 (6,5)	
C alelis	80 (80,0)	43 (71,7)	143 (77,7)	–
T alelis	20 (20,0)	17 (28,3)	41 (22,3)	
CYP4F2 rs1558139				
AA	8 (16,0)	6 (20,0)	18 (19,6)	0,824
AG	30 (60,0)	14 (46,7)	50 (54,3)	
GG	12 (24,0)	10 (33,3)	24 (26,1)	
A alelis	46 (46,0)	26 (43,3)	86 (46,7)	–
G alelis	54 (54,0)	34 (56,7)	98 (53,3)	
CYP4F2 rs3093135				
AA	34 (68,0)	16 (53,3)	55 (59,8)	0,219
AT	16 (32,0)	13 (43,3)	30 (32,6)	
TT	0 (0,0)	1 (3,3)	7 (7,6)	
A alelis	84 (84,0)	45 (75,0)	140 (76,1)	–
T alelis	16 (16,0)	15 (25,0)	44 (23,9)	

3.2.1.7 lentelės tęsinys

Veiksny	Palyginamoji	SKA	ŪKS	p
CYP4F2 rs2074902				
CC	0 (0,0)	1 (3,3)	4 (4,3)	0,276
CT	16 (32,0)	12 (40,0)	22 (23,9)	
TT	34 (68,0)	17 (56,7)	66 (71,7)	
C alelis	16 (16,0)	14 (23,3)	30 (16,3)	–
T alelis	84 (84,0)	46 (76,7)	154 (83,7)	

SKA – stabili krūtinės angina; ŪKS – ūmus koronarinis sindromas.

3.2.2. ACE2 ir 20-HETE koncentracijų sąsajos su vartojamais vaistais

Siekiant įvertinti RAS sistemą veikiančių vaistų įtaką ACE2 ir 20-HETE koncentracijoms, pacientai buvo suskirstyti pagal AKFi vartojimą SKA ir ŪKS grupėse (3.2.2.1 lentelė). ŪKS grupėje AKFi nevartojusių ligonių buvo tik 2, todėl rezultatai gali neatspindėti fiziologinio šių vaistų poveikio pasirinktoje grupėje. SKA grupėje ACE2 koncentracija buvo reikšmingai aukštesnė ligonių, vartojusių AKFi (8,0 (5,1–21,3) ng/ml), palyginti su nevartojusiais šių vaistų (5,6 (4,2–9,3) ng/ml; $p = 0,001$). Vertinant 20-HETE koncentraciją, reikšmingų skirtumų tarp AKFi vartojančių ir nevartojančių pacientų SKA grupėje nenustatyta.

3.2.2.1 lentelė. ACE2 ir 20-HETE koncentracijų sąsajos su AKFi vartojimu SKA ir ŪKS sergančiųjų grupėse

Veiksnyys	SKA		p	ŪKS		p
	n	mediana (min.–maks.)		n	mediana (min.–maks.)	
ACE2 (ng/ml)						
Vartojantys AKFi	18	8,0 (5,1–21,3)	0,001 ¹	90	5,5 (2,1–20,8)	0,13
Nevartojantys AKFi	12	5,6 (4,2–9,3)		2	17,6 (6,9–28,2)	
20-HETE (ng/ml)						
Vartojantys AKFi	18	28,6 (7,2–368,5)	0,31	90	6,1 (0,7–68,5)	0,81
Nevartojantys AKFi	12	20,9 (6,4–318,4)		2	152,1 (0,9–303,4)	

¹ taikytas Mann–Whitney U testas. 20-HETE – 20-hidroksieikozatetraeno rūgštis; ACE2 – angiotenziną konvertuojantis fermentas 2; AKFi – angiotenziną konvertuojančio fermento inhibitorius; SKA – stabili krūtinės angina; ŪKS – ūmus koronarinis sindromas.

Siekiant įvertinti ACE2 ir 20-HETE koncentracijų sąsajas su skirtingų AKFi vartojimu, analizė atlikta ŪKS grupėje (3.2.2.2 lentelė). SKA grupėje dažniausiai vartotas perindoprilis (3.2.1.4 lentelė). ŪKS grupėje nustatyta, kad ACE2 ir 20-HETE koncentracijos nesiskyrė tarp perindoprilį ir zofenoprilį vartojusių pacientų.

3.2.2.2 lentelė. ACE2 ir 20-HETE koncentracijų sąsajos su skirtingų AKFi vartojimu ŪKS sergančiųjų grupėje

Veiksny	ŪKS		<i>p</i>
	<i>n</i>	mediana (min.–maks.)	
ACE2 (ng/ml)			
Vartojantys perindoprilį	28	5,4 (3,3–20,8)	0,793
Vartojantys zofenoprilį	57	5,5 (2,6–14,8)	
20-HETE (ng/ml)			
Vartojantys perindoprilį	28	6,0 (0,8–68,5)	0,751
Vartojantys zofenoprilį	57	6,1 (0,7–29,7)	

20-HETE – 20-hidroksieikozatetraeno rūgštis; ACE2 – angiotenziną konvertuojantis fermentas 2; ŪKS – ūmus koronarinis sindromas.

Vertinant ARB vartojimo sąsajas su ACE2 ir 20-HETE koncentracijomis (3.2.2.3 lentelė), nustatyta, kad SKA grupėje ACE2 koncentracija buvo reikšmingai žemesnė ARB vartojusių pacientų grupėje – 5,6 (4,4–9,3) ng/ml, palyginti su ARB nevartojusiais – 7,7 (4,2–21,3) ng/ml ($p = 0,021$). 20-HETE koncentracijos tarp šių grupių reikšmingai nesiskyrė.

3.2.2.3 lentelė. ACE2 ir 20-HETE koncentracijų sąsajos su ARB vartojimu SKA ir ŪKS sergančiųjų grupėse

Veiksny	SKA		<i>p</i>	ŪKS		<i>p</i>
	<i>n</i>	mediana (min.–maks.)		<i>n</i>	mediana (min.–maks.)	
ACE2 (ng/ml)						
Vartojantys ARB	8	5,6 (4,4–9,3)	0,021 ¹	2	17,6 (6,9–28,2)	0,13
Nevartojantys ARB	22	7,7 (4,2–21,3)		90	5,5 (2,1–20,8)	
20-HETE (ng/ml)						
Vartojantys ARB	8	17,0 (6,4–110,1)	0,122	2	152,1 (0,9–303,4)	0,81
Nevartojantys ARB	22	28,6 (7,2–368,5)		90	6,1 (0,7–68,5)	

¹ taikytas Mann–Whitney U testas. 20-HETE – 20-hidroksieikozatetraeno rūgštis; ACE2 – angiotenziną konvertuojantis fermentas 2; ARB – angiotenzino II receptorių blokatoriai; SKA – stabili krūtinės angina; ŪKS – ūmus koronarinis sindromas.

ŪKS grupėje ACE2 koncentracija nesiskyrė tarp tikagrelorą vartojusių ir nevartojusių pacientų, tačiau 20-HETE koncentracija buvo reikšmingai didesnė vartojusių grupėje (6,7 (0,7–29,7) ng/ml), palyginti su nevartojusiais (1,3 (0,7–303,4) ng/ml; $p = 0,011$) (3.2.2.4 lentelė). SKA grupės pacientai tikagreloro nevartojo.

3.2.2.4 lentelė. ACE2 ir 20-HETE koncentracijų sąsajos su tikagreloro vartojimu ŪKS sergančiųjų grupėje

Veiksny	ŪKS		<i>p</i>
	<i>n</i>	mediana (min.–maks.)	
ACE2 (ng/ml)			
Vartojantys tikagrelorą	59	5,3 (2,6–13,8)	0,119
Nevartojantys tikagreloro	33	6,9 (2,1–28,2)	
20-HETE (ng/ml)			
Vartojantys tikagrelorą	59	6,7 (0,7–29,7)	0,011 ¹
Nevartojantys tikagreloro	33	1,3 (0,7–303,4)	

¹ taikytas Mann–Whitney *U* testas. 20-HETE – 20-hidroksieikozatetraeno rūgštis; ACE2 – angiotenziną konvertuojantis fermentas 2; ŪKS – ūmus koronarinis sindromas.

Vertinant klopido­grelio vartojimo sąsajas su ACE2 ir 20-HETE koncentracijomis SKA ir ŪKS grupėse (3.2.2.5 lentelė), reikšmingų ACE2 koncentracijos skirtumų nenustatyta nei SKA, nei ŪKS grupėse (atitinkamai $p = 0,227$ ir $p = 0,577$). 20-HETE koncentracija buvo reikšmingai žemesnė klopido­grelių vartojusių SKA grupės pacientų (22,5 (7,2–226,9) ng/ml), palyginti su nevartojusiais (73,1 (6,4–368,5) ng/ml; $p = 0,024$). ŪKS grupėje šis skirtumas buvo dar ryškesnis – nustatyta reikšmingai žemesnė 20-HETE koncentracija klopido­grelių vartojusių pacientų grupėje (1,0 (0,7–11,7) ng/ml), palyginti su nevartojusiais (6,9 (0,7–303,4) ng/ml; $p < 0,001$).

3.2.2.5 lentelė. ACE2 ir 20-HETE koncentracijų sąsajos su klopido­grelio vartojimu SKA ir ŪKS sergančiųjų grupėse

Veiksny	SKA		<i>p</i>	ŪKS		<i>p</i>
	<i>n</i>	mediana (min.–maks.)		<i>n</i>	mediana (min.–maks.)	
ACE2 (ng/ml)						
Vartojantys klopido­grelių	13	8,3 (4,4–14,6)	0,227	28	6,2 (2,1–28,2)	0,577
Nevartojantys klopido­grelio	16	7,2 (4,2–21,3)		64	5,4 (2,6–20,8)	

3.2.2.5 lentelės tęsinys

Veiksny	SKA		<i>p</i>	ŪKS		<i>p</i>
	<i>n</i>	mediana (min.–maks.)		<i>n</i>	mediana (min.–maks.)	
20-HETE (ng/ml)						
Vartojantys klopidogrelį	13	22,5 (7,2–226,9)	0,024 ¹	28	1,0 (0,7–11,7)	< 0,001 ¹
Nevartojantys klopidogrelio	16	73,1 (6,4–368,5)		64	6,9 (0,7–303,4)	

¹ taikytas *Mann–Whitney U* testas. 20-HETE – 20-hidroksieikozatetraeno rūgštis; ACE2 – angiotenziną konvertuojantis fermentas 2; SKA – stabili krūtinės angina; ŪKS – ūmus koronarinis sindromas.

3.2.3. Genetinių veiksnių įtaka ACE2 ir 20-HETE koncentracijai

Genetinių veiksnių įtaka ACE2 ir 20-HETE koncentracijoms pagal *CYP4F2* geno variantus pateikta 3.2.3.1 ir 3.2.3.2 lentelėse. Nė vienoje tiriamųjų grupėje genetinių veiksnių įtaka ACE2 koncentracijai nebuvo reikšminga. Tačiau 20-HETE koncentracija reikšmingai skyrėsi priklausomai nuo *CYP4F2* rs1558139 varianto SKA grupėje ($p = 0,027$; 3.2.3.2 lentelė). Aukščiausia 20-HETE koncentracija nustatyta GG genotipą turintiems pacientams (96,9 (22,5–368,5) ng/ml), palyginti su AG genotipą turinčiais (20,0 (6,4–226,9) ng/ml; $p = 0,009$). Palyginamojoje ir ŪKS grupėse reikšmingų skirtumų nenustatyta.

Įvertinus visų keturių *CYP4F2* variantų genetinius modelius atskirose grupėse (palyginamoji, SKA, ŪKS), statistiškai reikšmingų ACE2 koncentracijos skirtumų nenustatyta (3.2.3.3 lentelė). Artimiausias statistiniam reikšmingumui buvo rs1558139 recesyvusis modelis ŪKS grupėje, tačiau skirtumas reikšmingumo nepasiekė – 4,75 (2,8–7,4) ng/ml, palyginti su AG ir GG genotipų tiriamaisiais – 6,05 (2,1–28,2) ng/ml ($p = 0,053$).

Vertinant 20-HETE koncentraciją, reikšmingi skirtumai nustatyti tik rs1558139 variantui SKA grupėje (3.2.3.4 lentelė). Dominantiniame modelyje GG genotipą turintiems tiriamiesiems nustatyta aukštesnė 20-HETE koncentracija – 96,9 (22,5–368,5) ng/ml, palyginti su AA ir AG genotipus turinčiais tiriamaisiais – 20,0 (6,4–318,4) ng/ml ($p = 0,011$). Viršdominantiniame modelyje AG genotipą turintiems tiriamiesiems nustatyta žemesnė 20-HETE koncentracija – 20,0 (6,4–226,9) ng/ml, palyginti su AA ir GG genotipų grupe – 71,3 (7,2–368,5) ng/ml ($p = 0,023$). Palyginamojoje ir ŪKS grupėse *CYP4F2* genetiniai modeliai 20-HETE koncentracijai reikšmingos įtakos nedarė.

3.2.3.1 lentelė. Genetinių veiksmų įtaka tiriamųjų ACE2 koncentracijai plazmoje

Veiksny	Palyginamoji		p	SKA		p	ŪKS		p
	n	ACE2 (ng/ml), mediana (min.–maks.)		n	ACE2 (ng/ml), mediana (min.–maks.)		n	ACE2 (ng/ml), mediana (min.–maks.)	
CYP4F2 rs2108622									
CC	33	7,8 (4,4–13,9)	0,343	15	7,2 (4,4–11,9)	0,963	57	5,5 (2,6–28,2)	0,698
CT	14	7,9 (5,3–59,3)		13	7,7 (4,2–21,3)		29	5,4 (2,1–20,8)	
TT	3	11,7 (7,5–26,9)		2	7,3 (7,2–7,3)		6	7,1 (3,8–8,4)	
CYP4F2 rs1558139									
AA	8	7,5 (4,4–14,6)	0,318	6	5,8 (5,0–7,7)	0,229	18	4,8 (2,8–7,4)	0,132
AG	30	7,7 (4,7–26,9)		14	7,7 (4,2–21,3)		50	5,9 (2,1–14,8)	
GG	12	10,4 (5,8–59,3)		10	7,5 (4,4–11,9)		24	6,1 (3,2–28,2)	
CYP4F2 rs3093135									
AA	34	7,8 (4,4–14,6)	0,388	16	6,8 (4,4–10,3)	0,322	55	5,4 (2,6–28,2)	0,654
AT	16	8,6 (5,3–59,3)		13	7,3 (4,2–21,3)		30	5,6 (2,1–20,8)	
TT	0	–		1	–		7	7,1 (3,8–10,9)	
CYP4F2 rs2074902									
CC	0	–	0,388	1	–	0,890	4	7,7 (3,8–8,4)	0,743
CT	16	8,6 (5,3–59,3)		12	7,5 (4,2–21,3)		22	5,4 (2,1–20,8)	
TT	34	7,8 (4,4–14,6)		17	7,2 (4,4–11,9)		66	5,5 (2,6–28,2)	

ACE2 – angiotenziną konvertuojantis fermentas 2; SKA – stabili krūtinės angina, ŪKS – ūmus koronarinis sindromas.

3.2.3.2 lentelė. Genetinių veiksmų įtaka tiriamųjų 20-HETE koncentracijai plazmoje

Veiksny	Palyginamoji		p	SKA		p	ŪKS		p
	n	20-HETE (ng/ml), mediana (min.–maks.)		n	20-HETE (ng/ml), mediana (min.–maks.)		n	20-HETE (ng/ml), mediana (min.–maks.)	
CYP4F2 rs2108622									
CC	33	48,4 (2,3–332,7)	0,424	15	25,1 (6,4–318,4)	0,296	57	5,3 (0,7–303,4)	0,400
CT	14	56,9 (24,3–314,7)		13	26,2 (7,2–368,5)		29	7,0 (0,7–68,5)	
TT	3	49,0 (34,9–70,8)		2	88,8 (55,6–122,0)		6	6,3 (0,9–17,9)	
CYP4F2 rs1558139									
AA	8	50,3 (15,1–75,0)	0,479	6	26,6 (7,2–318,4)	0,027 ¹	18	7,1 (0,8–54,6)	0,281
AG	30	63,2 (6,9–332,7)		14	20,0 (6,4–226,9) ^a		50	5,6 (0,7–303,4)	
GG	12	54,3 (2,3–241,7)		10	96,9 (22,5–368,5) ^a		24	6,6 (0,7–68,5)	
CYP4F2 rs3093135									
AA	34	49,0 (2,3–332,7)	0,170	16	23,8 (6,4–318,4)	0,594	55	5,3 (0,7–303,4)	0,516
AT	16	56,9 (24,3–314,7)		13	28,2 (7,2–368,5)		30	7,2 (0,7–68,5)	
TT	0	–		1	–		7	6,7 (0,9–11,2)	
CYP4F2 rs2074902									
CC	0	–	0,170	1	–	0,348	4	3,8 (0,9–11,2)	0,238
CT	16	56,9 (24,3–314,7)		12	27,2 (7,2–368,5)		22	7,1 (0,7–68,5)	
TT	34	49,0 (2,3–332,7)		17	25,1 (6,4–318,4)		66	5,4 (0,7–303,4)	

¹ taikytas *Kruskal–Wallis* testas. Statistinio reikšmingumo lygmuo pritaikius Bonferroni korekciją po porinio pažymėtų grupių palyginimo taikant *Mann–Whitney U* testą: ^a $p = 0,009$. 20-HETE – 20-hidroksieikozatetraeno rūgštis; SKA – stabili krūtinės angina; ŪKS – ūmus koronarinis sindromas.

3.2.3.3 lentelė. CYP4F2 genotipų paveldimumo modelių įtaka ACE2 koncentracijai

CYP4F2 variantas	Grupė	Genetinis modelis	Genotipas	n	Mediana (min.–maks.)	Lyginamieji genotipai	n	Mediana (min.–maks.)	p
rs2108622	Palyginamoji	Dominantinis	CC	33	7,8 (4,6–13,9)	TT ir CT	17	8,3 (5,3–59,3)	0,395
		Recesyvusis	TT	3	11,7 (7,5–26,9)	CT ir CC	47	7,8 (4,4–59,3)	0,165
		Viršdominantinis	CT	14	7,9 (5,3–59,3)	CC ir TT	36	8,0 (4,4–26,9)	0,880
	SKA	Dominantinis	CC	15	7,2 (4,4–11,9)	TT ir CT	15	7,3 (4,2–21,3)	0,819
		Recesyvusis	TT	2	7,3 (7,2–7,3)	CT ir CC	28	7,3 (4,2–21,3)	1,000
		Viršdominantinis	CT	13	7,7 (4,2–21,3)	CC ir TT	17	7,2 (4,4–11,9)	0,802
rs1558139	ŪKS	Dominantinis	CC	57	5,5 (2,6–28,2)	TT ir CT	35	5,7 (2,1–20,8)	0,693
		Recesyvusis	TT	6	7,1 (3,8–8,4)	CT ir CC	86	5,5 (2,1–28,2)	0,406
		Viršdominantinis	CT	29	5,4 (2,1–20,8)	CC ir TT	63	5,5 (2,6–28,2)	0,980
	Palyginamoji	Dominantinis	GG	12	10,4 (5,8–59,3)	AA ir AG	38	7,8 (4,4–26,9)	0,140
		Recesyvusis	AA	8	7,5 (4,4–14,6)	AG ir GG	42	8,0 (4,7–59,3)	0,937
		Viršdominantinis	AG	30	7,8 (4,7–26,9)	AA ir GG	20	9,7 (4,4–59,3)	0,223
rs1558139	SKA	Dominantinis	GG	10	7,5 (4,4–11,9)	AA ir AG	20	7,2 (4,2–21,3)	0,947
		Recesyvusis	AA	6	5,8 (5,0–7,7)	AG ir GG	24	7,6 (4,2–21,3)	0,108
		Viršdominantinis	AG	14	7,7 (4,2–21,3)	AA ir GG	16	7,2 (4,4–11,9)	0,228
	ŪKS	Dominantinis	GG	24	6,1 (3,2–28,2)	AA ir AG	68	5,4 (2,1–14,8)	0,284
		Recesyvusis	AA	18	4,8 (2,8–7,4)	AG ir GG	74	6,1 (2,1–28,2)	0,053
		Viršdominantinis	AG	50	5,9 (2,1–14,8)	AA ir GG	42	5,3 (2,8–28,2)	0,554

3.2.3.3 lentelės tęsinys

<i>CYP4F2</i> variantas	Grupė	Genetinis modelis	Genotipas	<i>n</i>	Mediana (min.–maks.)	Lyginamieji genotipai	<i>n</i>	Mediana (min.–maks.)	<i>p</i>
rs3093135	Palyginamoji	Dominantinis	AA	34	7,8 (4,4–14,6)	TT ir AT	16	8,6 (5,3–59,3)	0,394
		Recesyvusis	TT	0	–	AT ir AA	50	8,0 (4,4–59,3)	–
		Viršdominantinis	AT	16	8,6 (5,3–59,3)	AA ir TT	34	7,8 (4,4–14,6)	0,394
	SKA	Dominantinis	AA	16	6,8 (4,4–10,3)	TT ir AT	14	7,5 (4,2–21,3)	0,349
		Recesyvusis	TT	1	11,9 (11,9–11,9)	AT ir AA	29	7,2 (4,2–21,3)	0,203
		Viršdominantinis	AT	13	7,3 (4,2–21,3)	AA ir TT	17	7,2 (4,4–11,9)	0,645
	ŪKS	Dominantinis	AA	55	5,4 (2,6–28,2)	TT ir AT	37	5,7 (2,1–20,8)	0,556
		Recesyvusis	TT	7	7,1 (3,8–10,9)	AT ir AA	85	5,5 (2,1–28,2)	0,389
		Viršdominantinis	AT	30	5,6 (2,1–20,8)	AA ir TT	62	5,5 (2,6–28,2)	0,901
rs2074902	Palyginamoji	Dominantinis	TT	34	7,8 (4,4–14,6)	CC ir CT	16	8,6 (5,3–59,3)	0,394
		Recesyvusis	CC	0	–	CT ir TT	50	8,0 (4,4–59,3)	–
		Viršdominantinis	CT	16	8,6 (5,3–59,3)	CC ir TT	34	7,8 (4,4–14,6)	0,394
	SKA	Dominantinis	TT	17	7,2 (4,4–11,9)	CC ir CT	13	7,3 (4,2–21,3)	0,645
		Recesyvusis	CC	1	7,3 (7,3–7,3)	CT ir TT	29	7,2 (4,2–21,3)	1,000
		Viršdominantinis	CT	12	7,5 (4,2–21,3)	CC ir TT	18	7,3 (4,4–11,9)	0,656
	ŪKS	Dominantinis	TT	66	5,5 (2,6–28,2)	CC ir CT	26	5,6 (2,1–20,8)	0,738
		Recesyvusis	CC	4	7,7 (3,8–8,4)	CT ir TT	88	5,5 (2,1–28,2)	0,449
		Viršdominantinis	CT	22	5,4 (2,1–20,8)	CC ir TT	70	5,6 (2,6–28,2)	0,996

SKA – stabili krūtinės angina; ŪKS – ūmus koronarinis sindromas.

3.2.3.4 lentelė. CYP4F2 genotipų paveldimumo modelių įtaka 20-HETE koncentracijai

CYP4F2 variantas	Grupė	Genetinis modelis	Genotipas	n	Mediana (min.–maks.)	Lyginamieji genotipai	n	Mediana (min.–maks.)	p
rs2108622	Palyginamoji	Dominantinis	CC	33	48,4 (2,3–332,7)	TT ir CT	17	55,0 (24,3–314,7)	0,227
		Recesyvusis	TT	3	49,0 (34,9–70,8)	CT ir CC	47	54,3 (2,3–332,7)	1,000
		Viršdominantinis	CT	14	56,9 (24,3–314,7)	CC ir TT	36	48,7 (2,3–332,7)	0,199
	SKA	Dominantinis	CC	15	25,1 (6,4–318,4)	TT ir CT	15	28,2 (7,2–368,5)	0,319
		Recesyvusis	TT	2	88,8 (55,6–122,0)	CT ir CC	28	25,7 (6,4–368,5)	0,170
		Viršdominantinis	CT	13	26,2 (7,2–368,5)	CC ir TT	17	28,9 (6,4–318,4)	0,770
	ŪKS	Dominantinis	CC	57	5,3 (0,7–303,4)	TT ir CT	35	6,8 (0,7–68,5)	0,190
		Recesyvusis	TT	6	6,3 (0,9–17,9)	CT ir CC	86	6,1 (0,7–303,4)	0,896
		Viršdominantinis	CT	29	7,0 (0,7–68,5)	CC ir TT	63	5,4 (0,7–303,4)	0,196
rs1558139	Palyginamoji	Dominantinis	GG	12	54,3 (2,3–241,7)	AA ir AG	38	54,0 (6,9–332,7)	0,370
		Recesyvusis	AA	8	50,3 (15,1–75,0)	AG ir GG	42	54,6 (2,3–332,7)	0,587
		Viršdominantinis	AG	30	63,2 (6,9–332,7)	AA ir GG	20	52,7 (2,3–241,7)	0,231
	SKA	Dominantinis	GG	10	96,9 (22,5–368,5)	AA ir AG	20	20,0 (6,4–318,4)	0,011 ¹
		Recesyvusis	AA	6	26,6 (7,2–318,4)	AG ir GG	24	27,2 (6,4–368,5)	0,876
		Viršdominantinis	AG	14	20,0 (6,4–226,9)	AA ir GG	16	71,3 (7,2–368,5)	0,023 ¹
	ŪKS	Dominantinis	GG	24	6,6 (0,7–68,5)	AA ir AG	68	6,0 (0,7–303,4)	0,566
		Recesyvusis	AA	18	7,1 (0,8–54,6)	AG ir GG	74	5,8 (0,7–303,4)	0,213
		Viršdominantinis	AG	50	5,6 (0,7–303,4)	AA ir GG	42	6,9 (0,7–68,5)	0,133

3.2.3.4 lentelės tęsinys

CYP4F2 variantas	Grupė	Genetinis modelis	Genotipas	n	Mediana (min.–maks.)	Lyginamieji genotipai	n	Mediana (min.–maks.)	p
rs3093135	Palyginamoji	Dominantinis	AA	34	49,0 (2,3–332,7)	TT ir AT	16	56,9 (24,3–314,7)	0,173
		Recesyvusis	TT	0	–	AT ir AA	50	54,3 (2,3–332,7)	–
		Viršdominantinis	AT	16	56,9 (24,3–314,7)	AA ir TT	34	49,0 (2,3–332,7)	0,173
	SKA	Dominantinis	AA	16	23,8 (6,4–318,4)	TT ir AT	14	40,1 (7,2–368,5)	0,329
		Recesyvusis	TT	1	52,0 (52,0–52,0)	AT ir AA	29	26,2 (6,4–368,5)	0,729
		Viršdominantinis	AT	13	28,2 (7,2–368,5)	AA ir TT	17	25,1 (6,4–318,4)	0,402
rs2074902	Palyginamoji	Dominantinis	AA	55	5,3 (0,7–303,4)	TT ir AT	37	6,6 (0,7–68,5)	0,265
		Recesyvusis	TT	7	6,7 (0,9–11,2)	AT ir AA	85	6,0 (0,7–303,4)	0,897
		Viršdominantinis	AT	30	6,5 (0,7–68,5)	AA ir TT	62	5,5 (0,7–303,4)	0,277
	SKA	Dominantinis	TT	34	49,0 (2,3–332,7)	CC ir CT	16	56,9 (24,3–314,7)	0,173
		Recesyvusis	CC	0	–	CT ir TT	50	54,3 (2,3–332,7)	–
		Viršdominantinis	CT	16	56,9 (24,3–314,7)	CC ir TT	34	49,0 (2,3–332,7)	0,173
rs2074902	Palyginamoji	Dominantinis	TT	17	25,1 (6,4–318,4)	CC ir CT	13	28,2 (7,2–368,5)	0,402
		Recesyvusis	CC	1	122,0 (122,0–122,0)	CT ir TT	29	26,2 (6,4–368,5)	0,204
		Viršdominantinis	CT	12	27,2 (7,2–368,5)	CC ir TT	18	27,0 (6,4–318,4)	0,719
	ŪKS	Dominantinis	TT	66	5,4 (0,7–303,4)	CC ir CT	26	6,8 (0,7–68,5)	0,189
		Recesyvusis	CC	4	3,8 (0,9–11,2)	CT ir TT	88	6,1 (0,7–303,4)	0,598
		Viršdominantinis	CT	22	7,1 (0,7–68,5)	CC ir TT	70	5,4 (0,7–303,4)	0,098

¹ taikytas *Mann–Whitney U* testas. SKA – stabili krūtinės angina; ŪKS – ūmus koronarinis sindromas.

3.2.4. ACE2 ir 20-HETE koncentracijų sąsajos su klinikiniais ir laboratoriniais rodikliais

ACE2 koncentracija buvo reikšmingai susijusi su hemoglobino koncentracija ($r_s = 0,283$; $p = 0,003$), nustatant silpną teigiamą ryšį (3.2.4.1 lentelė). Taip pat nustatyta statistiškai reikšminga sąsaja tarp ACE2 koncentracijos ir trombocitų agregacijos, paveikus ADF ($r_s = 0,193$; $p = 0,033$). Kiti analizuoti rodikliai – amžius, kreatinino koncentracija, AST aktyvumas bei trombocitų agregacija, paveikus epinefrinu – su ACE2 koncentracija nebuvo reikšmingai susiję ($p > 0,05$). Nustatyta vidutinio stiprumo reikšminga neigiama 20-HETE koncentracijos ir kreatinino koncentracijos sąsaja ($r_s = -0,365$; $p < 0,001$), rodanti, kad didėjant kreatinino koncentracijai, 20-HETE koncentracija mažėja (3.2.4.1 lentelė). Be to, nustatyta statistiškai reikšminga sąsaja su trombocitų agregacija, indukuota ADF ($r_s = 0,326$; $p < 0,001$), bei ribinio statistinio reikšmingumo teigiama sąsaja su trombocitų agregacija, paveikus epinefrinu ($r_s = 0,178$; $p = 0,05$). Kiti tirti rodikliai, įskaitant amžių, hemoglobino koncentraciją ir AST aktyvumą, su 20-HETE koncentracija nebuvo reikšmingai susiję ($p > 0,05$). Tarp ACE2 ir 20-HETE koncentracijų reikšmingos sąsajos nenustatyta ($r_s = 0,047$; $p = 0,605$).

3.2.4.1 lentelė. ACE2 ir 20-HETE koncentracijų sąsajos su tirtais rodikliais

Veiksnyss	ACE2 (ng/ml)		20-HETE (ng/ml)	
	r_s	p	r_s	p
20-HETE (ng/ml)	0,047	0,605	1,000	–
Amžius (metai)	0,008	0,931	–0,072	0,431
Hemoglobinas (g/l)	0,283	0,003	0,161	0,094
Kreatininas ($\mu\text{mol/l}$)	–0,018	0,851	–0,365	< 0,001
AST (U/l)	–0,105	0,396	–0,158	0,203
Trombocitų agregacija indukuota ADF (proc. ^{Agr})	0,193	0,033	0,326	< 0,001
Trombocitų agregacija indukuota epinefrinu (proc. ^{Agr})	0,053	0,562	0,178	0,05

20-HETE – 20-hidroksieikozatetraeno rūgštis; ACE2 – angiotenziną konvertuojantis fermentas 2; ADF – adenoizino difosfatas; AST – aspartato aminotransferazė; proc.^{Agr} – procentinė agregacija; r_s – Spearman ranginės koreliacijos koeficientas.

3.2.5. Vienaveiksnė ir daugiaveiksnė logistinė regresija ŪKS prognozavimui

Į vienaveiksnės logistinės regresijos analizės modelį buvo įtraukti klinikiniai, laboratoriniai ir funkciniai rodikliai, turintys potencialią reikšmę ŪKS patofiziologijai, įskaitant amžių, hemoglobino koncentraciją, kreatinino koncentraciją, AST aktyvumą, trombocitų agregaciją bei cirkuliuojančių biožymenų (ACE2 ir 20-HETE) koncentracijas (3.2.5.1 lentelė).

Aukštesnė kreatinino koncentracija buvo susijusi su didesne galimybe pasireikšti ŪKS ($GS = 1,05$; $p = 0,001$). Aukštesnės hemoglobino koncentracijos ($GS = 0,94$; $p = 0,003$), trombocitų agregacijos, paveikus ADF ($GS = 0,92$; $p < 0,001$) ir epinefrinu ($GS = 0,96$; $p < 0,001$) bei ACE2 ($GS = 0,85$; $p = 0,001$) ir 20-HETE ($GS = 0,95$; $p < 0,001$) koncentracijos buvo susijusios su mažesne galimybe pasireikšti ŪKS.

3.2.5.1 lentelė. Biožymenų įtaka ŪKS pasireikšti tiriamojoje imtyje, atlikus vienaveiksnę logistinę regresijos analizę

Rodiklis	GS	95 proc. PI	<i>p</i>
Amžius	0,99	0,96–1,02	0,584
Hemoglobinas	0,94	0,91–0,98	0,003
Kreatininas	1,05	1,02–1,09	0,001
AST	1,05	1,00–1,10	0,056
Trombocitų agregacija paveikus ADF	0,92	0,90–0,95	< 0,001
Trombocitų agregacija paveikus epinefrinu	0,96	0,94–0,98	< 0,001
ACE2	0,85	0,77–0,94	0,001
20-HETE	0,95	0,93–0,97	< 0,001

20-HETE – 20-hidroksieikozatetraeno rūgštis; ACE2 – angiotenziną konvertuojantis fermentas 2; GS – galimybių santykis; PI – pasikliautinasis intervalas.

Atlikus daugiaveiksnę logistinę regresijos analizę įvertinta biožymenų sąsaja su ŪKS pasireiškimu (3.2.5.2 lentelė). Nustatyta, kad 20-HETE ir ACE2 koncentracijos buvo nepriklausomai susijusios su ŪKS. Aukštesnė 20-HETE koncentracija buvo susijusi su mažesne galimybe pasireikšti ŪKS ($GS = 0,953$; $p < 0,001$), o ACE2 koncentracija taip pat buvo reikšmingai susijusi su mažesne galimybe pasireikšti ŪKS ($GS = 0,884$; $p = 0,022$).

3.2.5.2 lentelė. Biožymenų įtaka ŪKS pasireikšti tiriamojoje imtyje, atlikus daugiaveiksnę logistinę regresijos analizę

Rodiklis	GS	95 proc. PI	<i>p</i>
20-HETE	0,953	0,934–0,972	< 0,001
ACE2	0,884	0,796–0,982	0,022

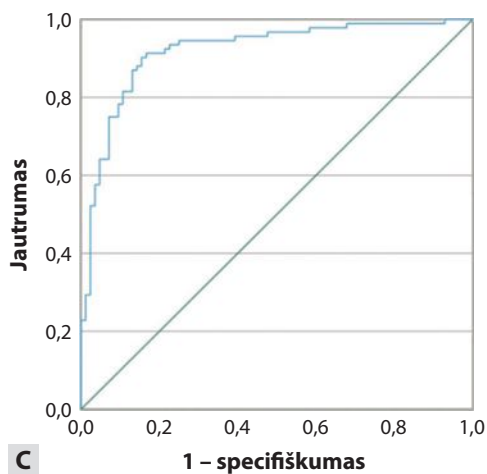
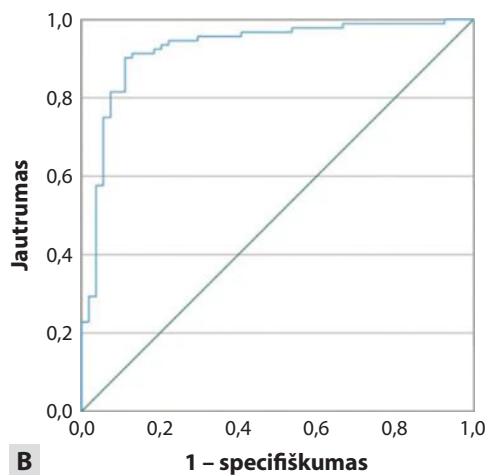
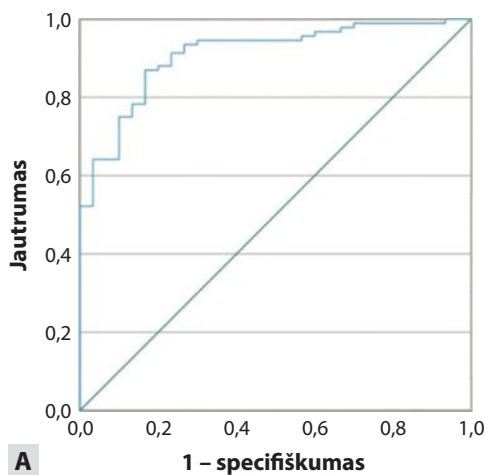
20-HETE – 20-hidroksieikozatetraeno rūgštis; ACE2 – angiotenziną konvertuojantis fermentas 2; GS – galimybių santykis; PI – pasikliautinis intervalas.

ROC kreivės analizė (3.2.5.3 lentelė) parodė, kad įtraukus ACE2 į diagnostinį modelį kartu su 20-HETE, modelio diagnostinė vertė reikšmingai nepagerėjo, nes sujungto modelio diskriminacinė geba (AUC) buvo panaši į modelio, pagrįsto vien 20-HETE. Cirkuliuojančios 20-HETE koncentracija patikimai skyrė ŪKS nuo SKA (AUC = 0,91) (3.2.5.1 pav. A). Optimali ribinė vertė, nustatyta pagal Youden indeksą, buvo $\leq 11,34$ ng/ml, jautrumas – 86,9 proc., o specifiškumas – 83,3 proc. Palyginus ŪKS su sveikais asmenimis, AUC siekė 0,93 (3.2.5.1 pav. B), o palyginus su visais ne ŪKS atvejais – 0,92 (3.2.5.1 pav. C).

3.2.5.3 lentelė. 20-HETE įtaka diagnostiniam modeliui, vertinant atskirai ir kartu su ACE2

Grupių palyginimas	AUC	95 proc. PI	Ribinė vertė	Jautrumas, proc.	Specifiškumas, proc.
20-HETE ir ACE2 modelis					
ŪKS palyginti su SKA	0,87	0,79–0,94	–	84,8	80,0
ŪKS palyginti su palyginamąja grupe	0,93	0,88–0,97	–	90,2	88,9
ŪKS palyginti su SKA ir palyginamąja grupe	0,91	0,86–0,96	–	89,1	82,7
20-HETE modelis					
ŪKS palyginti su SKA	0,91	0,84–0,97	$\leq 11,34$ ng/ml	86,9	83,3
ŪKS palyginti su palyginamąja grupe	0,93	0,88–0,97	$\leq 13,55$ ng/ml	90,2	88,9
ŪKS palyginti su SKA ir palyginamąja grupe	0,92	0,87–0,96	$\leq 13,55$ ng/ml	90,2	84,5

AUC – plotas po kreive; SKA – stabili krūtinės angina; ŪKS – ūmus koronarinis sindromas.



3.2.5.1 pav. ROC kreivės, vertinančios 20-HETE koncentracijos prognostinę vertę ŪKS pasireiškimui

A – ŪKS ir SKA palyginimas (AUC = 0,91); **B** – ŪKS ir palyginamosios grupės palyginimas (AUC = 0,925); **C** – ŪKS ir sujungtos palyginamosios bei SKA grupės palyginimas (AUC = 0,92).

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Šiame tyrime įvertinta renino-angiotenzino sistemos, arachidono rūgšties metabolizmo ir su jais susijusių uždegiminių procesų sąveika, taikant *in vitro* ląstelių kultūrų modelius bei tiriant išemine širdies liga sirgusių pacientų imtį. Pirmojoje disertacinio darbo dalyje tirtas įvairių medžiagų, veikiančių RAS–ARA grandį, poveikis endotelio, kepenų ir inkstų ląstelių kultūrose. Ląstelių kultūros paveiktos antikoaguliantais, antiagregantais ir RAS inhibitoriais, juos derinant su fizikine stimuliacija – žemo dažnio UG. Tirta ląstelių genų raiška ir jų funkcija. Antrojoje dalyje įvertinta ląstelių kultūrų tyrimuose nustatytų reikšmingų biožymenų klinikinė reikšmė pacientams, sirgusiems IŠL. Gauti rezultatai parodė, kad CYP4F2–20-HETE metabolinė ašis yra jautri tiek farmakologinei, tiek fizinei moduliacijai ir pasižymi ryškiu audiniui specifiniu atsaku. Endotelio ląstelėse antikoaguliantai ir antiagregantai reikšmingai mažino CYP4F2 raišką, tuo tarpu RAS inhibitoriai moduliavo tiek klasikinės, tiek alternatyvios RAS ašies komponentus, kartu keisdami 20-HETE susidarymą ir GPR75 receptoriaus raišką. Inkstų epitelinėse ląstelėse nustatyti panašūs, nuo junginio priklausomi pokyčiai, o kepenų modelyje šių sistemų atsakas buvo mažiau išreikštas, patvirtinant šių mechanizmų audiniams būdingą specifiškumą. Taip pat nustatyta, kad žemo dažnio UG sustiprina farmakologinį poveikį, moduluodamas ląstelių migraciją, oksidacijos-redukcijos proceso pusiausvyrą, NO susidarymą ir genų raišką. Klinikiniai duomenys parodė, kad cirkuliuojančių ACE2 ir 20-HETE koncentracijos yra susijusios su IŠL klinikinėmis formomis, o 20-HETE pasižymi aukšta diagnostine verte diferencijuojant ŪKS ir SKA (AUC = 0,91). Šių biožymenų koncentracijos skirtumai, nustatyti SKA ir ŪKS pacientams, leidžia teigti apie reikšmingus kraujagyslių funkcijos pokyčius ūminės išemijos metu. Tai pabrėžia jų vaidmenį atspindint aterosklerozės progresavimą.

4.1. ARA metabolizmo fermento CYP4F2 raiškos pokyčiai ląstelių kultūrose

CYP4F2 fermentas yra svarbus ARA metabolizmo komponentas, glaudžiai susijęs su uždegimo, oksidacinio streso ir trombozės procesais kraujagyslių sistemoje. Kadangi endotelis yra viena pagrindinių šių patofiziologinių procesų reguliavimo vietų, farmakologiniai veiksniai, galintys moduluoti CYP4F2 raišką endotelio ląstelėse, gali turėti tiek biologinę, tiek klinikinę reikšmę. Ankstesni klinikiniai tyrimai parodė, kad CYP4F2 ir jo metabolinis produktas 20-HETE yra susiję su trombocitų reaktyvumu, uždegiminiais procesais bei atsaku į antitrombocitinį gydymą pacientams, sergantiems IŠL,

ypač gydomiems tikagreloru ar kitais antiagregantais [16]. Šiuo tyrimu buvo siekiama įvertinti, ar klinikinėje praktikoje plačiai vartojami vaistai – tiesioginis Xa veiksnio inhibitorius rivaroksabanas ir P2Y₁₂ receptorių antagonistas tikagreloras – gali veikti *CYP4F2* raišką kraujagyslių endotelyje.

Mūsų tyrimo rezultatai parodė, kad rivaroksabanas HUVEC ląstelėse reikšmingai ir priklausomai nuo koncentracijos mažina *CYP4F2* mRNR raišką. Didžiausios tirtos koncentracijos (10 µM) sąlygomis *CYP4F2* raiška sumažėjo 2,72 karto, kas leidžia daryti prielaidą, kad rivaroksabanas gali slopinti ω-hidroksilazės sintezę endotelyje. Didžiausias *CYP4F2* fermento aktyvumas stebimas ankstyvose uždegimo stadijose, maždaug po 24 val. nuo uždegimo stimulo pradžios [123, 124, 129]. Kadangi *CYP4F2* dalyvauja biologiškai aktyvių eikozanoidų, įskaitant 20-HETE, sintezėje bei leukotrieno B₄ metabolizme, šis slopinimas gali būti siejamas su sumažėjusiu uždegiminiu ir oksidaciniu atsaku kraujagyslių sienoje [129, 229]. Šie rezultatai papildė anksčiau paskelbtus duomenis, rodančius rivaroksabano priešuždegiminį poveikį – gebėjimą slopinti VCAM-1, ICAM-1 ir IL-8 raišką bei mažinti ADJ kaupimąsi endotelyje [230, 231].

Nepaisant reikšmingo mRNR raiškos sumažėjimo, *CYP4F2* baltymo koncentracija reikšmingai nepakito. Šis neatitikimas gali būti aiškinamas potranskripciniais ir potransliaciniais reguliacijos mechanizmais, kurie lemia, kad mRNR pokyčiai ne visuomet tiesiogiai atsispindi baltymo lygmeniu [232].

Nustatyta ir tai, kad tikagreloras taip pat reikšmingai mažina *CYP4F2* raišką HUVEC ląstelėse. Didžiausias slopinantis poveikis nustatytas esant 25 nM koncentracijai, kai *CYP4F2* mRNR raiška sumažėjo 2,38 karto, bei taip pat sumažėjo ir baltymo koncentracija. Šie duomenys praplečia kitų tyrėjų įvertintą tikagreloro pleotropinį poveikį, kuris apima ne tik trombocitų agregacijos slopinimą, bet ir uždegiminių procesų bei endotelio funkcijos moduliaciją [233, 234]. Vienas geriausiai žinomų tikagreloro pleotropinių efektų yra vazodilatacija, siejama su adenosino pernašos į ląsteles slopinimu ir dėl to padidėjusia užląsteline adenosino koncentracija. Adenosinas pasižymi įvairiomis kraujagysles apsaugančiomis savybėmis – skatina kraujagyslių išsiplėtimą, endotelio veiksmų sekreciją. Taip pat, slopindamas neutrofilų adheziją prie endotelio, adenosinas mažina uždegiminį atsaką [230, 231]. Keletas klinikinių tyrimų parodė, kad tikagreloras gerina endotelio funkciją ir pasižymi aterogenezę slopinančiu poveikiu [229, 232]. Šis poveikis siejamas su padidėjusiu endotelio pirmtakių ląstelių, kurios yra būtinos endotelio regeneracijai, kiekiu, taip pat su sumažėjusia cirkuliuojančio epidermio augimo veiksnio, siejamo su ED ir aterogenezės procesais, koncentracija [233, 235].

HepG2 ląstelės, kaip pagrindinis citochromo P450 fermentų, įskaitant CYP4F2 ir CYP4A11, raiškos ir sisteminio eikozanoidų metabolizmo centras, buvo pasirinktos įvertinti tikagreloro poveikį šių fermentų reguliacijai už kraujagyslių endotelio ribų. Priešingai nei endotelio ląstelėse, kepenų HepG2 modelyje tikagreloras parodė tik tendenciją veikti *CYP4F2* ir *CYP4A11* raišką. Tai rodo, kad tikagreloro poveikis CYP fermentų reguliacijai yra audiniui specifinis ir labiau išreikštas endotelio ląstelėse, kuris yra pagrindinė kraujagyslių homeostazės reguliavimo vieta.

4.2. RAS inhibitorių poveikis ląstelių funkcijai ir genų raiškai

Tolimesniame tyrimo etape buvo siekiama įvertinti RAS inhibitorių poveikį CYP4F2–20-HETE metabolinei ašiai bei su ja susijusiam ląstelių funkciniam atsakui. Atsižvelgiant į tai, kad ši ašis sieja uždegiminius, trombozės, hemodinaminius procesus, šių junginių poveikio tyrimas leidžia geriau suprasti jų mechanizmus kraujagyslių pažeidimo procesuose.

Endotelio ląstelių funkcijos rodiklių pokyčiai

MTT tyrimo rezultatai parodė, kad visi trys RAS veikiantys junginiai didino HUVEC metabolinį gyvybingumą, tačiau poveikio pobūdis ir priklausomybė skyrėsi nuo junginių koncentracijos. Kaptoprilis reikšmingai didino ląstelių gyvybingumą tirname 0,25–2,25 μM koncentracijų intervale, o didžiausias efektas nustatytas esant 1,25 μM koncentracijai. Gauti rezultatai atitinka anksčiau skelbtus duomenis apie AKFi citoprotekcinės savybės, siejamas su eNOS aktyvinimu, NO biologinio prieinamumo didėjimu bei NADPH oksidazės aktyvumo slopinimu [236]. Be to, kaptoprilis gali slopinti ląstelių apoptozę inhibuodamas p38 MAP kinazės signalinį kelią ir skatinti su ląstelių išgyvenamumu susijusių baltymų (uPA, uPAR, PAI-1) raišką [237, 238].

Losartanas taip pat didino HUVEC ląstelių gyvybingumą nuo koncentracijos priklausomu būdu, o didžiausias poveikis nustatytas 1,75–2,75 μM koncentracijų intervale. Tai gali būti siejama su AT₁ receptoriaus blokavimu ir su tuo susijusių uždegiminių signalų slopinimu. Mokslinėje literatūroje skelbiama, kad losartanas gali slopinti TNF- α sukeltą endotelio ląstelių apoptozę aktyvindamas VEGFR2/PI3K/Akt signalinį kelią bei mažindamas adhezijos molekulių (VCAM-1, ICAM-1) raišką [239, 240].

Pažymėtina, kad MLN-4760 poveikis gali būti dvilypis. Mažesnės MLN-4760 koncentracijos didino ląstelių metabolinį aktyvumą, didesnės – šį poveikį silpnino. Šie rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad dalinis ACE2 slopinimas gali sukelti kompensacinius proliferacinius atsakus, tačiau stipresnis šios apsauginės RAS ašies slopinimas eliminuoja jos teigiamą poveikį

endotelio funkcijai. Vertinant ląstelių proliferaciją nustatyta, kad tik MLN-4760 mažomis koncentracijomis didino gyvų ląstelių skaičių, tuo tarpu kaptoprilis ir losartanas proliferacijos reikšmingai neveikė. Tai rodo, kad klasikinės RAS ašies slopinimas labiau veikia ląstelių metabolinę būklę ir išgyvenamumą, o ne tiesiogiai skatina proliferaciją.

Ląstelių migracijos analizė atskleidė, kad kaptoprilis reikšmingai skatino HUVEC migraciją, o tai atitinka esamus duomenis apie AKFi gebėjimą gerinti endotelio regeneraciją ir reparacinius procesus. Nors duomenys apie kaptoprilio poveikį žaizdos gijimo procesams yra riboti, manoma, kad kaptoprilis gali teigiamai moduluoti endotelio reparacinius mechanizmus aktyvindamas NO signalą ir slopindamas ACE/Ang II/AT₁R ašį [241]. Losartano poveikis migracijai buvo silpnesnis, tačiau tendencija išliko.

NO sintezė ir oksidacijos-redukcijos proceso pusiausvyra

Vertinant NO susidarymą nustatyta, kad tiek kaptoprilis, tiek losartanas didino NO kiekį, tačiau skirtinguose junginių koncentracijų diapazonuose. Kaptoprilis skatino NO sintezę visame tirtame intervale, tuo tarpu losartano poveikis buvo ryškesnis esant didesnėms jo koncentracijoms. Šie rezultatai pagrindžia literatūros duomenis, jog AKFi ir ARB gerina endotelio funkciją didindami eNOS aktyvumą ir NO biologinį prieinamumą [242–244]. Pažymėtina, kad MLN-4760 mažino NO koncentraciją. Tai pabrėžia alternatyvios RAS ašies (ACE2/Ang 1–7/Mas) svarbą palaikant endotelio homeostazę. ACE2 slopinimas gali lemti sumažėjusią Ang 1–7 sintezę ir dėl to silpnėjantį vazodilacinį bei priešūždegiminį poveikį bei sudaryti palankesnes sąlygas proaterogeniniams procesams.

Inkstų ląstelių funkcijos rodiklių pokyčiai

RPTEC/TERT1 ląstelių modelyje nustatytas ryškus RAS inhibitorių poveikis. Losartanas pasižymėjo stipriu citoprotekcinio poveikiu, didindamas ląstelių gyvybingumą visame koncentracijų intervale. Tai gali būti siejama su intrarenalinės Ang II signalizacijos slopinimu ir oksidacinio streso mažinimu [245]. Tuo tarpu aukštos MLN-4760 koncentracijos mažino ląstelių gyvybingumą, kas gali būti susiję su apsauginės ACE2 ašies slopinimu. Vertinant oksidacinį stresą, nustatyta, kad kaptoprilis reikšmingai mažino ADJ susidarymą, o losartanas pasižymėjo antioksidaciniu poveikiu tik didesnių koncentracijų intervale. Šie rezultatai atitinka duomenis apie NADPH oksidazės slopinimą ir oksidacinio streso mažėjimą veikiant RAS inhibitoriams [246–249]. Priešingai, MLN-4760 didino ADJ susidarymą. Kiti tyrėjai nustatė, kad slopinant ACE2, susidaro daugiau ADJ [250].

Endotelio ląstelių genų raiškos pokyčiai

Genų raiškos tyrimai skirtinguose ląstelių modeliuose leido įvertinti audiniui specifinį RAS inhibitorių poveikį uždegimo, adhezijos molekulių, prostaglandinų sintezės bei CYP4F2–20-HETE signalinės ašies reguliacijai. Mūsų tyrimo duomenys parodė, kad kaptoprilis HUVEC ląstelėse sukėlė nuoseklų klasikinių RAS komponentų (ACE) ir endotelio aktyvacijos žymenų (VCAM-1, ICAM-1) mRNR raiškos sumažėjimą, o tai gali būti siejama su priešuždegiminiu ir endotelį apsaugančiu poveikiu. Šių adhezijos molekulių slopinimas yra svarbus, nes jos dalyvauja monocitų prisitvirtinimo prie endotelio procese, inicijuoja uždegiminį atsaką ir prisideda prie aterosklerozinių plokštelių formavimosi bei ED progresavimo. Šie rezultatai patvirtina literatūros duomenis apie AKFi gebėjimą slopinti uždegiminius procesus ir oksidacinį stresą [247].

Nustatyta ir tai, kad didesnės kaptoprilio koncentracijos didino *CYP4F2* ir *GPR75* raišką. Šis reiškinys gali būti interpretuojamas kaip kompensacinis endotelio atsakas į Ang II signalizacijos slopinimą, kai aktyvinami alternatyvūs lipidinių mediatorių ir eikozanoidų signaliniai keliai, siekiant palaikyti kraujagyslių homeostazę.

Losartano poveikis HUVEC ląstelėse buvo selektyvesnis. Nustatytas nuo koncentracijos priklausomas *ACE*, *PTGS2* ir *CYP4F2* raiškos mažėjimas rodo slopinantį poveikį tiek RAS, tiek prostaglandinų ir eikozanoidų metabolizmui. Šių genų slopinimas gali lemti sumažėjusią Ang II priklausomą uždegiminę aktyvaciją ir prostanoidų sintezę, kurie yra svarbūs ED ir aterosklerozės progresavimo veiksniai [178]. *CYP4F2* raiškos sumažėjimas taip pat leidžia manyti apie slopinamą 20-HETE signalinį kelią endotelėje.

Priešingai nei kaptoprilio ar losartano, MLN-4760 poveikis pasižymėjo kompleksiniu ir iš dalies priešingu transkripciniu profiliu. Didėjant šio junginio koncentracijai, buvo stebimas *ACE2* slopinimas kartu su *ICAM-1* ir *PTGS2* raiškos didėjimu, rodančiu uždegiminio endotelio fenotipo formavimąsi ir alternatyvios RAS ašies apsauginio poveikio praradimą. Be to, 1 μ M MLN-4760 koncentracija skatino *CYP4F2* ir *GPR75* raišką, ir tai gali atspindėti kompensacinį eikozanoidų signalinių kelių aktyvinimą ir padidėjusį 20-HETE įsitraukimą į oksidacinį-uždegiminį atsaką.

Inkstų ląstelių genų raiškos pokyčiai

Atsižvelgiant į intrarenalinės RAS svarbą ir jos vaidmenį reguliuojant oksidacinį stresą bei uždegiminius procesus, šių mechanizmų analizei kaip tinkamas modelis buvo pasirinktos RPTEC/TERT1 ląstelės. Inkstų kanalėlių epitelio pažeidimas yra glaudžiai susijęs su sisteminių širdies ir kraujagyslių ligų progresavimu, todėl genų raiškos pokyčių analizė šiame modelyje turi svarbią patofiziologinę reikšmę. Panašiai kaip endotelio ląstelėse, kaptoprilis

RPTEC/TERT1 ląstelėse mažino *ACE*, *VCAM-1* ir *ICAM-1* raišką, rodydamas stiprų priešūždegiminį ir epitelio aktyvaciją slopinantį poveikį. Kadangi šios adhezijos molekulės yra susijusios su tubulointersticiniu uždegimu ir inkstų pažeidimo progresavimu, jų slopinimas gali turėti svarbią renoprotekcinę reikšmę [251]. Be to, nustatytas *CYP4F2* ir *GPR75* raiškos padidėjimas leidžia manyti, kad ir inkstų ląstelėse aktyvuojami nuo 20-HETE priklausomi signaliniai keliai yra kaip kompensacinė reakcija į RAS slopinimą.

Losartanas RPTEC/TERT1 ląstelėse sukėlė nuo koncentracijos priklausomą *ACE*, *VCAM-1*, *PTGS2* ir *CYP4F2* raiškos mažėjimą. Šis transkripcinis profilis rodo slopinantį poveikį tiek RAS, tiek uždegiminiams ir eikozanoidų metabolizmo keliams. Šie pokyčiai gali prisidėti prie oksidacinio streso mažinimo, fibrogenezės slopinimo ir lėtinės inkstų ligos progresavimo lėtinimo [252]. *CYP4F2* raiškos sumažėjimas leidžia daryti prielaidą apie slopinamą 20-HETE signalinį kelią inkstuose.

MLN-4760 poveikis RPTEC/TERT1 ląstelėse buvo kompleksinis ir priklausomas nuo koncentracijos. *ACE2* inhibicija buvo susijusi su *ICAM-1* ir *PTGS2* raiškos didėjimu bei *GPR75* aktyvacija, taip parodydama uždegiminio atsako stiprėjimą ir alternatyvios RAS ašies apsauginio poveikio praradimą. Šie rezultatai papildė ribotus mokslinės literatūros duomenis apie *ACE2* inhibicijos poveikį inkstų ląstelių transkripciniam atsakui.

Kepenų ląstelių genų raiškos pokyčiai

Kepenų ląstelės (HepG2) buvo pasirinktos tyrimui dėl jų svarbos sisteminame *CYP450* priklausomame eikozanoidų metabolizme. Naudojant šį ląstelių modelį buvo siekiama įvertinti, ar RAS inhibitorių poveikis išlieka už kraujagyslių ir inkstų audinių ribų. Mūsų duomenys parodė, kad kaptoprilis HepG2 ląstelėse mažino *ACE* raišką, tačiau didesnėmis koncentracijomis didino *ACE2* ir *CYP4F2* raišką. Tai rodo, kad procese yra svarbios abi RAS ašys bei galimai veikia kompensacinis mechanizmas, padedantis palaukyti metabolinę pusiausvyrą. *CYP4F2* raiškos didėjimas leidžia manyti, kad kaptoprilis gali veikti lipidinių signalinių mediatorių apykaitą kepenyse.

Skirtingai nei kituose modeliuose, losartanas HepG2 ląstelėse neturėjo reikšmingo poveikio RAS komponentų ar adhezijos molekulių raiškai, tačiau reikšmingai mažino *CYP4F2* ir *GPR75* raišką. Tai rodo, kad losartano poveikis kepenyse gali būti labiau susijęs su eikozanoidų metabolizmo slopinimu, o ne su tiesiogine RAS reguliacija.

MLN-4760 poveikis HepG2 ląstelėse buvo selektyvus – nustatyta padidėjusi *ACE2* raiška, ir tai gali būti interpretuojama kaip kompensacinis atsakas į fermento aktyvumo slopinimą [253]. Taip pat nustatytas *GPR75* raiškos sumažėjimas leidžia manyti apie 20-HETE signalinės ašies moduliaciją kepenyse.

4.3. Sinerginis žemo dažnio UG ir RAS inhibitorių poveikis ląstelių funkcijai ir genų raiškai

Kadangi žemo dažnio UG gali veikti kaip mechaninis biologinių sistemų reguliacinis veiksnys, didinantis ląstelių membranų pralaidumą ir jautrumą farmakologiniams veiksniams [254], šio tyrimo *in vitro* dalyje buvo siekiama įvertinti, ar žemo dažnio ir intensyvumo UG (5–10 mW/cm², 69 kHz) gali sustiprinti RAS inhibitorių poveikį endotelio bei inkstų proksimalinių kanalėlių epitelinėse ląstelėse. Toks kombinuotas poveikis yra ypač aktualus siekiant geriau suprasti nefarmakologines strategijas, galinčias moduluoti nuo RAS priklausomus ląstelių atsakus, susijusius su kraujagyslių funkcija, oksidaciniu stresu ir uždegiminiais procesais.

Nustatyta, kad UG didina tiek mažos, tiek didelės molekulinės masės junginių pasisavinimą ląstelėse [255], o jo poveikis apima ne tik terminius, bet ir mechaninius bei cheminius efektus. Pastarieji vis dažniau siejami su kraujagyslių tonuso reguliacija ir įvairių ląstelių signalinių kelių aktyvacija [206]. Atsižvelgiant į šiuos mechanizmus, daroma prielaida, kad UG ir RAS inhibitorių derinimas gali atskleisti naujus endotelio funkcijos gerinimo bei kraujagyslių disfunkcijos mažinimo būdus. Įvertinus ląstelių metabolinio gyvybingumo atsaką nustatyta, kad žemo dažnio UG neturėjo reikšmingo poveikio nei HUVEC, nei RPTEC/TERT1 ląstelių gyvybingumui. Tačiau UG derinimas su RAS inhibitoriais išlaikė farmakologiniam poveikiui būdingą metabolinio aktyvumo profilį. HUVEC ląstelėse tiek kaptoprilis, tiek losartanas, derinami su UG, didino metabolinį aktyvumą, tuo tarpu RPTEC/TERT1 ląstelėse analogiškas efektas buvo nustatytas tik losartano ir UG derinio atveju. Šie rezultatai rodo, kad UG veikia ne kaip savarankiškas stimulatorius, bet kaip farmakologinio poveikio modulatorius, kurio efektyvumas priklauso nuo ląstelės tipo ir taikomo vaisto.

Poveikis ląstelių kultūrų funkcijos rodikliams

Vertinant ląstelių migracijos atsaką į UG ir RAS inhibitorių derinį, nustatyta, kad HUVEC ląstelėse didesnės kaptoprilio (1,75–2,25 μM) ir losartano (2,25–2,75 μM) koncentracijos, taikomos kartu su UG, reikšmingai skatino žaizdos ploto sumažėjimą. Tai rodo, kad mechaninė stimuliacija sustiprina endotelio migracinį potencialą, kuris yra esminis reparacinių procesų veiksnys. Nustatyta, kad migracijos intensyvumas buvo tiesiogiai susijęs su UG taikymu, taip pabrėždamas mechanotransdukcijos reikšmę reguliuojant endotelio atsaką. Nors mokslinėje literatūroje duomenų apie tiesioginį RAS inhibitorių poveikį ląstelių migracijai yra nedaug, manoma, kad šie vaistai gali skatinti migraciją per pleotropinį poveikį endotelio funkcijai ir ACE/Ang II/AT₁R ašies slopinimą [256]. Chen ir bendraautorių

tyrimas su gyvūnų modeliais parodė, kad žemo dažnio UG gali reikšmingai pagreitinti žaizdų gijimą, didėjant kraujagyslių endotelio augimo veiksnio (VEGF) ir TGF- β 1 raiškai [257]. Tai papildomai paaiškina mūsų tyrime stebėtą padidėjusią ląstelių migraciją. RPTEC/TERT1 ląstelėse nustatyta, kad losartano (2,25–2,75 μ M) ir UG derinys reikšmingai skatino sudarytos žaizdos ploto mažėjimą, taip parodydamas sustiprintą regeneracinį atsaką inkstų epitelinėse ląstelėse. Tai leidžia daryti prielaidą, kad AT₁ receptoriaus blokavimas kartu su mechanine stimuliacija gali aktyvinti ląstelių migracijos ir audinių regeneracijos procesus inkstuose.

Oksidacijos-redukcijos proceso pusiausvyros vertinimas

Oksidacijos-redukcijos proceso pusiausvyros vertinimas ląstelėse parodė, kad UG gali moduluoti RAS inhibitorių poveikį oksidaciniam stresui ir NO sintezei. Tiriant HUVEC ląsteles, nustatyta, kad UG reikšmingai didino NO išsiskyrimą esant 1,75–2,25 μ M kaptoprilio koncentracijoms, tuo tarpu esant mažesnėms koncentracijoms, ar veikiant losartanu, toks poveikis nebuvo stebimas. Tai rodo, kad UG poveikis NO sintezei priklauso nuo farmakologinės stimuliacijos intensyvumo. RAS inhibitorių poveikis NO gamybai siejamas su eNOS aktyvinimu ir kofaktoriaus BH₄ prieinamumo didinimu [243], tuo tarpu UG poveikį patvirtina Altland ir bendr. tyrimas, rodantis, kad mechaninė UG stimuliacija aktyvina eNOS ir didina NO sintezę endotelio ląstelėse [202]. Šių mechanizmų sąveika gali paaiškinti mūsų tyrime stebėtą sinerginį efektą.

Inkstų ląstelėse nustatyta, kad UG mažina ADJ kiekį kaptoprilu paveiktose RPTEC/TERT1 ląstelėse, kas rodo galimą šio derinio antioksidacinį poveikį. Vis dėlto svarbu pažymėti, kad didesnio intensyvumo UG gali skatinti kavitacijos procesus, ir tai gali lemti priešingą efektą – ADJ didėjimą [258]. Skirtingai nei tyrimuose su kaptoprilu, UG neturėjo reikšmingo poveikio losartanu veiktų ląstelių oksidacinei būklei.

Poveikis ląstelių kultūrų genų raiškai

Vertinant UG ir RAS inhibitorių derinio poveikį genų raiškai HUVEC ląstelėse, nustatyta, kad kaptoprilio ir UG derinys priklausomai nuo koncentracijos mažina *VCAM-1*, *ICAM-1* ir *PTGS2* raišką. Šie tyrimo rezultatai rodo stiprų sinerginį poveikį, kuris gali būti susijęs tiek su RAS slopinimu, tiek su mechaninės stimuliacijos sukeltu signalinių kelių reguliavimu. Mechaninė UG stimuliacija turėjo reikšmingą įtaką genų raiškos moduliacijai visame tirtame koncentracijų intervale. Pažymėtina, kad mokslinėje literatūroje pateikiami ir prieštaringi duomenys. Memari ir bendr. parodė, kad naudojant fokusuotą UG, *ICAM-1* raiška gali padidėti [259]. Skirtingi tyrimų rezultatai, yra tikėtina, susiję su nevienodomis UG taikymo sąlygomis, nes stipresnis

vietinis mechaninis poveikis gali sukelti laikinus membranos pažeidimus ir aktyvinti uždegimą skatinantį atsaką.

Veikiant losartanu ir UG, reikšmingas *CYP4F2* raiškos sumažėjimas buvo nustatytas tik esant aukštesnėms vaisto koncentracijoms (1,75–2,75 μM). Tai rodo, kad *CYP4F2*–20-HETE ašies moduliacija yra jautri tiek farmakologiniam, tiek mechaniniam poveikiui.

4.4. RAS inhibitorių poveikis 20-HETE sintezei, 20-HETE–GPR75 ašies tyrimai

Nustatyti reikšmingi *CYP4F2* raiškos pokyčiai, veikiant rivaroksabanu, tikagreloru ir RAS inhibitoriais, sudarė pagrindą įvertinti, ar šie molekuliniai pokyčiai atsispindi ir funkciname ARA metabolizmo lygyje, t. y. 20-HETE biosintezėje. Siekiant tai įvertinti, 20-HETE koncentracija buvo nustatyta endotelio ląstelių kultūrų, veiktų kaptoprilu, losartanu ir ACE2 inhibitoriumi MLN-4760, terpės ekstraktuose. Gauti rezultatai parodė skirtingą RAS inhibitorių poveikį 20-HETE sintezei. Nustatyta, kad 1,25–2,25 μM kaptoprilio koncentracijos reikšmingai mažino 20-HETE koncentraciją HUVEC ląstelėse – beveik 2 kartus, palyginti su kontrolinėmis sąlygomis. Tuo tarpu losartanas reikšmingo poveikio 20-HETE koncentracijai neturėjo. Priešingai, ACE2 inhibicija MLN-4760 sukėlė nuo koncentracijos priklausomą 20-HETE koncentracijos didėjimą, kurio didžiausias efektas siekė apie 1,6 karto, palyginti su kontrole. Šie rezultatai patvirtina, kad RAS ir *CYP450* priklausomas eikozanoidų metabolizmas yra glaudžiai susiję per dvikryptę reguliacinę sąveiką. Naujausi duomenys rodo, kad 20-HETE veikia ne tik kaip metabolitas, bet ir kaip signalinė molekulė, galinti skatinti ED, oksidacinį stresą bei palaikyti RAS aktyvumą, skatindama uždegiminius ir vazokonstriktinius signalinius kelius [15]. Tokia tarpusavio sąveika sudaro sąlygas teigiamiems grįžtamojo ryšio mechanizmams, kurie gali sustiprinti uždegiminius procesus kraujagyslių sienoje. Kaptoprilio sukeltas 20-HETE koncentracijos sumažėjimas gali būti įvardinamas kaip tiesioginė funkcinė RAS slopinimo pasekmė. Mažėjantis Ang II kiekis lemia sumažėjusią su *CYP450* kilmės eikozanoidų sinteze susijusių signalinių kelių aktyvaciją. Kita vertus, tai, kad losartanas neturėjo įtakos 20-HETE koncentracijai, leidžia daryti prielaidą, kad šio metabolito sintezė nėra tiesiogiai priklausoma nuo AT_1 receptorių blokavimo ir gali būti reguliuojama alternatyviais signaliniais keliais.

MLN-4760 sukeltas 20-HETE koncentracijos didėjimas yra ypač reikšmingas vertinant RAS disbalansą. ACE2 inhibicija mažina Ang 1–7 susidarymą ir santykinai sustiprina klasikinės RAS ašies (ACE/Ang II/ AT_1R) dominavimą. Eksperimentiniuose modeliuose ACE2 slopinimas siejamas su

Ang II kaupimusi ir nepalankiais kraujagyslių remodeliacijos procesais [260]. Tad mūsų tyrime nustatytas 20-HETE padidėjimas gali atspindėti pakitusios signalinės aplinkos būseną, kuri sudaro palankias sąlygas uždegiminių procesų aktyvacijai ir palaiko 20-HETE biosintezę endotelio ląstelėse. Siekiant įvertinti, ar 20-HETE gali tiesiogiai veikti ląstelių funkciją, buvo vertintas 20-HETE ir jos antagonisto 19(R)-HETE poveikis HUVEC, RPTEC/TERT1 ir HepG2 ląstelių metaboliniam gyvybingumui. Nustatyta, kad 20-HETE reikšmingai mažino visų tirtų ląstelių kultūrų metabolinį aktyvumą, o didžiausias poveikis stebėtas esant 100 nM koncentracijai. Nors moksliniuose straipsniuose skelbiama, kad 20-HETE gali skatinti endotelio ląstelių proliferaciją per VEGF priklausomus mechanizmus [261], šis poveikis nėra tiesiogiai siejamas su metaboliniu gyvybingumu. Mūsų tyrimo rezultatai rodo priešingą tendenciją – metabolinio aktyvumo mažėjimą, kuris gali būti susijęs su 20-HETE gebėjimu skatinti mitochondrijų oksidacinį stresą. Tai patvirtina Lakhkar ir bendr. duomenys, rodantys, kad 20-HETE indukuoja mitochondrijų superoksido gamybą ir aktyvina MAPK priklausomą uždegiminį atsaką, didindamas TNF- α raišką [262]. Taip pat, šio metabolito biosintezė yra NADPH priklausoma ir gali būti slopinama gliukozės-6-fosfato dehidrogenazės (G6PD), kuri mažina 20-HETE sukeltus redokso ir uždegiminius pokyčius.

Tyrimai su 20-HETE antagonistu parodė, kad 19(R)-HETE selektyviai veikė tik HepG2 ląstelių gyvybingumą – 2–100 nM koncentracijos didino šių ląstelių metabolinį aktyvumą. Šis selektyvus poveikis leidžia manyti, kad 20-HETE signalizacija yra stipriai priklausoma nuo ląstelių tipo ir specifinių metabolinių savybių, ypač būdingų kepenų ląstelėms.

Pastarąjį dešimtmetį 20-HETE biologinė reikšmė gerokai išsiplėtė, nustačius jos receptorių – su G baltymu susijusį receptorių GPR75, per kurį 20-HETE gali aktyvinti su uždegimu, proliferacija ir kraujagyslių disfunkcija susijusius signalinius kelius [192]. Naujausiose tyrimų apžvalgose pabrėžiama, kad 20-HETE–GPR75 ašis yra svarbi ne tik AH ir ED patogenezėje, bet ir metabolinio sindromo bei insulino rezistencijos vystymesi [263]. Mūsų tyrimo rezultatai papildė šiuos duomenis, atskleisdami, kad 20-HETE tiesiogiai moduliuoja GPR75 raišką skirtingų audinių ląstelėse. Nustatyta, kad 1–100 nM 20-HETE didina *GPR75* raišką HUVEC, RPTEC/TERT1 ir HepG2 ląstelėse, tačiau atsako intensyvumas buvo priklausomas nuo ląstelių tipo. RPTEC/TERT1 ląstelėse šis efektas buvo silpnesnis ir pasireiškė tik esant didesnėms (10–100 nM) koncentracijoms, kas leidžia manyti, kad GPR75 raiška gali būti reguliuojama papildomais signaliniais veiksniais. Bazinė GPR75 baltymo raiška HUVEC ir HepG2 ląstelėse buvo nežymi ir daugiausia nustatyta citoplazmoje, kas rodo ribotą receptoriaus raišką ramybės sąlygomis. Toks pasiskirstymas atitinka literatūros duomenis apie GPR75

raišką ne neuroninės kilmės ląstelėse, kuriose receptoriaus aktyvacija priklauso nuo ligandų prieinamumo ir ląstelės funkcinės būklės [264].

Apibendrinant, gauti rezultatai leidžia manyti, kad 20-HETE veikia kaip aktyvus efektorinis ligandas, galintis ne tik aktyvuoti GPR75 signalinius kelius, bet ir didinti paties receptoriaus raišką, taip sustiprindamas šios signalinės ašies aktyvumą. Tai suteikia papildomą pagrindą vertinti CYP4F2–20-HETE–GPR75 ašies moduliaciją kaip svarbų mechanizmą kraujagyslių disfunkcijos ir uždegiminių procesų patogenezėje.

4.5. RAS–ACE2 ir CYP4F2–20-HETE ašių klinikinė reikšmė sergant IŠL

Endotelio ir inkstų proksimalinių kanalėlių epitelinėse ląstelėse nustatyti CYP4F2–20-HETE metabolinės ašies bei nuo ACE2 priklausomų signalinių kelių pokyčiai leidžia manyti, kad šie molekuliniai mechanizmai yra svarbūs aterosklerozės ir IŠL patogenezei. Siekiant įvertinti ląstelių kultūrų modeliuose nustatytų biožymenų klinikinę reikšmę, atlikti tyrimai su žmogaus biologine medžiaga. Buvo tiriamos cirkuliuojančios ACE2 ir 20-HETE koncentracijos IŠL sergančių pacientų, gydytų RAS inhibitoriais, grupėje, analizuota *CYP4F2* genetinių variantų įtaka šių biožymenų koncentracijoms, taip pat vertintos jų sąsajos su kraujo krešėjimo sistemos aktyvumu ir IŠL klinikinėmis formomis.

Tiriamųjų demografinės charakteristikos atitiko tipinę IŠL sergančių pacientų populiaciją: daugumą sudarė vyrai, o amžiaus mediana siekė 70 metų. Toks lyties ir amžiaus pasiskirstymas dera su epidemiologiniais duomenimis, rodančiais, kad IŠL dažniau diagnozuojama vyrams ir dažniausiai pasireiškia vyresniame amžiuje [265]. Vyresnio amžiaus asmenų įtraukimas į palyginamąją grupę leido sumažinti su amžiumi susijusių ACE2 ir 20-HETE pokyčių įtaką ir tiksliau įvertinti su IŠL susijusius molekulinis mechanizmus.

Visiems tiramiesiems buvo nustatytas atsvaris arba I laipsnio nutukimas, kurie priskiriami reikšmingiems aterosklerozės patogenezės veiksniams. Šios būklės siejamos su lėtiniu sisteminiu uždegimu, padidėjusiu oksidaciniu stresu ir metaboliniais pokyčiais, skatinančiais ED ir aterosklerozinių pažeidimų formavimąsi. Be to, adipocitams būdinga vietinė RAS komponentų raiška, todėl nutukimas gali stiprinti RAS aktyvumą ir didinti Ang II sukeltą kraujagyslių pažeidimą [266].

AH buvo dažna gretutinė būklė visiems IŠL sergantiems pacientams. Ilgalaiskis padidėjęs arterinis kraujospūdis sukelia hemodinaminį krūvį kraujagyslių sienai, kuris per mechanotransdukcijos mechanizmus aktyvina

pro-uždegiminius ir vazokonstriktinius signalinius kelius, įskaitant Ang II/AT₁ ir CYP4F2–20-HETE ašis. Šių sistemų aktyvacija siejama su ED, oksidaciniu stresu ir kraujagyslių remodeliacija – pagrindiniais aterosklerozės progresavimo mechanizmais. Atsižvelgiant į sisteminių šių procesų pobūdį, buvo pagrįstai tikėtasi, kad RAS ir eikozanoidų metabolizmo pokyčiai gali būti aptinkami sisteminėje kraujotakoje, todėl buvo tiriamos cirkuliuojančios ACE2 ir 20-HETE koncentracijos skirtingose IŠL klinikinėse formose.

ŪKS vystymasis susijęs su sudėtinga ED, uždegimo, oksidacinio streso ir trombozės sąveika [81, 267], kurioje svarbų vaidmenį atlieka tiek RAS, tiek ARA metabolitai. Šio tyrimo duomenys parodė, kad ACE2 ir 20-HETE koncentracijos reikšmingai skyrėsi tarp skirtingų IŠL klinikinių formų: mažiausios jų reikšmės nustatytos ŪKS pacientams. Tai leidžia manyti, kad ūminės išemijos metu sutrinka tiek apsauginės RAS ašies, tiek eikozanoidų metabolizmo pusiausvyrą, o šie pokyčiai gali būti susiję su aterosklerozinės plokštelės destabilizacija ir ŪKS pasireiškimu.

ACE2, kaip pagrindinis apsauginės RAS ašies fermentas, mažina Ang II poveikį ir pasižymi vazodilataciniu bei priešuždegiminiu veikimu [268, 269]. Todėl sumažėjusi ACE2 koncentracija ŪKS pacientams gali atspindėti šios apsauginės sistemos slopinimą ūminės išemijos metu ir būti susijusi su intensyvesniu uždegiminiu atsaku bei didesniu kraujagyslių pažeidimu. Be to, nors dauguma pacientų buvo gydomi AKFi, šie vaistai tiesiogiai nedidina ACE2 koncentracijos, todėl ūminės būklės metu gali išlikti RAS disbalansas [269].

Kraujagyslių homeostazėje svarbų vaidmenį atlieka ir CYP450 fermentų metabolizuojami eikozanoidai, tarp jų – 20-HETE. Eksperimentiniai tyrimai rodo, kad 20-HETE gali skatinti ADJ susidarymą ir aktyvinti uždegiminius signalinius kelius [186, 262]. Vis dėlto mūsų tyrime nustatytas sumažėjęs 20-HETE kiekis ŪKS pacientams rodo, kad šis mediatorius negali būti vertinamas vien tik kaip žalingas veiksnys. Tikėtina, kad ūminės išemijos metu 20-HETE koncentracija mažėja dėl padidėjusio jo sunaudojimo aktyvių uždegiminių ir trombozinių procesų metu arba dėl sutrikusios sintezės esant padidėjusiam oksidaciniam stresui, kuris gali slopinti CYP450 fermentų aktyvumą [270, 271]. Ankstesni tyrimai rodo, kad ARA metabolitai gali kisti ankstyvose išemijos stadijose, dar prieš padidėjant miokardo nekrozės žymenims [272–274]. Tai leidžia manyti, kad eikozanoidų pokyčiai gali atspindėti ankstyvus kraujagyslių ir metabolinius sutrikimus, susijusius su endotelio funkcijos pažeidimu.

Genetinė analizė parodė, kad *CYP4F2* geno variantai neturėjo reikšmingos įtakos ACE2 koncentracijai nė vienoje tiriamųjų grupėje. Vis dėlto SKA grupėje nustatyta reikšminga *CYP4F2* rs1558139 varianto įtaka 20-HETE koncentracijai: GG genotipas buvo susijęs su didesnėmis šio biožymens

reikšmėmis, palyginti su AG genotipu. Šių skirtumų nebuvo stebėta ŪKS pacientams, todėl galima manyti, kad ūminiai patofiziologiniai procesai nusveria genetinę įtaką 20-HETE koncentracijai. SKA atveju genetiniai veiksniai išlieka svarbūs, o ŪKS metu cirkuliuojančios 20-HETE koncentracijos labiau atspindi metabolinius ir oksidacinius pokyčius [275].

Mūsų rezultatai parodė, kad 20-HETE pasižymi aukšta diagnostine verte diferencijuojant ŪKS ir SKA. Nustatytas plotas po ROC kreive ($AUC = 0,91$) rodo gerą diskriminacinį tikslumą, o siūloma ribinė vertė ($\leq 11,34$ ng/ml) pasižymi palankiu jautrumo ir specifiškumo santykiu. Tai leidžia manyti, kad 20-HETE galėtų būti naudingas papildomas diagnostinis biožymuo klinikinėje praktikoje, ypač tais atvejais, kai įprasti miokardo pažeidimo rodikliai nėra pakankamai informatyvūs.

Skirtingai nei troponinai, kurie atspindi jau įvykusią kardiomiocitų nekrozę, 20-HETE gali atspindėti ankstesnius patofiziologinius procesus, susijusius su kraujagyslių funkcijos sutrikimu. Ankstesni tyrimai rodo, kad eikozanoidų pokyčiai gali pasireikšti dar prieš išryškėjant klasikiniams nekrozės žymenims [272–274]. Todėl 20-HETE sumažėjimas ŪKS metu gali būti interpretuojamas kaip ankstyvas kraujagyslių homeostazės sutrikimo rodiklis. Svarbu pabrėžti, kad 20-HETE diagnostinė vertė gali būti susijusi ne vien su jos koncentracijos pokyčiais, bet ir su gebėjimu atspindėti aktyvius aterotrombozinius procesus. ŪKS vystymasis siejamas su aterosklerozinės plokštelės destabilizacija ir trombozės inicijavimu, o eikozanoidai dalyvauja šiuose procesuose reguliuodami kraujagyslių aktyvumą ir uždegiminį atsaką. Todėl 20-HETE gali būti vertinama kaip biožymuo, atspindintis perėjimą nuo stabilios aterosklerozės prie kliniškai nestabilios būklės.

Palyginti su tradiciniais uždegimo žymenimis, tokiais kaip didelio jautrumo CRP ar mieloperoksidazė (MPO), kurių diagnostinė vertė diferencijuojant ŪKS ir stabilias būkles yra ribota ($AUC = 0,65–0,75$), 20-HETE pasižymi didesniu diskriminaciniu tikslumu [276, 277]. Tai rodo, kad šis biožymuo gali suteikti papildomos informacijos apie kraujagyslių būklę, kurios neatskleidžia įprasti laboratoriniai tyrimai. Be to, ŪKS grupėje nustatyta žemesnė ACE2 koncentracija (5,5 ng/ml) atitinka ankstesnių tyrimų duomenis, rodančius, kad sumažėjęs ACE2 aktyvumas susijęs su didesne Killip klase ir didesne ankstyvųjų nepageidaujamų klinikinių įvykių rizika [278–280]. Todėl 20-HETE vertinimas kartu su ACE2 gali suteikti išsamesnį vaizdą apie kraujagyslių reguliacijos pusiausvyrą ir padėti išskirti pacientus, kuriems yra didesnė ūminių išeminių įvykių rizika.

Tyrimo ribotumai

Vienas pagrindinių šio tyrimo ribotumų yra palyginti nedidelė vieno centro tiriamųjų imtis, kuri gali riboti rezultatų apibendrinimą. Todėl siūlomą 20-HETE ribinę vertę būtina patvirtinti didesnėse, daugiacentrėse studijose. Taip pat amžiaus skirtumai tarp tiriamųjų grupių galėjo turėti įtakos eikozanoidų metabolizmui ir paveikti gautus rezultatus. Be to, nebuvo vertinta cirkuliuojančių ACE2 ir 20-HETE koncentracijų dinamika bei jų ilgalaikė prognozinė reikšmė didžiųjų nepageidaujamų širdies ir kraujagyslių įvykių atžvilgiu. Nors analizuoti *CYP4F2* genetiniai variantai ir pagrindiniai vartojami vaistai, negalima atmesti kitų farmakologinių, genetinių ar epigenetinių veiksnių įtakos cirkuliuojančios 20-HETE koncentracijai.

20-HETE paradoksas

Apibendrinant galima teigti, kad RAS–ACE2 ir CYP4F2–20-HETE–GPR75 ašys sudaro tarpusavyje susijusį reguliacinį tinklą, turintį reikšmingą vaidmenį endotelio funkcijos, oksidacinio streso, uždegimo ir trombozės procesų reguliacijoje sergant IŠL. *In vitro* tyrimai parodė, kad tiek antikoagulantai bei antiagregantai, tiek RAS inhibitoriai gali moduluoti *CYP4F2* raišką bei 20-HETE aktyvumą endotelio, inkstų ir kepenų ląstelėse, o šių pokyčių pobūdis priklauso nuo ląstelės tipo ir taikyto farmakologinio poveikio. Kaptoprilis buvo susijęs su palankesniu endotelio atsaku – didesniu NO susidarymu, geresniu migraciniu pajėgumu ir mažesniu 20-HETE aktyvumu, tuo tarpu losartanas ryškiau slopino *CYP4F2* raišką. Priešingai, ACE2 slopinimas MLN-4760 buvo susijęs su didesniu 20-HETE aktyvumu, padidėjusia *GPR75* raiška ir uždegiminiam fenotipui palankesniais pokyčiais, kas leidžia manyti, jog alternatyvios RAS ašies slopinimas sudaro sąlygas proaterogeniniams signaliniams mechanizms stiprėti. Šiuos duomenis papildė ir žemo dažnio UG tyrimai, parodė, kad mechaninė stimuliacija gali sustiprinti RAS inhibitorių biologinį poveikį, moduluodama ląstelių migraciją, NO išsiskyrimą, oksidacinio streso rodiklius ir su uždegimu bei eikozanoidų metabolizmu susijusių genų raišką. Tai rodo, kad farmakologinis ir fizikinis poveikis gali veikti sinergiškai, o CYP4F2–20-HETE ašis yra jautri abiejų tipų moduliacijai.

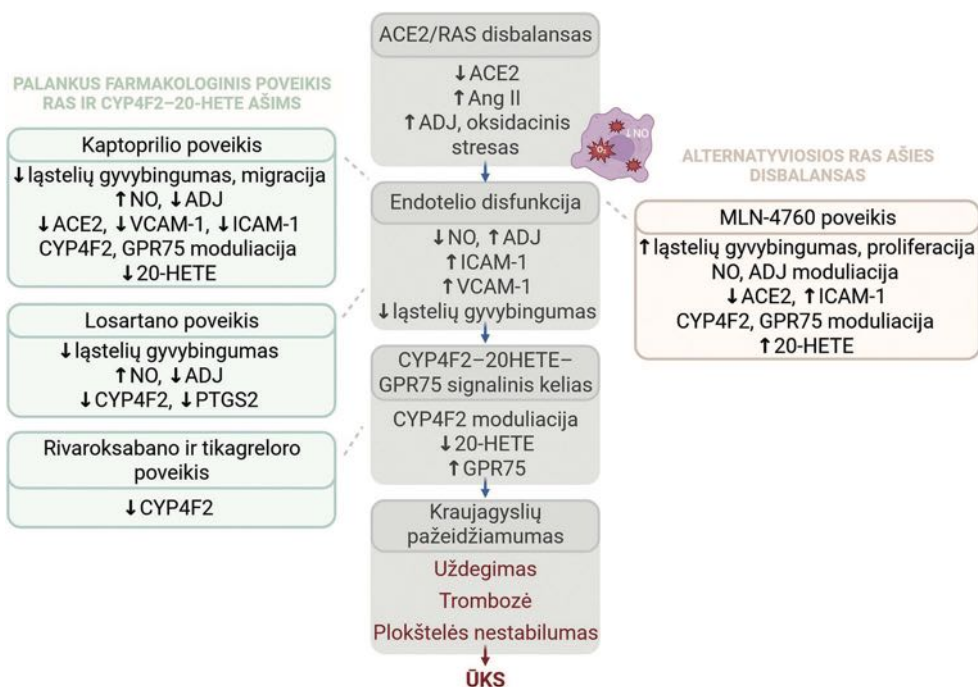
Ne mažiau svarbūs ir tyrimai su 20-HETE bei GPR75, kurie parodė, kad 20-HETE nėra vien pasyvus metabolinis biožymuo, bet aktyvus signalinis mediatorius. Nustatyta, kad 20-HETE mažino HUVEC, RPTEC/TERT1 ir HepG2 ląstelių metabolinį aktyvumą bei didino *GPR75* raišką visose tirtose ląstelių kultūrose, ypač endotelio modelyje. Tai leidžia manyti, kad 20-HETE per GPR75 gali stiprinti save palaikančią signalinę ašį, kuri prisideda prie ED, uždegiminio atsako ir kraujagyslių pažeistos progresavimo. Taigi, ląstelių tyrimų duomenys leidžia 20-HETE vertinti kaip aktyvų proaterogeninių

procesų mediatorių, dalyvaujančių ankstyvuose aterosklerozės ir IŠL patogenezės etapuose. Vis dėlto klinikiniai duomenys parodė, kad šio metabolito vaidmuo nėra vienakryptis ir turi būti aiškinamas atsižvelgiant į ligos fazę.

Klinikinėje šios disertacijos dalyje nustatyta, kad mažiausios ACE2 ir 20-HETE koncentracijos buvo būdingos ŪKS pacientams, o tai rodo, kad ūminės išemijos metu sutrinka tiek apsauginė RAS pusiausvyra, tiek eikozanoidų metabolizmas. Tokie rezultatai leidžia manyti, kad 20-HETE vaidmuo IŠL patogenezėje yra dinamiškas ir priklausomas nuo klinikinės ligos fazės. Stabiles koronarinės anginos metu didesnė 20-HETE koncentracija tikriausiai atspindi lėtinę CYP4F2–20-HETE ašies aktyvaciją, susijusią su užsitiesusiu kraujagyslių uždegimu, ED ir pakitusiu kraujagyslių tonuso reguliavimu. Tuo tarpu ŪKS metu nustatytos mažesnės 20-HETE koncentracijos greičiausiai rodo ne sumažėjusią šio metabolito biologinę reikšmę, bet ūminį eikozanoidų metabolizmo išsibalansavimą. Tikėtina, kad ūminės išemijos metu 20-HETE koncentracija mažėja dėl padidėjusio jos sunaudojimo aktyvių uždegiminių ir trombozinių procesų metu bei dėl sutrikusios sintezės intensyvaus oksidacinio streso sąlygomis. Šią interpretaciją sustiprina ir tai, kad genetinė *CYP4F2* varianto įtaka 20-HETE koncentracijai buvo nustatyta SKA, bet ne ŪKS grupėje, vadinasi, ūminėje fazėje genetinius veiksnius greičiausiai nusveria intensyvūs metaboliniai ir uždegiminiai pokyčiai.

Svarbu ir tai, kad 20-HETE pasižymėjo didele diagnostine verte diferencijuojant ŪKS ir SKA, o jos ryšys su ADF indukuota trombocitų agregacija rodo galimą šio biožymens reikšmę vertinant aterotrombozinių procesų aktyvumą. Kartu su ACE2 nustatytos sąsajos leidžia manyti, kad šie du biožymenys atspindi ne atskirus, o tarpusavyje persipinančius kraujagyslių reguliacijos mechanizmus. Todėl cirkuliuojančių 20-HETE ir ACE2 koncentracijų vertinimas gali suteikti papildomos informacijos apie kraujagyslių homeostazės sutrikimą, ligos biologinį aktyvumą ir perėjimą nuo stabilios aterosklerozės prie kliniškai nestabilios būklės. Šio darbo rezultatai pagrindžia sampratą, kad CYP4F2–20-HETE–GPR75 ašis ir RAS–ACE2 signaliniai keliai yra svarbūs, tarpusavyje susiję IŠL patogenezės mechanizmai, galintys prisidėti tiek prie ankstyvos ED, tiek prie vėlesnių aterotrombozinių komplikacijų vystymosi. Tai suteikia pagrindą šiuos kelius laikyti perspektyviais biožymenų ir galimų terapinių taikinių šaltiniais, ypač siekiant tiksliau diferencijuoti klinikines IŠL formas ir individualizuoti gydymą.

Apibendrinant pagrindinius šio tyrimo rezultatus, 4.5.1 pav. pateikta siūlomos sąveikos tarp ACE2/RAS disbalanso, ED, CYP4F2–20-HETE signalinio kelio ir kraujagyslių pažeidžiamumo, lemiančio ŪKS, schema.



4.5.1 pav. Siūlomas ACE2–RAS–eikozanoidų ašies reguliacijos sutrikimo modelis ŪKS metu

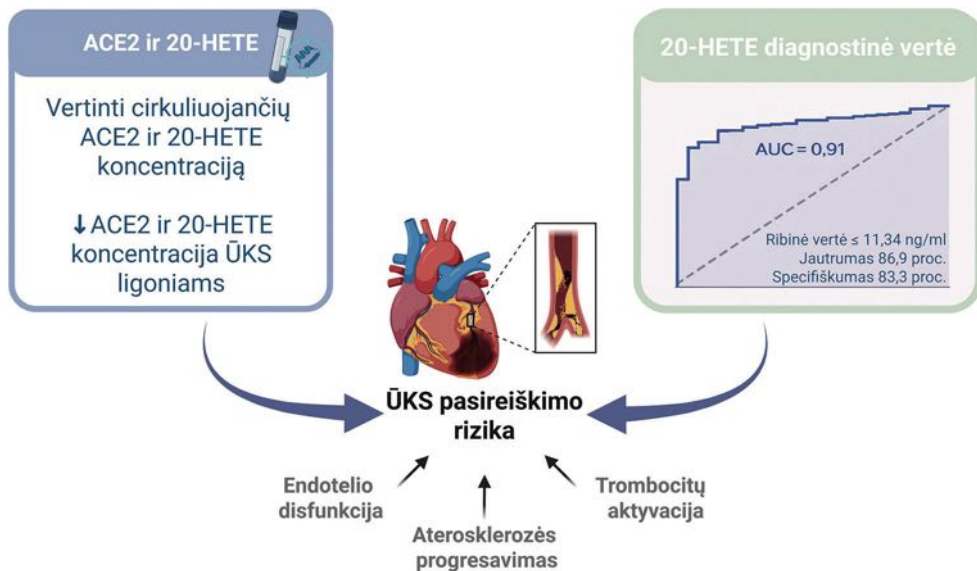
IŠVADOS

1. Antikoagulantų ir antiagregantų poveikis *CYP4F2* raiškai endotelio ląstelėse priklauso nuo vaisto koncentracijos. Tiek rivaroksabanas, tiek tikagreloras reikšmingai slopina *CYP4F2* geno raišką HUVEC ląstelėse. *CYP4F2* baltymo koncentracija reikšmingai mažėja tik paveikus tikagreloru, tuo tarpu rivaroksabanas reikšmingo poveikio *CYP4F2* baltymo koncentracijai nedaro.
2. Kaptoprilis, losartanas ir MLN-4760 skirtingai veikia HUVEC, RPTEC/TERT1 ir HepG2 ląstelių kultūras, o poveikis priklauso nuo ląstelių tipo. HUVEC ir RPTEC/TERT1 ląstelėse kaptoprilis ir losartanas mažina RAS komponentų ir adhezijos molekulių genų raišką bei yra susiję su teigiamais funkciniais ir metaboliniais pokyčiais. HUVEC ląstelėse kaptoprilis mažina 20-HETE aktyvumą, o losartanas slopina *CYP4F2* raišką. MLN-4760 poveikis yra susijęs su alternatyvios RAS ašies slopinimu ir padidėjusiu 20-HETE aktyvumu bei *GPR75* raiška. HepG2 ląstelėse RAS ir *CYP4F2*–20-HETE metabolinės ašies pokyčiai yra mažiau išreikšti, rodydami jų priklausomybę nuo ląstelės tipo.
3. Žemo dažnio ultragarsas, taikytas kartu su kaptoprilium ir losartanu, moduliuoja HUVEC ir RPTEC/TERT1 ląstelių funkcinį atsaką ir stiprina vaistų biologinį poveikį. HUVEC ląstelėse žemo dažnio ultragarsas didina RAS inhibitorių sukeltą ląstelių migraciją ir NO susidarymą, rodydamas palankų poveikį endotelio funkcijai. Be to, žemo dažnio ultragarsas keičia uždegimo ir eikozanoidų metabolizmo genų raišką, įskaitant *CYP4F2*, patvirtindamas *CYP4F2*–20-HETE ašies dalyvavimą ląstelių atsake. RPTEC/TERT1 ląstelėse žemo dažnio ultragarsas veikia priklausomai nuo taikyto RAS inhibitoriaus ir moduliuoja ląstelių migracijos bei oksidacinio atsako rodiklius.
4. Hidroksieikozatetraeno rūgščių poveikis ląstelių funkcijai priklauso nuo junginio ir ląstelių tipo. 20-HETE mažina HUVEC, RPTEC/TERT1 ir HepG2 ląstelių metabolinį aktyvumą, o 19(R)-HETE HepG2 ląstelėse jį didina. 20-HETE didina *GPR75* receptoriaus raišką visose tirtose ląstelių kultūrose, ypač HUVEC modelyje, patvirtindama *CYP4F2*–20-HETE–*GPR75* ašies svarbą ląstelių funkcijos reguliacijai.

5. IŠL sergančių ir RAS inhibitoriais gydytų SKA pacientų grupėje aukštesnė ACE2 koncentracija yra susijusi su AKFi vartojimu, o ARB vartojimas – su žemesne ACE2 koncentracija. Skirtingų AKFi vartojimas reikšmingų ACE2 ir 20-HETE koncentracijų skirtumų tarp vaistų nerodo. Tikagreloro vartojimas yra susijęs su aukštesne 20-HETE koncentracija ŪKS grupėje, o klopidogrelio vartojimas – su žemesne 20-HETE koncentracija SKA ir ŪKS grupėse. *CYP4F2* rs1558139 variantas yra reikšmingai susijęs su 20-HETE koncentracija SKA grupėje: dominantiniame modelyje GG genotipą turintiems pacientams nustatoma aukštesnė 20-HETE koncentracija, palyginti su AG ir AA genotipais. Aukštesnė trombocitų agregacija paveikus ADF yra susijusi su aukštesnėmis ACE2 ir 20-HETE koncentracijomis.
6. ACE2 ir 20-HETE koncentracijos reikšmingai skiriasi tarp skirtingų IŠL klinikinių grupių – mažiausios jų reikšmės nustatomos ŪKS pacientams, palyginti su SKA ir palyginamąja grupe. ACE2 ir 20-HETE koncentracijos yra nepriklausomai susijusios su ŪKS pasireiškimu tikimybė, tačiau ROC analizė rodo, kad 20-HETE pasižymi didesne diagnostine verte, o ACE2 įtraukimas į modelį jo diskriminacinės gebos reikšmingai nepagerina. Šie rezultatai rodo, kad 20-HETE yra perspektyvus biožymuo diferencijuojant IŠL klinikines formas ir vertinant ligos progresavimą.

PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

Cirkuliuojančių ACE2 ir 20-HETE koncentracijų nustatymas gali būti naudingas diferencijuojant stabilią ir ūminę išeminės širdies ligos formas, nes ŪKS sergantiems pacientams nustatomos žemesnės šių biožymenų koncentracijos.



Praktinių rekomendacijų pav. ACE2 ir 20-HETE reikšmė vertinant ŪKS

SUMMARY

ABBREVIATIONS

20-HETE	–	20-hydroxyeicosatetraenoic acid
ACE2	–	angiotensin-converting enzyme 2
ACEI	–	angiotensin-converting enzyme inhibitor
ACS	–	acute coronary syndrome
ADP	–	adenosine diphosphate
AH	–	arterial hypertension
ALT	–	alanine aminotransferase
ARA	–	arachidonic acid
ARB	–	angiotensin II receptor blocker
AST	–	aspartate aminotransferase
AUC	–	area under the curve
BMI	–	body mass index
BP	–	blood pressure
BSA	–	bovine serum albumin
CCTA	–	coronary computed tomography angiography
CI	–	confidence interval
CRP	–	C-reactive protein
CTO	–	chronic total occlusion
DMSO	–	dimethyl sulfoxide
ESC	–	European Society of Cardiology
ED	–	endothelial dysfunction
FBS	–	fetal bovine serum
FC	–	fold change
HDL	–	high-density lipoprotein
HRP	–	high-risk atherosclerotic plaques
IHD	–	ischemic heart disease
INR	–	international normalized ratio
LDL	–	low-density lipoprotein
LFUS	–	low-frequency ultrasound
MI	–	myocardial infarction
MTT	–	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
ND	–	no data
NO	–	nitric oxide
OR	–	odds ratio
PBS	–	phosphate-buffered saline
qPCR	–	quantitative real-time PCR
RAS	–	renin–angiotensin system
ROC	–	receiver operating characteristic
ROS	–	reactive oxygen species
rs	–	Spearman's rank correlation coefficient
SAP	–	stable angina pectoris
TFRC	–	transferrin receptor

1. INTRODUCTION

Ischemic heart disease (IHD), according to the World Health Organization, is one of the most significant chronic non-infectious diseases and accounts for the largest proportion of morbidity and mortality within the group of cardiovascular diseases (CVD), both globally and across Europe [1]. Despite substantial progress in the prevention and treatment of IHD, epidemiological indicators demonstrate that Lithuania remains among the European countries characterized by a particularly high prevalence of coronary artery disease and IHD-related mortality [2, 3]. The clinical presentation of IHD is heterogeneous and includes both chronic and acute ischemic syndromes [4]. Chronic ischemic syndromes are associated with long-term, relatively stable impairments in myocardial perfusion. In contrast, acute syndromes are characterized by sudden coronary artery occlusion events, most commonly caused by atherosclerotic plaque destabilization and thrombosis. Therefore, increasing attention is being directed toward the identification of molecular and biochemical biomarkers that could improve disease assessment, prognostication, and the individualization of treatment.

The pathogenesis of IHD is multifactorial and involves interconnected hemodynamic, inflammatory, oxidative, and thrombotic mechanisms. Experimental and clinical evidence accumulated over recent decades suggests that dysfunction of the endothelium of epicardial coronary arteries and the microvasculature represents an important factor in IHD development [5–7]. This condition, referred to as endothelial dysfunction (ED), is characterized by impaired endothelial functional homeostasis, leading to an altered vascular response to physiological and pathological stimuli. ED is associated with an imbalance between vasodilatory and vasoconstrictive factors, increased oxidative stress, activation of inflammatory signaling pathways, and changes in vascular permeability [8]. These interrelated processes promote the progression of atherosclerosis, contribute to coronary microvascular dysfunction, and ultimately result in impaired myocardial perfusion manifested clinically as ischemic syndromes. ED is considered one of the earliest indicators of cardiovascular dysfunction. Impaired endothelial function reduces the ability of small vessels to dilate appropriately in response to increased myocardial metabolic demand. At the level of epicardial coronary arteries, ED represents an early functional alteration of the vascular wall that precedes structural atherosclerotic changes [9]. Consequently, assessment of endothelial function may serve as a valuable tool for evaluating IHD risk and the effectiveness of atheroprotective therapy. Although direct assessment of endothelial function remains methodologically challenging in clinical practice, increasing attention is being paid to circulating molecular and bioche-

mical markers reflecting endothelial activation and inflammatory status. These biomarkers and alterations in endothelial signaling pathways enable indirect evaluation of endothelial function and pharmacological effects, particularly in the context of inflammation and vascular regulation [10].

One of the key biological regulatory systems involved in endothelial function is the renin–angiotensin system (RAS). This system plays a crucial role in the regulation of vascular tone, inflammatory processes, and endothelial homeostasis [11]. Dysregulation of RAS components has been associated with the development of ED, progression of atherosclerosis, and adverse clinical outcomes in IHD. Therefore, pharmacological inhibition of RAS using angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEIs) or angiotensin II receptor blockers (ARBs) is considered an essential component of atheroprotective therapy [12–14]. In recent years, increasing attention has also been given to the alternative RAS axis involving angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2). Studies using selective ACE2 inhibitors provide new insights into the role of this pathway in endothelial function at the molecular level. Considering the role of the kidneys in systemic hemodynamic regulation and RAS activity, renal cell models may also be relevant for the evaluation of systemic vascular dysfunction. In addition to RAS, vascular homeostasis is influenced by the CYP4F2–20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE)–GPR75 signaling pathway, which is involved in the regulation of vascular inflammation and thrombogenesis [15]. Recent studies indicate that antiplatelet agents may indirectly affect CYP4F2 activity and exert pleiotropic effects on endothelial function beyond platelet inhibition [16]. Thus, the interaction between the RAS and CYP4F2–20-HETE–GPR75 pathways may be important for understanding vascular injury mechanisms and interindividual variability in therapeutic response.

Although current guidelines of the European Society of Cardiology (ESC) recommend the use of RAS inhibitors and antiplatelet agents as standard therapy for IHD, substantial variability in treatment response is observed in clinical practice. This variability is influenced not only by clinical factors but also by pharmacogenomic mechanisms, including transcriptional regulation of enzymes, epigenetic modifications, and the impact of the inflammatory microenvironment on enzyme activity. In order to enhance pharmacological responses at the molecular level, novel strategies for modulating biological responses are being explored. Experimental models have investigated non-pharmacological approaches, such as low-frequency ultrasound (LFUS), which may influence cell membrane permeability, signaling pathway activity, and gene expression, thereby potentially enhancing drug effects and modulating cellular functions. Therefore, investigating the interactions between RAS, the CYP4F2–20-HETE–GPR75 pathway, and

endothelial function is essential for improving the understanding of therapeutic response variability and identifying novel biomarkers and targets for atheroprotective therapy in IHD.

In this study, experimental *in vitro* investigations using cell cultures were initially performed to evaluate the interaction between RAS and eicosanoid metabolism at the molecular level. Particular emphasis was placed on the CYP4F2–20-HETE metabolic axis, analyzing its regulation in response to RAS inhibitors, anticoagulants, and antiplatelet agents. The effects of pharmacological agents (captopril, losartan, MLN-4760) on gene and protein expression, signaling pathways, and functional cellular responses were assessed in endothelial, renal, and hepatic cell models. Additionally, low-frequency and low-intensity ultrasound was applied *in vitro* to evaluate its potential to modulate drug activity and enhance cellular signaling responses. Biomarkers associated with the RAS and CYP4F2–20-HETE pathways were identified in cell culture models and subsequently analyzed in plasma samples from patients with IHD treated with RAS inhibitors. The relationships between these biomarkers and clinical as well as laboratory parameters were evaluated across different clinical presentations of IHD. This combined analysis of cellular and clinical data provides a comprehensive framework for understanding the role of the RAS and CYP4F2–20-HETE pathway in IHD pathogenesis and their potential as therapeutic targets.

Hypotheses:

1. The effects of RAS inhibitors on the function of endothelial, renal, and hepatic cells may be related not only to classical RAS suppression but also to modulation of the CYP4F2–20-HETE–GPR75 signaling pathway, leading to changes in inflammation, oxidative stress, and metabolic processes.
2. LFUS, applied in combination with ACEIs or ARBs, may enhance the biological effects of these drugs in cell cultures by affecting functional cellular response parameters, signaling pathway activity, and gene expression.
3. Alterations in the balance of the RAS–ACE2 and CYP4F2–20-HETE–GPR75 signaling axes may be associated with the heterogeneity of the clinical course of IHD and may contribute to disease progression toward acute forms.

Aim

To investigate the effects of renin–angiotensin system inhibitors, low-frequency ultrasound, and modulation of the CYP4F2–20-hydroxyeicosate-traenoic acid (20-HETE)–GPR75 axis on the function of endothelial, renal, and hepatic cells, and to evaluate the clinical relevance of biomarkers associated with the RAS–ACE2 pathway and eicosanoid metabolism in patients with ischemic heart disease and in healthy individuals.

Objectives:

1. To evaluate the effects of anticoagulants and antiplatelet agents on CYP4F2 gene and protein expression in endothelial cell cultures.
2. To evaluate the effects of ACEIs, ARBs, and the ACE2 inhibitor MLN-4760 on functional parameters of endothelial, renal, and hepatic cells, the expression of genes related to the RAS, eicosanoid metabolism, and inflammation, as well as 20-HETE activity.
3. To evaluate the effects of low-frequency ultrasound, applied in combination with ACEIs and ARBs, on functional parameters of endothelial and renal cells, as well as on the expression of genes associated with the RAS, eicosanoid metabolism, and inflammation.
4. To assess the effects of 20-HETE and 19(R)-HETE on the metabolic activity of endothelial, renal, and hepatic cells and on the expression of the GPR75 receptor.
5. To determine plasma concentrations of ACE2 and 20-HETE in patients with IHD treated with RAS inhibitors, to evaluate the influence of *CYP4F2* genetic variants on 20-HETE levels, and to analyze the associations of these biomarkers with platelet function, clinical forms of IHD, and the characteristics of coronary artery lesions.

Novelty of the study

To date, investigations into the pathogenesis of IHD and variability in therapeutic response have predominantly focused on classical hemodynamic and thrombogenic mechanisms. However, the interaction between interconnected regulatory systems – namely the RAS and the CYP4F2–20-HETE–GPR75 signaling pathway – in the development of ED and IHD remains insufficiently explored.

This study is the first to comprehensively evaluate the effects of therapeutic RAS modulation and hemostasis-modulating agents on the CYP4F2–20-HETE–GPR75 axis, inflammatory markers, and functional cellular response parameters not only in endothelial cells but also in renal and hepatic

cell models. It was found that rivaroxaban, a direct activated coagulation factor X inhibitor, and antiplatelet ticagrelor significantly suppress CYP4F2 expression in endothelial cells, allowing CYP4F2 to be considered a molecular marker associated with inflammation and eicosanoid metabolism.

Within a single experimental framework, the effects of an ACEI (captopril), an ARB (losartan), and a selective ACE2 inhibitor (MLN-4760) on components of the RAS and the CYP4F2–20-HETE–GPR75 axis were compared across different cell types. It was determined that in endothelial cells captopril reduces 20-HETE activity, losartan suppresses *CYP4F2* expression, and MLN-4760 increases both 20-HETE activity and *GPR75* expression, confirming the importance of the alternative RAS axis in cellular homeostasis. A similar pattern of effects was observed in renal cell cultures, where losartan suppressed *CYP4F2* expression and MLN-4760 increased *GPR75* expression.

Furthermore, this study presents novel data on the synergistic interaction between LFUS and RAS inhibitors in endothelial and renal cell culture models. It was found that LFUS is capable of enhancing the biological effects of RAS inhibitors by modulating *CYP4F2* expression and functional cellular response parameters. The obtained results for the first time confirmed the synergistic potential of pharmacological and physical regulation of RAS.

The alterations in the RAS–ACE2 and CYP4F2–20-HETE axes identified in *in vitro* models were evaluated in a group of patients with IHD treated with RAS inhibitors, taking into account clinical forms of IHD and applied pharmacotherapy. It was revealed that ACE2 and 20-HETE concentrations are associated with clinical forms of IHD, and that 20-HETE demonstrates greater diagnostic value in differentiating between stable and acute conditions. These findings expand the understanding of the interaction between RAS and eicosanoid metabolism and their role in the pathogenesis of IHD, highlighting the RAS–ACE2 and CYP4F2–20-HETE pathways as molecular biomarkers and possible targets for personalized IHD management.

2. MATERIALS AND METHODS

Study design

The study was conducted in two sequential stages (Fig. 2.1). During the first stage, *in vitro* experiments were performed using non-pathological endothelial and renal cell cultures, as well as hepatic carcinoma cell lines. Based on the results of cellular function assays and gene expression analyses, relevant biomarkers and their corresponding values were determined. In the second stage, the selected biomarkers were investigated in a clinical cohort

comprising patients with IHD receiving RAS inhibitors and a comparison group without IHD.

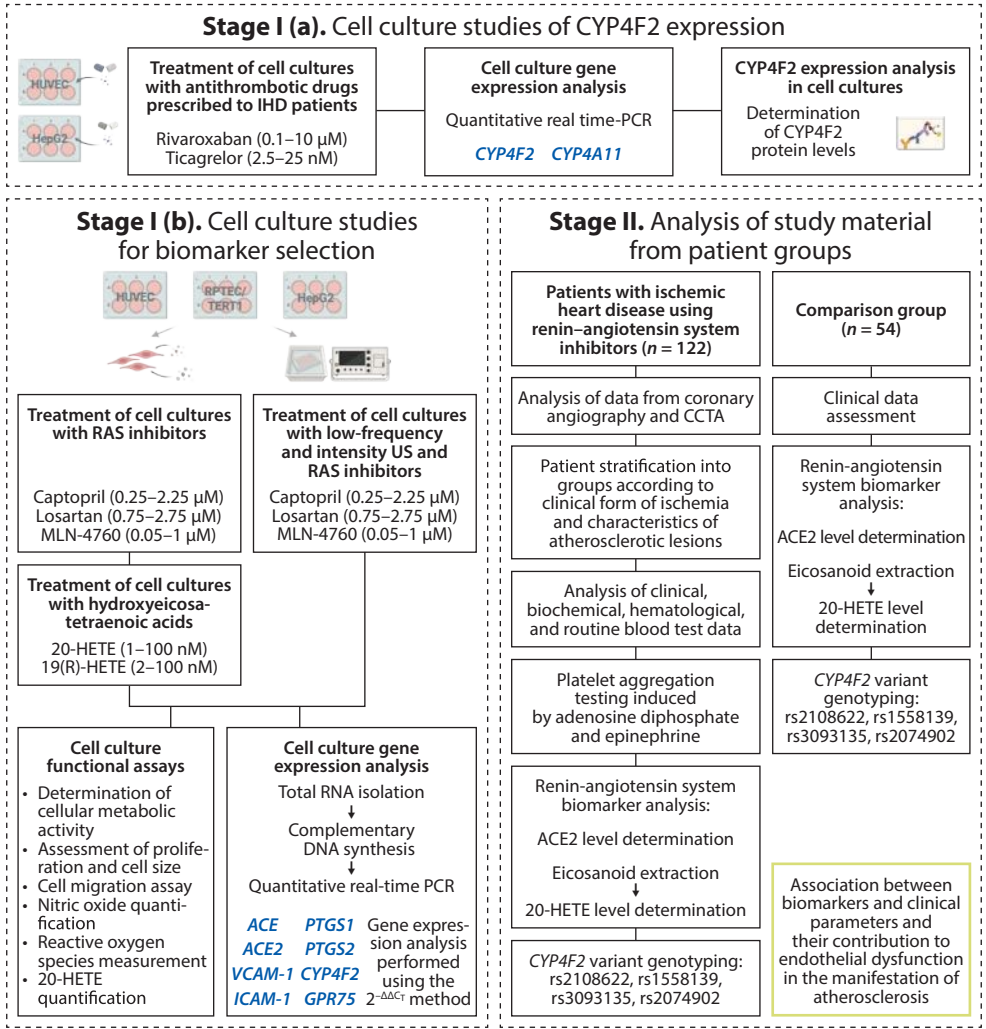


Fig. 2.1. Study framework

Cell culture-based experimental methods. Cell lines

The study utilized the human umbilical vein endothelial cell line HUVEC (Gibco, Life Technologies, USA), the human renal proximal tubular epithelial cell line RPTEC/TERT1 (Evercyte, Austria), and the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 (ATCC, USA). HUVECs were cultured in Human Large Vessel Endothelial Cell Basal Medium supplemented with Large Vessel Endothelial Supplement and 1% antibiotic solution (penicillin 10 000 IU/mL

and streptomycin 10 mg/mL). RPTEC/TERT1 cells were maintained in DMEM/F-12 (1:1) medium supplemented with 4% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-alanyl-L-glutamine (GlutaMAX), $1\times$ insulin–transferrin–selenium (ITS-G), 10 ng/mL human epidermal growth factor, 25 ng/mL hydrocortisone, and 100 μ g/mL G418 sulfate (geneticin). HepG2 cells were cultured in DMEM supplemented with 2 mM L-alanyl-L-glutamine, 10% FBS, and 1% antibiotic solution. All cells were maintained in a humidified incubator at 37 °C with 5% CO₂ and 95% relative humidity.

Cell culture maintenance

HUVEC, RPTEC/TERT1, and HepG2 cells were subcultured upon reaching approximately 70–80% confluence in T-75 culture flasks. Cells were seeded into 6-, 12-, 24-, or 96-well plates depending on the experimental design and maintained under standard conditions in a Heracell VIOS 160i incubator. Cell concentration and viability were assessed with an automated Countess II FL cell counter before seeding. Cell morphology and confluence were monitored using the EVOS XL Core imaging system. All experiments with HUVECs were performed using passages 3–6. RPTEC/TERT1 cells were used from passage 52 onward, and HepG2 cells from passage 33 onward.

Exposure of cell cultures to cardiovascular pharmacological agents

At the beginning of stage I, the effects of anticoagulant rivaroxaban and antiplatelet agent ticagrelor were evaluated in endothelial and hepatic cell models. These experiments enabled assessment of pleiotropic effects related to RAS axis components and optimization of experimental conditions for subsequent analyses.

Rivaroxaban solution was prepared by dissolving one 20 mg Xarelto tablet (Bayer, Germany) in 0.9% sodium chloride solution supplemented with bovine serum albumin (BSA) at 37 °C, taking into account the 92–95% protein binding of rivaroxaban. HUVECs were exposed to rivaroxaban at concentrations ranging from 0.1 to 10 μ M for 24 h.

The ticagrelor stock solution was prepared by dissolving a 90 mg tablet (AstraZeneca, UK) in double-distilled water. Quantitative analysis of dissolved ticagrelor was performed using ultra-performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS). Working solutions (0.5–5 μ M) were prepared by dilution in 0.9% sodium chloride. HUVEC and HepG2 cells were incubated for 24 h with ticagrelor to achieve final concentrations of 2.5–25 nM in culture medium.

Captopril was dissolved in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), whereas losartan potassium and MLN-4760 were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). Final working concentrations were prepared by dilution in complete culture medium. HUVEC, RPTEC/TERT1, and HepG2 cells were exposed to captopril (0.25–2.25 μM), losartan (0.75–2.75 μM), or MLN-4760 (0.05–1 μM) for 24 h. Concentration ranges for captopril and losartan were selected based on therapeutic plasma levels observed in clinical practice to ensure translational relevance [216–219]. MLN-4760 concentrations were chosen according to previous *in vitro* studies to enable detailed evaluation of ACE2 inhibition and associated signaling pathways in endothelial, renal, and hepatic cells [220].

Synergistic exposure of cell cultures to RAS inhibitors and low-frequency ultrasound

Following treatment of HUVECs and RPTEC/TERT1 cells with the RAS inhibitors captopril and losartan, culture plates were immediately placed in a custom-designed low-frequency ultrasound (LFUS) bath filled with distilled water. Ultrasound at a frequency of 69 kHz and low intensity (5–10 mW/cm^2) was applied for 5 min to avoid structural cellular damage. After sonication, cells were incubated for an additional 24 h under standard culture conditions.

The ultrasound device consisted of a specially constructed bath equipped with two disc-shaped bimorph piezoelectric transducers mounted at the base to ensure optimal energy transmission to the culture plates. This configuration was selected to achieve higher vibration amplitudes and a more uniform acoustic field. The transducers were operated at their resonant frequency (69 kHz), determined using a 3D laser scanning vibrometer and impedance analyzer, ensuring maximal oscillation amplitude during stimulation.

Device specifications included a nominal frequency of approximately 69 kHz, adjustable power output up to 40 W, and controlled exposure time.

Assessment of cellular metabolic activity

Cellular metabolic activity was determined using the colorimetric 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) reduction assay. In metabolically active cells, mitochondrial NAD(P)H-dependent oxidoreductases reduce the yellow water-soluble MTT salt to insoluble purple formazan crystals, the quantity of which correlates with viable cell number and metabolic activity.

HUVEC and RPTEC/TERT1 cells (2×10^4 cells/well) were seeded into 96-well plates. After 24 h, cells were treated with RAS inhibitors alone or in combination with LFUS. Following an additional 24 h incubation, MTT solu-

tion (5 mg/mL) was added to serum-free medium and incubated for 3.5 h. Absorbance was measured at 550 nm with a 620 nm reference using an Infinite M Plex microplate reader. Untreated cells served as controls (100% viability). Wells without cells were used for background correction.

Assessment of cell proliferation and cell size

Proliferation of HUVECs was assessed using a Countess II FL automated cell counter. Cell number and viability were determined by the trypan blue exclusion assay, based on the principle that viable cells possess intact plasma membranes that prevent dye uptake, whereas non-viable cells are stained. Before RNA isolation for gene expression analysis, HUVECs were detached and counted. The cell suspension was mixed 1:1 (v/v) with 0.4% trypan blue solution and loaded into a Countess counting chamber. Live and dead cells were distinguished according to staining characteristics. The system additionally provided measurements of viable and non-viable cell diameters, expressed in micrometers (μm).

Cell migration assay using the wound healing model

Cell migration was assessed using the wound healing assay. HUVEC and RPTEC/TERT1 cells were seeded at densities of 4×10^4 cells/cm² and 6×10^4 cells/cm², respectively. After 24 h, once a confluent monolayer had formed, a standardized ~ 0.5 mm scratch was created to simulate a wound. Cells were gently washed with PBS and incubated in serum-free medium supplemented with RAS inhibitors. Cell cultures were additionally exposed to LFUS as previously described. Migration into the wounded area was monitored by phase-contrast microscopy. Images were acquired at 0 and 4 h using the EVOS XL Core imaging system. Wound area reduction was quantified using ImageJ software (v1.54d). Percentage wound closure was calculated relative to the initial wound area.

Determination of nitric oxide levels

Total nitric oxide (NO) levels in culture supernatants of HUVECs treated with RAS inhibitors in combination with LFUS were determined using a commercial Nitric Oxide Assay Kit (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's protocol. The method quantifies nitrite (NO_2^-) and nitrate (NO_3^-), the principal stable metabolites of NO. Nitrate was enzymatically reduced to nitrite by nitrate reductase, followed by quantification of nitrite using the Griess reaction, which produces a chromophoric azo compound. Positive (acetylcholine, 10 μM) control was included. Absorbance was measured at 540 nm using a microplate reader. Nitrite and nitrate concentrations were

calculated from standard calibration curves, and total NO levels were expressed as the sum of both metabolites.

Determination of reactive oxygen species levels

Reactive oxygen species (ROS) generation in RPTEC/TERT1 cells treated with RAS inhibitors in combination with LFUS was assessed using a ROS/Superoxide Detection Assay Kit (Abcam, UK) according to the manufacturer's instructions. Cells (2×10^4 /well) were seeded in black 96-well plates and, after 24 h, exposed to captopril, losartan, or MLN-4760 together with LFUS. Following 1 h of treatment, an oxidative stress detection reagent was added. After an additional 1 h incubation, fluorescence intensity was measured in endpoint mode using a microplate reader (excitation 488 nm, emission 520 nm). Positive (pyocyanin, 25 μ M) and negative (N-acetyl-L-cysteine, 5 mM) controls were included, along with solvent, autofluorescence, and background controls. Relative fluorescence intensity was normalized to corresponding control samples for each experimental condition.

Gene expression analysis: RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was isolated from HUVEC, RPTEC/TERT1, and HepG2 cells using the PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen, USA) in combination with TRIzol reagent, according to the manufacturer's instructions. The method was based on organic extraction followed by RNA binding to a silica membrane. RNA concentration and purity were assessed using a NanoDrop 2000 spectrophotometer. Genomic DNA was removed by DNase I treatment. For relative gene expression analysis, 0.5 μ g of RNA was reverse transcribed using random hexamer primers and the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase inhibitor (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lithuania). The reaction was performed under the following conditions: 25 °C for 10 min, 37 °C for 120 min, and 85 °C for 5 min.

Gene expression analysis: quantitative real-time PCR

Quantitative real-time PCR (qPCR) was performed in accordance with MIQE guidelines using a QuantStudio 5 system and SYBR Green chemistry. Reactions were carried out in 10 μ L volumes containing 2 $\times$ SYBR Green Master Mix, 250 nM of forward and reverse primers, and 10 ng of cDNA. Thermal cycling conditions were: 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, 60.6 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min. Melt curve analysis was performed at the end of amplification. qPCR reactions were performed using gene-specific primers designed to amplify target genes: *ACE*, *ACE2*, *VCAM-1*, *ICAM-1*, *PTGS1*, *PTGS2*, *CYP4F2*, *CYP4A11*, *GPR75*, and *TFRC*.

Primer specificity and efficiency were validated both *in silico* and experimentally. Relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Expression levels were normalized to the reference gene *TFRC* (transferrin receptor), which demonstrated stable expression and amplification efficiency close to 100%. Results were expressed as ΔC_T values ($\Delta C_T = C_{T \text{ target gene}} - C_{T \text{ reference gene}}$) and fold change (FC), calculated using the formula $FC = 2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Determination of CYP4F2 protein levels

CYP4F2 protein concentrations in lysates of HUVECs treated with rivaroxaban and ticagrelor were determined using a commercial sandwich ELISA kit (SEL399Hu) according to the manufacturer's instructions. Following cell detachment, lysates were prepared by resuspending cells in cold PBS and centrifuging at $1500 \times g$ for 5 min. The cell pellet was then resuspended in 300 μ L lysis buffer, incubated on ice for 10 min, and centrifuged at $10\,000 \times g$ for 10 min at 4 °C. Supernatants were collected and stored at -80 °C until analysis. CYP4F2 concentrations were quantified by measuring absorbance at 450 nm using a microplate reader and calculated based on the standard calibration curve.

Eicosanoid extraction and determination of 20-HETE

20-HETE was extracted from conditioned media of HUVECs following 24 h treatment with RAS inhibitors using a liquid-liquid extraction method. Culture media were centrifuged at $2500 \times g$ to remove cells and debris. The supernatant containing secreted metabolites was collected for further analysis.

Samples were stabilized with butylated hydroxytoluene (10 mg/mL) to prevent lipid oxidation and acidified to pH 4 using acetic acid ($\geq 99.5\%$). Eicosanoids were extracted with ethyl acetate (1:1, v/v), followed by mixing and centrifugation. The organic phase was collected and evaporated under nitrogen at 40 °C. The dried residue was reconstituted in ethanol and diluted with assay buffer to appropriate concentrations.

20-HETE concentrations were determined using a competitive *in vitro* ELISA kit (Detroit R&D, USA) according to the manufacturer's protocol. The assay is based on competition between endogenous 20-HETE and an enzyme-conjugated analog for binding to a specific antibody. Absorbance was measured at 450 nm using a microplate reader and was inversely proportional to 20-HETE concentration. Quantification was performed using a standard calibration curve.

Evaluation of GPR75 by indirect immunofluorescence

GPR75 protein localization and expression were assessed using an indirect immunofluorescence method. Cells were cultured on 13 mm glass coverslips placed in culture plate wells. Before staining, cells were washed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde at room temperature. After washing, cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS and subsequently blocked with 1% BSA to prevent non-specific binding.

Cells were incubated overnight at 4 °C with a primary anti-GPR75 antibody (10 µg/mL), then washed and incubated at room temperature with fluorescently labeled secondary anti-IgG antibodies (2 µg/mL). Nuclei were counterstained with DAPI (1 µg/mL). Coverslips were mounted using ProLong™ Glass Antifade Mountant, and prepared slides were analyzed with EVOS M7000 fluorescence microscope.

Methods involving human biological samples. Study population

The study included 122 patients diagnosed with IHD who were hospitalized at the Department of Cardiology, Hospital of the Lithuanian University of Health Sciences (LSMU) Kauno klinikos between 2021 and 2024. The study involving human biological material was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. Ethical approval for the amendment of the biomedical research protocol was obtained from the Kaunas Regional Biomedical Research Ethics Committee (Approval No. P1-BE-2-19/2019) (Appendix 1).

Patients were divided into two groups according to the European Society of Cardiology (ESC) guidelines applied in Lithuania. The groups were formed based on the clinical presentation of the disease (stable IHD and ACS). Coronary artery lesions were assessed using coronary angiography and coronary computed tomography angiography (CCTA).

Group I (stable angina pectoris (SAP); $n = 30$, 17.0%). This group included patients with exertional angina symptoms that remained stable for ≥ 6 weeks, without clinical, electrocardiographic, or biochemical evidence of ACS. Diagnosis was established based on cardiological evaluation and coronary angiography findings demonstrating coronary artery involvement. This group also included patients with chronic total occlusion (CTO) and high-risk atherosclerotic plaque (HRP). CTO was defined according to international criteria as complete (100%) coronary artery occlusion of > 3 months' duration with absence of antegrade distal blood flow (thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) grade 0). Patients were included whether CTO was isolated or accompanied by additional epicardial stenoses, provided that the clinical presentation was consistent with SAP. HRP was identified using

CCTA according to established criteria. A plaque was classified as high-risk if at least one of the following features was present: (1) low-attenuation plaque (< 50 Hounsfield units (HU)), indicating a lipid-rich necrotic core; (2) positive remodeling with a remodeling index > 1.1 ; (3) spotty calcification; or (4) the napkin-ring sign, defined as a low-attenuation central plaque component surrounded by a higher-attenuation rim.

Group II (acute coronary syndrome (ACS); $n = 92$, 52.3%). This group included patients hospitalized with ACS, defined as ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI), non-ST-segment elevation myocardial infarction (NSTEMI), or unstable angina, in accordance with ESC guidelines. All patients underwent percutaneous coronary intervention (PCI) with coronary stent implantation. Standard guideline-directed pharmacological therapy was administered, including dual antiplatelet therapy (ticagrelor or clopidogrel combined with aspirin), statins (atorvastatin, rosuvastatin, or simvastatin), ACEIs or ARBs, and β -blockers.

Exclusion criteria. Patients were excluded if they had conditions known to significantly affect coagulation or inflammatory status, including active malignancy, systemic inflammatory conditions (C-reactive protein > 100 mg/L), recent antibiotic therapy for infection, renal insufficiency, hypothyroidism, hypovolemia, or if they declined participation in the study.

Data collection and sample handling. Clinical, laboratory, and instrumental data were obtained from medical records. Venous blood samples for biochemical and platelet function analyses were collected according to a standardized protocol. In patients with ACS, blood samples were collected approximately 24 h after administration of the initial antiplatelet loading dose. In patients with SAP, blood samples were collected during scheduled clinical evaluation.

Comparison group

The comparison group was selected from the Kaunas cohort of the international Health, Alcohol and Psychosocial Factors in Eastern Europe (HAPIEE) study. Clinical and demographic information was obtained from the baseline Kaunas HAPIEE database collected in 2006–2008. Initially, 69 participants with no history of IHD, diabetes mellitus, or metabolic disorders were selected.

During the follow-up period from 2008 to 2024, 15 individuals from the initial comparison group died and were therefore not included in the subsequent analysis. The recorded causes of death were as follows: one due to COVID-19 complications, three due to cerebrovascular ischemia, one due to complications of hypertension, one due to chronic obstructive pulmonary

disease (COPD), one due to pulmonary heart disease, one due to cholelithiasis, two due to different malignancies, one due to sepsis, and one due to vascular dementia.

After excluding individuals who died during follow-up, **54 individuals (30.7%** of the total study population) with available clinical data and stored plasma samples for biomarker analysis were included in the final comparison group. These participants had no history of ischemic events either at baseline or in 2024. Age was defined as the age at the time of inclusion in the HAPIEE study. Plasma samples were stored at -80°C until biomarker analysis.

Genomic DNA isolation and genotyping by real-time PCR

Venous blood samples were collected in K_2EDTA vacuum tubes. Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes using either a salting-out method or a commercial Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) according to the manufacturer's instructions.

Genotyping of *CYP4F2* variants (rs2108622, rs1558139, rs3093135, and rs2074902) was performed by real-time PCR using TaqMan™ SNP Genotyping Assays. Each assay included two allele-specific fluorescently labeled TaqMan® probes and primers targeting the respective polymorphic region. PCR reactions were prepared according to the manufacturer's recommendations using TaqMan® Universal Master Mix II, the corresponding SNP Genotyping Assay, nuclease-free water, and genomic DNA (10 ng per reaction).

Reactions were carried out in 96-well plates. To ensure genotyping accuracy and reliability, each run included known genotype controls and a no-template control (NTC). Thermal cycling conditions were as follows: 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 90 s. Amplification and allelic discrimination were performed using a QuantStudio™ 5 real-time PCR system.

Platelet aggregation assay

Platelet aggregation was evaluated using the classical Born light transmission aggregometry method with a Platelet Aggregometer TA-8V. Venous blood was collected into tubes containing 3.2% sodium citrate and analyzed within 1 h of collection.

Samples were centrifuged to obtain platelet-rich plasma (PRP) and platelet-poor plasma (PPP). PRP was used for aggregation testing, while PPP served as a reference for calibration of baseline light transmission and normalization of results.

Platelet aggregation was induced using adenosine diphosphate (ADP) and epinephrine (ADR). Changes in light transmission were recorded for 10 min. As platelets aggregated, the suspension became clearer, increasing light transmission proportional to the extent of platelet aggregation.

Extraction of eicosanoids from plasma samples

20-HETE was extracted and purified from plasma samples of 176 participants using a liquid-liquid extraction method. Samples were stabilized with butylated hydroxytoluene (10 mg/mL) and acidified to pH 4 with acetic acid ($\geq 99.5\%$). Eicosanoids were extracted with ethyl acetate (1:1, v/v), followed by vigorous mixing for 2 min and centrifugation at $2500 \times g$ for 20 min at room temperature.

After phase separation, the upper organic layer was collected and evaporated to dryness under nitrogen at 40°C using a Multivap evaporator. Dried extracts were reconstituted in 96% ethanol and diluted with $1\times$ sample dilution buffer before ELISA analysis.

Determination of 20-HETE

Quantitative determination of 20-HETE in plasma-derived eicosanoid extracts was performed using a competitive *in vitro* 20-HETE ELISA kit (Detroit R&D, USA) according to the manufacturer's protocol. The kit specifications indicate no significant cross-reactivity with structurally related fatty acids, including arachidonic, linoleic, and linolenic acids.

Optical density was measured at 450 nm using a microplate reader, and concentrations were calculated based on the standard calibration curve.

Determination of ACE2

Plasma ACE2 concentrations were measured in 176 participants using a sandwich-type ACE2 ELISA kit (Biovendor, Czech Republic). Microplate wells were pre-coated with a polyclonal antibody specific for human ACE2. Standards and plasma samples were added to the wells. Following washing, ACE2 was detected using a biotin-conjugated monoclonal anti-ACE2 antibody. After removal of unbound antibody, a streptavidin–horseradish peroxidase conjugate was applied. Color development was achieved using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) substrate. Absorbance was measured at 450 nm with a microplate reader. Signal intensity was directly proportional to ACE2 concentration in the samples.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism v.8 and IBM SPSS Statistics v.27.0. Graphical data presentation was prepared using GraphPad Prism v.8 and Microsoft Office LTSC Professional Plus 2024.

For *in vitro* experiments, at least four independent experiments were conducted per condition. Normality was assessed using the Shapiro–Wilk test. As the data were not normally distributed, differences between two independent groups were analyzed using the Mann–Whitney U test. Results are presented as median (min–max). Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

In the clinical study, differences in categorical variables across groups were assessed using the Fisher–Freeman–Halton test, whereas continuous variables were compared using the Kruskal–Wallis test. Between-group differences were further explored by pairwise post hoc analysis using the Mann–Whitney U test with Bonferroni correction. Genotype distributions were tested for deviation from Hardy–Weinberg equilibrium using the χ^2 test. Associations between biomarkers and clinical parameters were assessed using Spearman’s rank correlation. Univariate logistic regression analysis was performed to evaluate associations between demographic, clinical, and biochemical variables and the likelihood of ACS, with results expressed as odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs). Multivariable models included variables selected from univariate analysis, with multicollinearity assessed using tolerance and variance inflation factor (VIF). Model fit was evaluated using the Hosmer–Lemeshow test and Nagelkerke R^2 . Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was performed to assess the diagnostic and prognostic performance of biomarkers. The area under the curve (AUC) with 95% CI was calculated, and the optimal cut-off value was identified using the Youden index ($J = \text{sensitivity} + \text{specificity} - 1$).

Software

The following software packages were used in the study: ImageJ v1.54d (National Institutes of Health, USA); Tecan i-control v2.0 (Tecan Group Ltd., Switzerland); Primer-BLAST (National Center for Biotechnology Information, USA); UCSC In-Silico PCR v39x1 (University of California, USA); OligoAnalyzer v3.1 (Integrated DNA Technologies, USA); ND-1000 v3.7.1 (Thermo Fisher Scientific, USA); ThromboSoft v1.6.1.3 (SD Innovation, France); GraphPad Prism v8 (GraphPad Software, Inc., USA); Microsoft Office LTSC Professional Plus 2024 (Microsoft Corporation, USA); and IBM SPSS Statistics v27.0 (IBM Corporation, USA).

3. RESULTS

In vitro results from cell culture experiments. Evaluation of changes in CYP4F2 expression in endothelial and hepatic cells

Effect of rivaroxaban

To evaluate the effects of rivaroxaban on HUVECs and its potential associations with vascular inflammatory processes, cells were exposed to rivaroxaban at concentrations ranging from 0.1 to 10 μM . Changes in *CYP4F2* mRNA expression, expressed as ΔC_T values and relative fold changes (FC), are presented in Table 3.1. After 24 h of incubation, a concentration-dependent decrease in *CYP4F2* expression was observed [226]. However, treatment with different concentrations of rivaroxaban did not affect *CYP4F2* protein levels in HUVECs (Appendix 2).

Table 3.1. Relative changes in *CYP4F2* expression in HUVECs exposed to 0.1–10 μM rivaroxaban

Cell samples	<i>CYP4F2</i> ΔC_T values		Reduced <i>CYP4F2</i> expression (FC $\pm$ SD)	<i>p</i> *
	median	min–max		
Control – 0 μM rivaroxaban	14.6	14.3–15.6	–	–
0.1 μM rivaroxaban	15.4	15.0–15.7	1.44-fold (0.69 $\pm$ 0.14)	0.046
0.2 μM rivaroxaban	15.4	15.3–15.8	1.71-fold (0.58 $\pm$ 0.10)	0.026
0.5 μM rivaroxaban	15.4	15.3–16.3	1.89-fold (0.53 $\pm$ 0.17)	0.028
1 μM rivaroxaban	15.6	15.2–16.8	1.93-fold (0.52 $\pm$ 0.17)	0.013
2 μM rivaroxaban	15.8	15.2–16.8	2.05-fold (0.49 $\pm$ 0.15)	0.004
5 μM rivaroxaban	15.9	15.2–16.9	2.4-fold (0.42 $\pm$ 0.21)	0.009
10 μM rivaroxaban	16.1	15.3–17.2	2.72-fold (0.37 $\pm$ 0.21)	0.009

**p* value compared with the control group (cells incubated with medium without rivaroxaban), based on $n = 6$ independent experiments. FC – fold change; SD – standard deviation.

Effect of ticagrelor

To evaluate the effect of ticagrelor on *CYP4F2* and *CYP4A11* transcription, HUVECs were exposed to ticagrelor at concentrations of 2.5–25 nM. After 24 h of incubation, ticagrelor reduced *CYP4F2* expression in a concentration-dependent manner (Table 3.2) [227]. A significant decrease in *CYP4F2* expression was observed at concentrations of 5–25 nM, with the greatest effect at 25 nM, resulting in a 2.38-fold reduction ($p = 0.009$). *CYP4A11* expression was not detected in HUVECs.

Table 3.2. Relative changes in *CYP4F2* expression in HUVECs exposed to 2.5–25 nM ticagrelor

Cell samples	<i>CYP4F2</i> ΔC_T values		Reduced <i>CYP4F2</i> expression (FC $\pm$ SD)	<i>p</i> *
	median	min–max		
Control – 0 nM ticagrelor	15.7	14.2–15.9	–	–
2.5 nM ticagrelor	16.2	15.5–16.9	1.54-fold (0.65 $\pm$ 0.28)	0.240
5 nM ticagrelor	16.3	15.6–16.8	1.61-fold (0.62 $\pm$ 0.20)	0.041
10 nM ticagrelor	16.5	15.7–16.9	1.72-fold (0.58 $\pm$ 0.12)	0.026
15 nM ticagrelor	16.3	15.8–17.5	1.72-fold (0.58 $\pm$ 0.25)	0.032
25 nM ticagrelor	17.0	15.8–18.0	2.38-fold (0.42 $\pm$ 0.21)	0.009

**p* value compared with the control group (cells incubated with medium without ticagrelor), based on *n* = 6 independent experiments. FC – fold change; SD – standard deviation.

CYP4F2 protein levels in HUVECs were also reduced following ticagrelor treatment. Quantification by ELISA (Table 3.3) showed that at the lowest tested concentration (2.5 nM), *CYP4F2* protein levels decreased to 20.6 (6.7–23.3) ng/mL (*p* = 0.039), and further declined to 18.0–16.5 ng/mL at concentrations of 5–25 nM, compared with untreated control cells (41.9 (9.4–42.9) ng/mL).

Table 3.3. *CYP4F2* protein concentration in HUVECs exposed to 2.5–25 nM ticagrelor

Cell samples	<i>CYP4F2</i> concentration (ng/mL)		<i>p</i> *
	median	min–max	
Control – 0 nM ticagrelor	41.9	9.4–42.9	–
2.5 nM ticagrelor	20.6	6.7–23.3	0.039
5 nM ticagrelor	18.0	6.2–22.7	0.045
10 nM ticagrelor	19.5	7.0–25.4	0.041
15 nM ticagrelor	18.2	5.2–25.4	0.043
25 nM ticagrelor	16.5	5.5–20.9	0.036

**p* value compared with the control group (cells incubated with medium without ticagrelor), based on *n* = 6 independent experiments.

To evaluate the effect of ticagrelor in hepatic cells, the expression of *CYP4F2* and *CYP4A11* genes was assessed in HepG2 cells. The results showed that treatment with ticagrelor at concentrations of 5–25 nM reduced the expression of both *CYP4F2* and *CYP4A11* compared with control cells; however, these changes were not significant (*p* > 0.4).

Effects of RAS inhibitors on endothelial cell function

Effects on cell viability

The effects of RAS-modulating compounds (captopril, losartan, and MLN-4760) on metabolic viability of HUVECs were evaluated using the MTT assay after 24 h incubation. Captopril significantly increased cell viability at all tested concentrations, with the greatest effect observed at 1.25 μM , where viability increased by 38% ($p = 0.029$) compared with control cells (HUVECs treated with 0 μM captopril). Losartan increased metabolic viability of HUVECs in a concentration-dependent manner, with cell viability rising by 31–66% at concentrations of 0.75–2.75 μM relative to the control. Exposure to MLN-4760 also increased cell viability, with the most pronounced effect observed at 0.25 μM , resulting in a 24% increase ($p = 0.029$) compared with control cells.

Effects on cell proliferation and cell size

Cell proliferation was assessed by counting viable HUVECs after 24 h incubation with the tested compounds. A significant increase in the number of viable cells was observed only following treatment with MLN-4760 at concentrations of 0.05, 0.1, and 0.25 μM , whereas no effect was detected at higher concentrations (0.5 and 1 μM). Evaluation of cell diameter revealed a reduction in HUVECs' size at 0.1 and 0.25 μM MLN-4760.

Effects on cell migration

Migration of HUVECs was assessed using the wound healing assay by measuring the reduction in wound area after 4 h of incubation with captopril, losartan, or MLN-4760. Captopril promoted cell migration by reducing the wound area at concentrations of 1.25–2.25 μM compared with control cells. In contrast, losartan tended to reduce wound area, although no significant differences were observed. MLN-4760 (0.05–1 μM) did not affect the wound closure.

Effects on nitric oxide production

NO production was evaluated by measuring total nitrite and nitrate concentrations in the culture medium after 24 h incubation of HUVECs with RAS-modulating compounds. Both captopril and losartan increased NO production in HUVECs. Captopril induced a significant increase in NO levels at all tested concentrations (0.25–2.25 μM). At 2.25 μM , NO concentration increased to 24.53 (23.32–28.32) μM compared with control cells (8.65 (6.98–11.25) μM ; $p = 0.029$). Losartan induced NO production only at concentrations of 2.25 and 2.75 μM . At 2.75 μM , NO levels increased to 18.31 (14.5–23.73) μM , compared with 7.9 (5.23–12.36) μM in control cells

($p = 0.029$). In contrast, MLN-4760 reduced NO production in a concentration-dependent manner. The most pronounced decrease was observed at 1 μM , where NO concentration decreased to 6.27 (5.31–8.63) μM , compared with 11.32 (9.59–13.57) μM in control cells ($p = 0.029$).

Effects of RAS inhibitors on proximal renal tubular epithelial cell function

Effects on cell viability

The effects of captopril, losartan, and MLN-4760 on RPTEC/TERT1 cell metabolic viability were evaluated using the MTT assay after 24 h incubation. Captopril at concentrations of 0.25–2.25 μM had no significant effect on RPTEC/TERT1 cell viability. In contrast, losartan increased cell viability at all tested concentrations (0.75–2.75 μM). The strongest effect was observed at 2.75 μM , where viability increased by 16% compared with control cells ($p = 0.029$). MLN-4760 exhibited a biphasic effect. At 0.05–0.5 μM , the compound increased RPTEC/TERT1 cell viability by approximately 7–9% ($p = 0.029$). However, the highest tested concentration (1 μM) reduced cell viability to 94.4%.

Effects on cell migration

Cell migration was evaluated using the wound healing assay by measuring the reduction in wound area after 4 h of incubation with captopril, losartan, and MLN-4760. Neither captopril nor losartan produced a significant concentration-dependent effect on RPTEC/TERT1 cell migration or wound closure. Similarly, MLN-4760 had no significant effect on RPTEC/TERT1 cell migration.

Effects on reactive oxygen species formation

The oxidative status of RPTEC/TERT1 cells was evaluated by measuring reactive oxygen species (ROS) production after 1 h incubation with the tested compounds. Captopril significantly reduced ROS formation at all tested concentrations (0.25–2.25 μM), with the strongest effect observed at 2.25 μM , where ROS levels decreased 1.33-fold compared with control ($p = 0.029$). Losartan also reduced ROS production at concentrations of 1.75–2.75 μM , with a concentration-dependent reduction observed up to 2.75 μM . MLN-4760 reduced ROS formation at concentrations of 0.25–0.5 μM ($p = 0.029$), whereas at 1 μM it exerted the opposite effect, increasing ROS levels by 8% compared with control cells ($p = 0.029$).

Effects of RAS inhibitors on the expression of genes related to RAS, inflammation, and eicosanoid metabolism in endothelial cells

Effect of captopril on gene expression

The effects on the mRNA expression levels of *ACE*, *ACE2*, *VCAM-1*, *ICAM-1*, *PTGS1*, *PTGS2*, *CYP4F2*, and *GPR75* were evaluated in HUVECs after 24 h exposure to therapeutic concentrations of captopril (0.25–2.25 μ M). Captopril induced a concentration-dependent decrease in *ACE*, *ACE2*, *VCAM-1*, and *ICAM-1* expression compared with control cells. The strongest suppression was observed at 2.25 μ M, where the relative expression of *ACE*, *ACE2*, *VCAM-1*, and *ICAM-1* decreased by 2.94-, 2.78-, 3.85-, and 4.55-fold, respectively ($p = 0.03$). In contrast, *CYP4F2* and *GPR75* expression increased at higher captopril concentrations (1.75 and 2.25 μ M), with a 1.28- and 1.34-fold increase, respectively, at 2.25 μ M ($p = 0.03$).

Effect of losartan on gene expression

After 24 h incubation with losartan (0.75–2.75 μ M), a significant concentration-dependent decrease in *ACE*, *PTGS2*, and *CYP4F2* expression was observed in HUVECs. The greatest reduction was detected at 2.75 μ M, where the relative expression of *ACE*, *PTGS2*, and *CYP4F2* decreased by 3.03-, 2.7-, and 4.76-fold, respectively ($p = 0.03$).

Effect of MLN-4760 on gene expression

After 24 h incubation with MLN-4760 (0.05–1 μ M), HUVECs exhibited decreased *ACE2* and *PTGS1* expression and increased *ICAM-1*, *PTGS2*, *CYP4F2*, and *GPR75* expression compared with control cells. *ACE2* expression decreased in a concentration-dependent manner, ranging from 1.22- to 2.78-fold ($p = 0.03$), while *PTGS1* expression showed the greatest reduction (1.59-fold) at 0.1 μ M. In contrast, *ICAM-1* and *PTGS2* expression increased with increasing MLN-4760 concentration, reaching 1.7- and 1.5-fold increases, respectively, at 1 μ M ($p = 0.03$). Higher concentrations (0.5–1 μ M) also enhanced *CYP4F2* and *GPR75* expression, with 2.0- and 1.64-fold increases, respectively, at 1 μ M ($p = 0.03$).

Effects of RAS inhibitors on the expression of genes related to RAS, inflammation, and eicosanoid metabolism in proximal renal tubular epithelial cells

Effect of captopril on gene expression

After incubation with captopril, *ACE*, *VCAM-1*, and *ICAM-1* expression in RPTEC/TERT1 cells decreased in a concentration-dependent manner compared with control cells. The reduction was significant at all tested

concentrations, with the strongest suppression observed at 2.25 μM , where *ACE*, *VCAM-1*, and *ICAM-1* expression decreased by 1.6-, 1.98-, and 2.1-fold, respectively ($p = 0.03$). In contrast, higher concentrations (1.75–2.25 μM) increased *CYP4F2* and *GPR75* expression, reaching 1.69- and 1.63-fold increases, respectively, at 2.25 μM ($p = 0.03$).

Effect of losartan on gene expression

After 24 h incubation with losartan (0.75–2.75 μM), a significant decrease in *ACE*, *VCAM-1*, *PTGS2*, and *CYP4F2* expression was observed in RPTEC/TERT1 cells compared with control cells. *ACE*, *VCAM-1*, and *CYP4F2* expression decreased in a concentration-dependent manner, with significant suppression at all tested concentrations. The greatest effect was observed at 2.75 μM , where *ACE*, *VCAM-1*, *PTGS2*, and *CYP4F2* expression decreased by 1.61-, 1.27-, 1.2-, and 2.67-fold, respectively ($p = 0.03$).

Effect of MLN-4760 on gene expression

After 24 h incubation with MLN-4760 (0.05–1 μM), RPTEC/TERT1 cells exhibited changes in *ACE2*, *ICAM-1*, *PTGS2*, and *GPR75* expression compared with control cells. *ACE2* expression decreased in a concentration-dependent manner, ranging from 2.4- to 4.44-fold ($p = 0.03$). In contrast, *ICAM-1* expression increased at all tested concentrations, with the strongest effect at 1 μM (1.6-fold increase; $p = 0.03$). *PTGS2* expression also increased in a concentration-dependent manner, reaching a 1.54-fold increase at 1 μM ($p = 0.03$). *GPR75* expression was elevated at higher concentrations (0.5–1 μM), with the greatest increase (1.43-fold) observed at 1 μM ($p = 0.03$).

Effects of RAS inhibitors on the expression of genes related to RAS, inflammation, and eicosanoid metabolism in hepatic cells

Effect of captopril on gene expression

The effect on the expression of RAS- and oxylipin metabolism-related genes (*ACE*, *ACE2*, *ICAM-1*, *CYP4F2*, and *GPR75*) was evaluated in HepG2 cells after 24 h of incubation with 0.25–2.25 μM captopril. *PTGS1* and *PTGS2* transcripts were not detected in HepG2 cells. Captopril significantly reduced *ACE* expression, with the greatest decrease (1.4-fold) observed at 2.25 μM ($p = 0.029$). In contrast, *ACE2* expression increased in a concentration-dependent manner, with a 1.36-fold increase at 2.25 μM ($p = 0.029$). *CYP4F2* expression also increased in a concentration-dependent manner, reaching a 2.42-fold increase at 2.25 μM ($p = 0.029$).

Effect of losartan on gene expression

After 24 h incubation with 0.75–2.75 μM losartan, the expression of *ACE*, *ACE2*, *ICAM-1*, *CYP4F2*, and *GPR75* was evaluated in HepG2 cells. Losartan reduced *CYP4F2* expression, with the greatest decrease (1.7-fold) observed at 2.75 μM ($p = 0.029$). *GPR75* expression was also decreased, with the strongest suppression detected at 2.75 μM .

Effect of MLN-4760 on gene expression

The effects of MLN-4760 (0.05–1 μM) on gene expression were evaluated after 24 h of incubation in HepG2 cells. MLN-4760 (0.25–1 μM) increased *ACE2* expression in a concentration-dependent manner, with the greatest effect at 1 μM (1.72-fold increase; $p = 0.029$). In contrast, *GPR75* expression was reduced across the same concentration range, with the strongest decrease observed at 1 μM .

Effects of low-frequency ultrasound and RAS inhibitors on endothelial cell function

Effects on cell viability

HUVECs were exposed to low-frequency (69 kHz), low-intensity (5–10 mW/cm^2) ultrasound (LFUS) for 5 min. LFUS treatment alone had no significant effect on metabolic viability of HUVECs [228]. In contrast, combined treatment with LFUS and captopril increased cell viability at all tested concentrations (0.25–2.25 μM) compared with LFUS-treated control cells. A similar effect was observed with losartan, where metabolic viability of HUVECs increased in a concentration-dependent manner following combined LFUS and drug exposure.

Effects on cell migration

Endothelial cell migration was assessed using a wound healing assay, in which a scratch was introduced in the HUVEC monolayer, followed by 5 min exposure to LFUS and 4 h incubation with captopril or losartan. LFUS enhanced the migration-promoting effect of captopril at concentrations of 1.75 and 2.25 μM compared with control cells ($p = 0.039$). Similarly, LFUS in combination with losartan increased migration of HUVECs at concentrations of 2.25 and 2.75 μM compared with treatment without LFUS ($p = 0.047$ and $p = 0.037$, respectively).

Effects on nitric oxide production

The combined effect of captopril or losartan and LFUS on NO production in HUVECs was assessed by measuring total nitrite and nitrate concentrations in the culture medium. LFUS enhanced the NO-stimulating effect of

captopril, with significantly higher NO levels observed at 1.75 and 2.25 μM compared with cells not exposed to LFUS (1.48- and 1.29-fold increase, respectively; $p = 0.039$ and $p = 0.036$). Losartan combined with LFUS increased NO production at concentrations of 2.25 and 2.75 μM ($p = 0.03$), whereas LFUS alone did not affect NO production.

Effects of low-frequency ultrasound and RAS inhibitors on proximal renal tubular epithelial cell function

Effects on cell viability

Metabolic viability of RPTEC/TERT1 cells was assessed following 5 min exposure to LFUS and 24 h incubation with captopril or losartan. Captopril (0.25–2.25 μM) had no significant effect on cell viability, either in the presence or absence of LFUS. In contrast, combined treatment with LFUS and losartan (0.75–2.75 μM) increased cell viability compared with control cells ($p = 0.03$). However, LFUS alone did not affect cell viability.

Effects on cell migration

Cell migration in RPTEC/TERT1 cells was assessed using a wound healing assay following 5 min exposure to LFUS and 4 h incubation with captopril or losartan. Captopril combined with LFUS did not promote cell migration. However, treatment with captopril at concentrations of 0.25 and 1.75 μM resulted in a significant reduction in wound area between LFUS-treated and untreated cells ($p = 0.035$ and $p = 0.046$, respectively). In contrast, losartan in combination with LFUS enhanced wound closure at higher concentrations, with increased cell migration observed at 2.25 and 2.75 μM compared with cells not exposed to LFUS ($p = 0.004$ and $p = 0.037$, respectively).

Effects on reactive oxygen species formation

Captopril at concentrations of 1.75 and 2.25 μM combined with LFUS reduced ROS levels compared with control cells ($p = 0.03$). In addition, significantly higher ROS release was observed in cells treated with all tested concentrations of captopril in combination with LFUS compared with cells not exposed to LFUS. Similarly, losartan combined with LFUS decreased ROS synthesis at concentrations of 1.75–2.75 μM ($p = 0.03$), whereas LFUS alone had no such effect.

Effects of low-frequency ultrasound and RAS inhibitors on the expression of inflammation- and eicosanoid metabolism-related genes in endothelial cells

Effect of captopril combined with LFUS

The combined effect of captopril and LFUS on *VCAM-1*, *ICAM-1*, *PTGS1*, *PTGS2*, and *CYP4F2* expression was evaluated in HUVECs. LFUS influenced the expression of *VCAM-1*, *ICAM-1*, and *PTGS2*. Combined treatment with captopril and LFUS resulted in a concentration-dependent decrease in *VCAM-1*, *ICAM-1*, and *PTGS2* expression compared with cells exposed to LFUS alone ($p = 0.03$). Notably, *PTGS2* suppression was more pronounced with combined treatment than with captopril alone. Additionally, captopril (0.75–2.25 μM) combined with LFUS increased *CYP4F2* expression, with the greatest effect observed at 2.25 μM (1.42-fold increase; $p = 0.03$).

Effect of losartan combined with LFUS

Combined treatment with losartan and LFUS reduced *PTGS2* expression in a concentration-dependent manner. *CYP4F2* expression was also affected by LFUS exposure; however, a significant decrease was observed only at higher concentrations (1.75–2.75 μM) compared with control cells ($p = 0.03$).

Effects of RAS inhibitors on 20-HETE production in endothelial cells

To assess the effect of RAS modulation on 20-HETE release in endothelial cells, HUVECs were treated with captopril, losartan, and MLN-4760 for 24 h. Captopril significantly reduced 20-HETE levels at concentrations of 1.25–2.25 μM , decreasing to 6.5–6.9 ng/mL compared with control cells (13.1 (10.3–15.2) ng/mL; $p = 0.029$) (Table 3.4). In contrast, losartan (0.75–2.75 μM) had no significant effect on 20-HETE release. MLN-4760 induced a dose-dependent increase in 20-HETE concentration, rising from 12.9 (11.7–15.5) ng/mL in control cells to 17.8–20.2 ng/mL at 0.1–1 μM ($p = 0.029$), with a maximum 1.6-fold increase.

Table 3.4. *Effects of RAS inhibitors on 20-HETE concentrations in HUVECs cultures*

Cell samples	20-HETE concentration (ng/mL)		<i>p</i> *
	median	min–max	
Control cells	13.1	10.3–15.2	–
0.25 μ M captopril	7.3	4.3–14.1	0.200
0.75 μ M captopril	7.9	6.2–15.4	0.343
1.25 μ M captopril	6.9	6.1–9.6	0.029
1.75 μ M captopril	6.7	5.6–9.5	0.029
2.25 μ M captopril	6.5	5.3–8.0	0.029
Control cells	11.6	5.1–17.4	–
0.75 μ M losartan	13.8	10.6–16.7	0.686
1.25 μ M losartan	13.3	11.3–19.2	0.486
1.75 μ M losartan	12.2	7.6–23.3	0.886
2.25 μ M losartan	14.6	9.7–15.6	0.686
2.75 μ M losartan	14.9	10.5–16.0	0.686
Control cells	12.9	11.7–15.5	–
0.05 μ M MLN-4760	15.0	10.7–18.3	0.486
0.1 μ M MLN-4760	17.8	15.9–23.8	0.029
0.25 μ M MLN-4760	18.9	15.9–21.3	0.029
0.5 μ M MLN-4760	19.1	16.3–22.4	0.029
1 μ M MLN-4760	20.2	16.6–22.8	0.029

**p* value compared with the control group (cells incubated with medium without RAS inhibitors), based on *n* = 4 independent experiments.

Effects of hydroxyeicosatetraenoic acids on cell function

Effects on endothelial cells

To evaluate the effects of CYP450-derived eicosanoids (hydroxyeicosatetraenoic acids) on cellular function, the metabolic activity of HUVECs was assessed after 24 h incubation with 20-HETE and 19(R)-HETE. 20-HETE reduced HUVECs' viability, with a decrease observed already at 1 nM and persisting across all tested concentrations (up to 100 nM). The strongest effect was detected at 100 nM, resulting in a 19% reduction in metabolic activity (*p* = 0.029). In contrast, 20-HETE antagonist 19(R)-HETE did not affect HUVECs' viability.

Effects on renal cells

In RPTEC/TERT1 cells, 20-HETE significantly reduced metabolic activity at concentrations of 2–100 nM compared with control cells (*p* = 0.029). The greatest effect was observed at 100 nM, resulting in a 21% decrease in cell viability

($p = 0.029$). In contrast, 19(R)-HETE (2–100 nM) had no significant effect on RPTEC/TERT1 metabolic activity.

Effects on hepatic cells

In HepG2 cells, 20-HETE (1–100 nM) also decreased metabolic activity compared with control cells ($p = 0.029$). The strongest reduction was observed at 100 nM, where HepG2 metabolic activity decreased by 25% ($p = 0.029$). Conversely, 19(R)-HETE (2–100 nM) increased HepG2 metabolic activity compared with control cells ($p = 0.029$), with the greatest effect observed at 10 nM, where cell viability increased by 29% ($p = 0.029$).

Effects of hydroxyeicosatetraenoic acids on GPR75 receptor expression

Before evaluating the effects of hydroxyeicosatetraenoic acids on *GPR75* expression, the localization of the *GPR75* protein was assessed in fixed HUVEC and HepG2 cells using indirect immunofluorescence. In both cell lines, a weak immunofluorescent signal was detected, predominantly distributed in the cytoplasm, without clear membrane or nuclear localization. Low levels of *GPR75* expression were observed in both endothelial and hepatic cells, consistent with the receptor's tissue specificity and its relatively low expression in non-neuronal cells. Negative control samples stained only with secondary IgG antibodies showed no detectable fluorescence, confirming the specificity of the staining.

Subsequent analysis of *GPR75* mRNA expression showed that 20-HETE induced a concentration-dependent increase in *GPR75* expression. In HUVECs, the greatest effect was observed at 100 nM, where *GPR75* increased 1.62-fold compared with control cells ($p = 0.029$). In RPTEC/TERT1 cells, no significant effect was observed at lower concentrations (1–5 nM), whereas higher concentrations (10–100 nM) increased *GPR75* expression, reaching a 1.3-fold increase at 100 nM ($p = 0.029$). A similar trend was observed in HepG2 cells, with the greatest increase in *GPR75* expression at 100 nM. In contrast, 19(R)-HETE did not significantly affect *GPR75* expression in any of the tested cell lines, suggesting that its biological effects may be related to competitive receptor binding and inhibition of downstream signaling rather than direct transcriptional regulation.

Summary of in vitro findings from cell culture experiments

Based on the initial *in vitro* experiments conducted in HUVEC, RPTEC/TERT1, and HepG2 cell models, key biomarkers reflecting RAS modulation and related inflammatory and eicosanoid metabolism pathways were identified. Functional and gene expression analyses demonstrated that changes in

RAS activity were closely associated with *ACE2* regulation and alterations in 20-HETE synthesis, both of which consistently responded to pharmacological RAS inhibition. *ACE2* was identified as a central biomarker of RAS activity, while 20-HETE was selected due to its link to RAS and its role in inflammation-related processes. Importantly, the detectability of these biomarkers in plasma supports their applicability in translational studies. Therefore, *ACE2* and 20-HETE were selected as the most promising candidates for further analysis to evaluate their associations with clinical forms of IHD and the use of RAS inhibitors in patient cohorts.

Results of studies using human biological material.

Study population and group characteristics

A total of 176 participants were included in the study. Among them, 122 patients were diagnosed with IHD, including 92 with ACS and 30 with SAP. The comparison group consisted of individuals without documented IHD ($n = 54$).

The characteristics of the study groups are presented in Table 3.5. Males constituted the majority of participants in all groups, with no significant differences in sex distribution between groups. The median age of the participants was 70 years. Individuals in the comparison group were older than those with SAP ($p < 0.001$).

Table 3.5. Demographic characteristics of the study group

Variable	Comparison group ($n = 54$)	SAP ($n = 30$)	ACS ($n = 92$)	All participants ($n = 176$)	p
Sex, n (%)					
Men	30 (55.6)	23 (76.7)	67 (72.8)	120 (68.2)	0.053 ¹
Women	24 (44.4)	7 (23.3)	25 (27.2)	56 (31.8)	
Age (years), median (min–max)	71 (46–72) ^a	62 (48–80) ^a	66.5 (39–85.2)	70 (39–85.2)	< 0.001 ²

p – level of statistical significance between the comparison, SAP, and ACS groups. ¹Fisher–Freeman–Halton test; ²Kruskal–Wallis test. Statistical significance level after Bonferroni correction for pairwise comparisons using the Mann–Whitney U test: ^a $p < 0.001$. ACS – acute coronary syndrome; SAP – stable angina pectoris.

Anthropometric, lifestyle, and clinical characteristics were compared between the study groups (Table 3.6). Significant differences were observed in height and weight ($p < 0.001$). Body mass index (BMI) values across all groups corresponded to overweight or class I obesity. Patients with ACS had lower diastolic blood pressure (BP) ($p = 0.009$) but higher heart rate

($p = 0.006$) compared with the comparison group. The distribution of smoking habits showed that the highest proportion of smokers was observed in the SAP group (30%), while the lowest was in the comparison group (1.9%). A history of myocardial infarction (MI) was present in 57.6% of ACS patients, of whom 41.3% had experienced ST-segment elevation MI. Arterial hypertension (AH) was less frequent in the ACS group compared with the SAP group ($p = 0.003$). Diabetes mellitus was present in 32.6% of ACS patients, whereas none of the individuals in the comparison group had this condition.

Table 3.6. *Anthropometric, lifestyle, and clinical characteristics of the study participants*

Variable	Comparison group	SAP	ACS	<i>p</i>
Anthropometric and hemodynamic parameters, median (min–max)				
Height, cm	164.3 (144–178) ^{a,b}	172.5 (156–195) ^a	172 (150–195) ^b	< 0.001 ¹
Weight, kg	77.3 (54–122) ^{c,d}	88 (60–123) ^c	86 (55–164) ^d	< 0.001 ¹
BMI, kg/m ²	28.9 (21.4–42.5)	28.4 (21.3–38.7)	29 (19.7–43.1)	0.956
Systolic BP, mmHg	135.3 (107–181)	133.5 (102–189)	135.5 (97–200)	0.69
Diastolic BP, mmHg	84.7 (61–109) ^c	83 (65–110)	80 (52–128) ^c	0.01 ¹
Heart rate, bpm	64.5 (44–99) ^f	68.5 (47–115)	70 (44–160) ^f	0.01 ¹
Smoking, <i>n</i> (%)				
Currently smoking	1 (1.9) ^{g,h}	9 (30.0) ^g	23 (25.0) ^h	< 0.001 ²
Former smoker	0 (0.0)	7 (23.3)	0 (0.0)	–
Diagnosis, <i>n</i> (%)				
History of MI	0 (0.0)	0 (0.0)	53 (57.6)	–
MI with ST elevation	0 (0.0)	0 (0.0)	38 (41.3)	–
Comorbidities, <i>n</i> (%)				
AH	41 (75.9) ⁱ	28 (93.3) ^j	34 (37.0) ^{ij}	< 0.001 ²
Diabetes mellitus	0 (0.0)	6 (20.0)	30 (32.6)	–

p – level of statistical significance between the comparison, SAP, and ACS groups. ¹Kruskal–Wallis test. ²Fisher–Freeman–Halton test. Statistical significance level after Bonferroni correction for pairwise comparisons using the Mann–Whitney U or Fisher’s exact test: ^{a, b, d, g–j} $p = 0.003$; ^c $p = 0.033$; ^e $p = 0.009$; ^f $p = 0.006$. ACS – acute coronary syndrome; AH – arterial hypertension; BP – blood pressure; BMI – body mass index; MI – myocardial infarction; SAP – stable angina pectoris.

The distribution of clinically significant coronary artery lesions ($\geq 50\%$ stenosis) by segments, based on coronary angiography data, is presented in Appendix 3. Significant differences between the SAP and ACS groups were observed in segments S7 and S12, corresponding to the mid-segment of the left anterior descending artery and the mid-segment of the right coronary artery, respectively. Clinically significant stenosis was more frequently detected in the ACS group in segment S7 (41.1%) compared with the SAP group (6.7%; $p < 0.001$), as well as in segment S12 (40.0% vs. 13.3%, respectively; $p = 0.007$).

The distribution of laboratory blood parameters across the study groups is presented in Table 3.7. Significant differences between groups were observed for HDL and LDL cholesterol, hemoglobin, leukocyte count, creatinine levels, and AST activity. HDL and LDL cholesterol concentrations were lower in the SAP group (1.2 (0.9–1.7) mmol/L and 2.8 (0.7–5.0) mmol/L, respectively) compared with the comparison group (1.5 (0.9–2.4) mmol/L and 3.6 (1.1–6.3) mmol/L; $p = 0.003$ and $p = 0.03$). Hemoglobin concentration was lower in the ACS group (138.0 (94.0–165.0) g/L) compared with the SAP group (147.0 (126.0–173.0) g/L; $p = 0.02$), while creatinine levels were higher in the ACS group (94.0 (56.0–270.0) $\mu\text{mol/L}$) compared with the SAP group (74.8 (55.0–120.0) $\mu\text{mol/L}$; $p < 0.001$). Leukocyte count was also higher in the ACS group ($8.5 (2.9\text{--}17.2) \times 10^9/\text{L}$) compared with the SAP group ($6.9 (4.0\text{--}15.8) \times 10^9/\text{L}$; $p = 0.017$). In addition, AST activity was higher in the ACS group (31.0 (1.0–576.0) U/L) compared with the SAP group (15.5 (2.0–64.4) U/L; $p = 0.004$).

Table 3.7. Biochemical and hematological blood parameters of the study participants

Variable	Comparison group	SAP	ACS	<i>p</i>
Laboratory parameters, median (min–max)				
Glucose (mmol/L)	5.6 (4.3–7.0)	6.0 (4.7–7.3)	ND	0.305
HDL cholesterol (mmol/L)	1.5 (0.9–2.4) ^a	1.2 (0.9–1.7) ^a	1.2 (1.1–1.4)	0.002¹
LDL cholesterol (mmol/L)	3.6 (1.1–6.3) ^b	2.8 (0.7–5.0) ^b	2.7 (2.4–2.9)	0.012¹
Triglycerides (mmol/L)	1.2 (0.5–4.5)	1.6 (0.6–4.3)	1.1 (1.0–1.2)	0.062
Hemoglobin (g/L)	ND	147.0 (126.0–173.0)	138.0 (94.0–165.0)	0.002²

Table 3.7. Continued

Variable	Comparison group	SAP	ACS	<i>p</i>
Leukocytes ($\times 10^9/L$)	ND	6.9 (4.0–15.8)	8.5 (2.9–17.2)	0.017²
Platelets ($\times 10^9/L$)	ND	235.0 (121.0–371.0)	216.0 (115.0–552.0)	0.107
CRP (mg/L)	ND	3.9 (0.5–7.0)	2.6 (1.0–177.9)	0.37
Creatinine ($\mu\text{mol/L}$)	ND	74.8 (55.0–120.0)	94.0 (56.0–270.0)	< 0.001²
AST (U/L)	ND	15.5 (2.0–64.4)	31.0 (1.0–576.0)	0.004²
ALT (U/L)	ND	29.0 (9.0–57.0)	29.0 (2.0–138.0)	0.418
INR	ND	1.0 (1.0–1.1)	1.1 (0.9–2.5)	0.478

p – level of statistical significance between the comparison, SAP, and ACS groups. ¹Kruskal–Wallis test. ²Mann–Whitney U test. Statistical significance level after Bonferroni correction for pairwise comparisons using the Mann–Whitney U test: ^a*p* = 0.003; ^b*p* = 0.03. ACS – acute coronary syndrome; ALT – alanine aminotransferase; AST – aspartate aminotransferase; CRP – C-reactive protein; HDL cholesterol – high-density lipoprotein cholesterol; INR – International Normalized Ratio; LDL cholesterol – low-density lipoprotein cholesterol; ND – no data; SAP – stable angina pectoris.

Medications used by the study groups are presented in Table 3.8. Almost all patients in the ACS group were treated with ACEIs, statins, and antiplatelet agents. The most commonly used ACEIs were perindopril and zofenopril. Perindopril was more frequently used in the SAP group (56.7%) compared with the ACS group (30.4%) (*p* = 0.003). ARBs were also more commonly used in the SAP group (26.7%) than in the ACS group (2.2%) (*p* = 0.003). Statins were most frequently prescribed to ACS patients (97.8%), and antiplatelet agents were also used more often in the ACS group.

Table 3.8. Medications used by the study participants

Variable	Comparison group	SAP	ACS	<i>p</i>
Prescribed medications, <i>n</i> (%)				
ACEIs	0 (0.0)	18 (60.0) ^a	90 (97.8) ^a	< 0.001¹
Fosinopril	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (3.3)	–
Perindopril	0 (0.0)	17 (56.7) ^b	28 (30.4) ^b	< 0.001¹
Ramipril	0 (0.0)	1 (3.3)	1 (1.1)	–
Trandolapril	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.1)	–
Zofenopril	0 (0.0)	0 (0.0)	57 (62.0)	–

Table 3.8. Continued

Variable	Comparison group	SAP	ACS	<i>p</i>
ARBs	0 (0.0)	8 (26.7) ^c	2 (2.2) ^c	< 0.001 ¹
Statins	2 (3.7) ^{d,e}	27 (90.0) ^d	90 (97.8) ^e	< 0.001 ¹
Atorvastatin	ND	12 (40.0)	89 (96.7)	–
Rozuvastatin	ND	15 (50.0)	1 (1.1)	–
Cholesterol absorption inhibitor				
Ezetimibe	ND	9 (30.0)	1 (1.1)	–
Antiplatelet agents	0 (0.0)	18 (60.0) ^f	88 (95.7) ^f	< 0.001 ¹
Aspirin	0 (0.0)	18 (60.0) ^g	82 (89.1) ^g	< 0.001 ¹
Aspirin + clopidogrel	0 (0.0)	13 (43.3)	28 (30.4)	< 0.001 ¹
Aspirin + ticagrelor	0 (0.0)	0 (0.0)	59 (64.1)	–

p – level of statistical significance between the comparison, SAP, and ACS groups. ¹Fisher–Freeman–Halton test. Statistical significance level after Bonferroni correction for pairwise comparisons using Fisher’s exact test: ^{a–g}*p* = 0.003. ACEIs – angiotensin-converting enzyme inhibitors; ACS – acute coronary syndrome; ARBs – angiotensin II receptor blockers; ND – no data; SAP – stable angina pectoris.

Patients with SAP and ACS were treated with antiplatelet agents; therefore, platelet aggregation was assessed. Platelet aggregation parameters are presented in Table 3.9. Patients in the SAP group exhibited higher platelet aggregation values, whereas those in the ACS group showed lower values.

Table 3.9. Platelet aggregation test parameters of the study participants

Variable	Comparison group	SAP	ACS	<i>p</i>
Platelet aggregation tests, median (min–max)				
Platelet aggregation induced by ADP (% ^{Ag})	ND	67.5 (5.0–91.0)	19.0 (6.0–94.0)	< 0.001 ¹
Platelet aggregation induced by epinephrine (% ^{Ag})	ND	73.5 (8.0–95.0)	28.0 (6.0–94.0)	0.001 ¹

p – level of statistical significance between the comparison, SAP, and ACS groups. ¹Mann–Whitney U test. ACS – acute coronary syndrome; ADP – adenosine diphosphate; ND – no data; SAP – stable angina pectoris; %^{Ag} – percentage platelet aggregation.

Based on the interaction between RAS modulation and the CYP4F2–20-HETE signaling axis (ACE2 (RAS)–20-HETE) identified in experimental cell culture models, circulating ACE2 and 20-HETE concentrations were further evaluated across different clinical study groups (Table 3.10). Patients with ACS exhibited the lowest ACE2 levels (5.5 (2.1–28.2) ng/mL), which were significantly lower compared with both the SAP and comparison

groups. Similarly, ACS patients had the lowest circulating 20-HETE concentrations (6.1 (0.7–303.4) ng/mL), which were also significantly lower than those observed in the SAP and comparison groups.

Table 3.10. *ACE2 and 20-HETE concentrations in the blood plasma of the study participants*

Variable	Comparison group	SAP	ACS	<i>p</i>
Concentration measurement, median (min–max)				
ACE2 (ng/mL)	8.0 (4.4–59.3) ^a	7.3 (4.2–21.3) ^b	5.5 (2.1–28.2) ^{a,b}	< 0.001 ¹
20-HETE (ng/mL)	52.7 (2.3–332.7) ^c	27.2 (6.4–368.5) ^d	6.1 (0.7–303.4) ^{c,d}	< 0.001 ¹

p – level of statistical significance between the comparison, SAP, and ACS groups. ¹Kruskal–Wallis test. Statistical significance level after Bonferroni correction for pairwise comparisons using the Mann–Whitney U test: ^{a, c, d}*p* = 0.003; ^b*p* = 0.027. 20-HETE – 20-hydroxyeicosate-traenoic acid; ACE2 – angiotensin-converting enzyme 2; ACS – acute coronary syndrome; SAP – stable angina pectoris.

The distribution of genotypes and alleles of *CYP4F2* rs2108622, rs1558139, rs3093135, and rs2074902 variants across the study groups is presented in Table 3.11. Genotype distributions in each group were consistent with the Hardy–Weinberg equilibrium (*p* > 0.05). No significant differences in genotype distribution were observed between the comparison, SAP, and ACS groups.

Table 3.11. *Distribution of CYP4F2 rs2108622, rs1558139, rs3093135, and rs2074902 genotypes and alleles among the study participants*

Variable	Comparison group	SAP	ACS	<i>p</i>
Gene variant, <i>n</i> (%)				
<i>CYP4F2</i> rs2108622				
CC	33 (66.0)	15 (50.0)	57 (62.0)	0.69
CT	14 (28.0)	13 (43.3)	29 (31.5)	
TT	3 (6.0)	2 (6.7)	6 (6.5)	
C allele	80 (80.0)	43 (71.7)	143 (77.7)	–
T allele	20 (20.0)	17 (28.3)	41 (22.3)	

Table 3.11. Continued

Variable	Comparison group	SAP	ACS	<i>p</i>
CYP4F2 rs1558139				
AA	8 (16.0)	6 (20.0)	18 (19.6)	0.824
AG	30 (60.0)	14 (46.7)	50 (54.3)	
GG	12 (24.0)	10 (33.3)	24 (26.1)	
A allele	46 (46.0)	26 (43.3)	86 (46.7)	–
G allele	54 (54.0)	34 (56.7)	98 (53.3)	
CYP4F2 rs3093135				
AA	34 (68.0)	16 (53.3)	55 (59.8)	0.219
AT	16 (32.0)	13 (43.3)	30 (32.6)	
TT	0 (0.0)	1 (3.3)	7 (7.6)	
A allele	84 (84.0)	45 (75.0)	140 (76.1)	–
T allele	16 (16.0)	15 (25.0)	44 (23.9)	
CYP4F2 rs2074902				
CC	0 (0.0)	1 (3.3)	4 (4.3)	0.276
CT	16 (32.0)	12 (40.0)	22 (23.9)	
TT	34 (68.0)	17 (56.7)	66 (71.7)	
C allele	16 (16.0)	14 (23.3)	30 (16.3)	–
T allele	84 (84.0)	46 (76.7)	154 (83.7)	

ACS – acute coronary syndrome; SAP – stable angina pectoris.

Associations between ACE2 and 20-HETE concentrations and medication use

To evaluate the effect of RAS-modulating drugs on ACE2 and 20-HETE concentrations, patients were stratified according to ACEI use within the SAP and ACS groups (Table 3.12). In the ACS group, only two patients were not receiving ACEIs; therefore, the results may not reflect the true physiological effect of these drugs in this group. In the SAP group, ACE2 concentrations were significantly higher in patients treated with ACEIs (8.0 (5.1–21.3) ng/mL) compared with those not receiving these medications (5.6 (4.2–9.3) ng/mL; $p = 0.001$). No significant differences in 20-HETE concentrations were observed between ACEI users and non-users within the SAP group.

Table 3.12. Associations between ACE2 and 20-HETE concentrations and ACEI use in SAP and ACS groups

Variable	SAP		<i>p</i>	ACS		<i>p</i>
	<i>n</i>	median (min–max)		<i>n</i>	median (min–max)	
ACE2 (ng/mL)						
ACEI users	18	8.0 (5.1–21.3)	0.001 ¹	90	5.5 (2.1–20.8)	0.13
Non-users of ACEIs	12	5.6 (4.2–9.3)		2	17.6 (6.9–28.2)	
20-HETE (ng/mL)						
ACEI users	18	28.6 (7.2–368.5)	0.31	90	6.1 (0.7–68.5)	0.81
Non-users of ACEIs	12	20.9 (6.4–318.4)		2	152.1 (0.9–303.4)	

¹Mann–Whitney U test. 20-HETE – 20-hydroxyeicosatetraenoic acid; ACE2 – angiotensin-converting enzyme 2; ACEI – angiotensin-converting enzyme inhibitor; ACS – acute coronary syndrome; SAP – stable angina pectoris.

To evaluate the associations between ACE2 and 20-HETE concentrations and the use of different ACEIs, the analysis was performed in the ACS group (Table 3.13). Perindopril was the most commonly used ACEI in the SAP group (Table 3.8). In the ACS group, no differences in ACE2 and 20-HETE concentrations were observed between patients treated with perindopril and those receiving zofenopril.

Table 3.13. Associations between ACE2 and 20-HETE concentrations and the use of different ACEIs in the ACS group

Variable	ACS		<i>p</i>
	<i>n</i>	median (min–max)	
ACE2 (ng/mL)			
Perindopril users	28	5.4 (3.3–20.8)	0.793
Zofenopril users	57	5.5 (2.6–14.8)	
20-HETE (ng/mL)			
Perindopril users	28	6.0 (0.8–68.5)	0.751
Zofenopril users	57	6.1 (0.7–29.7)	

20-HETE – 20-hydroxyeicosatetraenoic acid; ACE2 – angiotensin-converting enzyme 2; ACS – acute coronary syndrome.

When evaluating the associations between ARB use and ACE2 and 20-HETE concentrations (Table 3.14), ACE2 levels in the SAP group were significantly lower in patients treated with ARBs (5.6 (4.4–9.3) ng/mL) compared with non-users (7.7 (4.2–21.3) ng/mL; $p = 0.021$). No significant differences in 20-HETE concentrations were observed between these groups.

Table 3.14. Associations between ACE2 and 20-HETE concentrations and ARB use in SAP and ACS groups

Variable	SAP		<i>p</i>	ACS		<i>p</i>
	<i>n</i>	median (min–max)		<i>n</i>	median (min–max)	
ACE2 (ng/mL)						
ARB users	8	5.6 (4.4–9.3)	0.021 ¹	2	17.6 (6.9–28.2)	0.13
Non-users of ARBs	22	7.7 (4.2–21.3)		90	5.5 (2.1–20.8)	
20-HETE (ng/mL)						
ARB users	8	17.0 (6.4–110.1)	0.122	2	152.1 (0.9–303.4)	0.81
Non-users of ARBs	22	28.6 (7.2–368.5)		90	6.1 (0.7–68.5)	

¹Mann–Whitney U test. 20-HETE – 20-hydroxyeicosatetraenoic acid; ACE2 – angiotensin-converting enzyme 2; ACS – acute coronary syndrome; ARB – angiotensin II receptor blocker; SAP – stable angina pectoris.

In the ACS group, ACE2 concentrations did not differ between patients treated with ticagrelor and those not receiving this medication (Table 3.15). However, 20-HETE levels were significantly higher in ticagrelor users (6.7 (0.7–29.7) vs. 1.3 (0.7–303.4) ng/mL; $p = 0.011$). Patients in the SAP group were not treated with ticagrelor.

Table 3.15. Associations between ACE2 and 20-HETE concentrations and ticagrelor use in the ACS group

Variable	ACS		<i>p</i>
	<i>n</i>	median (min–max)	
ACE2 (ng/mL)			
Ticagrelor users	59	5.3 (2.6–13.8)	0.119
Non-users of ticagrelor	33	6.9 (2.1–28.2)	
20-HETE (ng/mL)			
Ticagrelor users	59	6.7 (0.7–29.7)	0.011 ¹
Non-users of ticagrelor	33	1.3 (0.7–303.4)	

¹Mann–Whitney U test. 20-HETE – 20-hydroxyeicosatetraenoic acid; ACE2 – angiotensin-converting enzyme 2; ACS – acute coronary syndrome.

When evaluating the associations between clopidogrel use and ACE2 and 20-HETE concentrations in the SAP and ACS groups (Table 3.16), no significant differences in ACE2 levels were observed in either the SAP or ACS groups ($p = 0.227$ and $p = 0.577$, respectively). In the SAP group, 20-HETE concentrations were significantly lower in patients treated with clopidogrel (22.5 (7.2–226.9) ng/mL) compared with non-users (73.1 (6.4–368.5) ng/mL; $p = 0.024$). This difference was even more pronounced in the ACS group, where clopidogrel users had significantly lower 20-HETE levels (1.0 (0.7–11.7) ng/mL) compared with non-users (6.9 (0.7–303.4) ng/mL; $p < 0.001$).

Table 3.16. Associations between ACE2 and 20-HETE concentrations and clopidogrel use in SAP and ACS groups

Variable	SAP		<i>p</i>	ACS		<i>p</i>
	<i>n</i>	median (min–max)		<i>n</i>	median (min–max)	
ACE2 (ng/mL)						
Clopidogrel users	13	8.3 (4.4–14.6)	0.227	28	6.2 (2.1–28.2)	0.577
Non-users of clopidogrel	16	7.2 (4.2–21.3)		64	5.4 (2.6–20.8)	
20-HETE (ng/mL)						
Clopidogrel users	13	22.5 (7.2–226.9)	0.024¹	28	1.0 (0.7–11.7)	< 0.001¹
Non-users of clopidogrel	16	73.1 (6.4–368.5)		64	6.9 (0.7–303.4)	

¹Mann–Whitney U test. 20-HETE – 20-hydroxyeicosatetraenoic acid; ACE2 – angiotensin-converting enzyme 2; ACS – acute coronary syndrome; SAP – stable angina pectoris.

Influence of genetic factors on ACE2 and 20-HETE concentrations

The influence of genetic factors on ACE2 and 20-HETE concentrations according to *CYP4F2* gene variants is presented in Tables 3.17 and 3.18. No significant effect of genetic factors on ACE2 levels was observed in any of the study groups. However, 20-HETE concentrations differed significantly depending on the *CYP4F2* rs1558139 variant in the SAP group ($p = 0.027$; Table 3.18). The highest 20-HETE levels were observed in patients with the GG genotype (96.9 (22.5–368.5) ng/mL), compared with those carrying the AG genotype (20.0 (6.4–226.9) ng/mL; $p = 0.009$). No significant differences were found in the comparison or ACS groups.

After evaluating genetic models of all four *CYP4F2* variants in the individual study groups (comparison, SAP, and ACS), no statistically significant differences in ACE2 concentrations were observed (Table 3.19). The closest to statistical significance was the rs1558139 recessive model in the ACS group; however, the difference did not reach significance – 4.8 (2.8–7.4) ng/mL compared with 6.1 (2.1–28.2) ng/mL in carriers of the AG and GG genotypes ($p = 0.053$).

When evaluating 20-HETE concentrations, significant differences were observed only for the rs1558139 variant in the SAP group (Table 3.20). In the dominant model, individuals with the GG genotype had higher 20-HETE levels (96.9 (22.5–368.5) ng/mL) compared with carriers of the AA and AG genotypes (20.0 (6.4–318.4) ng/mL; $p = 0.011$). In the overdominant model, individuals with the AG genotype exhibited lower 20-HETE concentrations (20.0 (6.4–226.9) ng/mL) than those with the AA and GG genotypes (71.3 (7.2–368.5) ng/mL; $p = 0.023$). No significant effect of *CYP4F2* genetic models on 20-HETE concentrations was observed in the comparison or ACS groups.

Table 3.17. Influence of genetic factors on ACE2 plasma concentrations in the study participants

Variable	Comparison group		<i>p</i>	SAP		<i>p</i>	ACS		<i>p</i>
	<i>n</i>	ACE2 (ng/mL), median (min–max)		<i>n</i>	ACE2 (ng/mL), median (min–max)		<i>n</i>	ACE2 (ng/mL), median (min–max)	
CYP4F2 rs2108622									
CC	33	7.8 (4.4–13.9)	0.343	15	7.2 (4.4–11.9)	0.963	57	5.5 (2.6–28.2)	0.698
CT	14	7.9 (5.3–59.3)		13	7.7 (4.2–21.3)		29	5.4 (2.1–20.8)	
TT	3	11.7 (7.5–26.9)		2	7.3 (7.2–7.3)		6	7.1 (3.8–8.4)	
CYP4F2 rs1558139									
AA	8	7.5 (4.4–14.6)	0.318	6	5.8 (5.0–7.7)	0.229	18	4.8 (2.8–7.4)	0.132
AG	30	7.7 (4.7–26.9)		14	7.7 (4.2–21.3)		50	5.9 (2.1–14.8)	
GG	12	10.4 (5.8–59.3)		10	7.5 (4.4–11.9)		24	6.1 (3.2–28.2)	
CYP4F2 rs3093135									
AA	34	7.8 (4.4–14.6)	0.388	16	6.8 (4.4–10.3)	0.322	55	5.4 (2.6–28.2)	0.654
AT	16	8.6 (5.3–59.3)		13	7.3 (4.2–21.3)		30	5.6 (2.1–20.8)	
TT	0	–		1	–		7	7.1 (3.8–10.9)	
CYP4F2 rs2074902									
CC	0	–	0.388	1	–	0.890	4	7.7 (3.8–8.4)	0.743
CT	16	8.6 (5.3–59.3)		12	7.5 (4.2–21.3)		22	5.4 (2.1–20.8)	
TT	34	7.8 (4.4–14.6)		17	7.2 (4.4–11.9)		66	5.5 (2.6–28.2)	

ACE2 – angiotensin-converting enzyme 2; ACS – acute coronary syndrome; SAP – stable angina pectoris.

Table 3.18. Influence of genetic factors on 20-HETE plasma concentrations in the study participants

Variable	Comparison group		<i>p</i>	SAP		<i>p</i>	ACS		<i>p</i>
	<i>n</i>	20-HETE (ng/mL), median (min–max)		<i>n</i>	20-HETE (ng/mL), median (min–max)		<i>n</i>	20-HETE (ng/mL), median (min–max)	
CYP4F2 rs2108622									
CC	33	48.4 (2.3–332.7)	0.424	15	25.1 (6.4–318.4)	0.296	57	5.3 (0.7–303.4)	0.400
CT	14	56.9 (24.3–314.7)		13	26.2 (7.2–368.5)		29	7.0 (0.7–68.5)	
TT	3	49.0 (34.9–70.8)		2	88.8 (55.6–122.0)		6	6.3 (0.9–17.9)	
CYP4F2 rs1558139									
AA	8	50.3 (15.1–75.0)	0.479	6	26.6 (7.2–318.4)	0.027 ¹	18	7.1 (0.8–54.6)	0.281
AG	30	63.2 (6.9–332.7)		14	20.0 (6.4–226.9) ^a		50	5.6 (0.7–303.4)	
GG	12	54.3 (2.3–241.7)		10	96.9 (22.5–368.5) ^a		24	6.6 (0.7–68.5)	
CYP4F2 rs3093135									
AA	34	49.0 (2.3–332.7)	0.17	16	23.8 (6.4–318.4)	0.594	55	5.3 (0.7–303.4)	0.516
AT	16	56.9 (24.3–314.7)		13	28.2 (7.2–368.5)		30	7.2 (0.7–68.5)	
TT	0	–		1	–		7	6.7 (0.9–11.2)	
CYP4F2 rs2074902									
CC	0	–	0.17	1	–	0.348	4	3.8 (0.9–11.2)	0.238
CT	16	56.9 (24.3–314.7)		12	27.2 (7.2–368.5)		22	7.1 (0.7–68.5)	
TT	34	49.0 (2.3–332.7)		17	25.1 (6.4–318.4)		66	5.4 (0.7–303.4)	

¹Kruskal–Wallis test. Statistical significance level after Bonferroni correction for pairwise comparisons using the Mann–Whitney U test: ^a*p* = 0.009. 20-HETE – 20-hydroxyeicosatetraenoic acid; ACS – acute coronary syndrome; SAP – stable angina pectoris.

Table 3.19. *Influence of CYP4F2 genetic inheritance models on ACE2 concentrations*

CYP4F2 variant	Group	Genetic model	Genotype	n	Median (min–max)	Reference genotypes	n	Median (min–max)	p
rs2108622	Comparison group	Dominant	CC	33	7.8 (4.6–13.9)	TT + CT	17	8.3 (5.3–59.3)	0.395
		Recessive	TT	3	11.7 (7.5–26.9)	CT + CC	47	7.8 (4.4–59.3)	0.165
		Overdominant	CT	14	7.9 (5.3–59.3)	CC + TT	36	8.0 (4.4–26.9)	0.880
	SAP	Dominant	CC	15	7.2 (4.4–11.9)	TT + CT	15	7.3 (4.2–21.3)	0.819
		Recessive	TT	2	7.3 (7.2–7.3)	CT + CC	28	7.3 (4.2–21.3)	1.000
		Overdominant	CT	13	7.7 (4.2–21.3)	CC + TT	17	7.2 (4.4–11.9)	0.802
	ACS	Dominant	CC	57	5.5 (2.6–28.2)	TT + CT	35	5.7 (2.1–20.8)	0.693
		Recessive	TT	6	7.1 (3.8–8.4)	CT + CC	86	5.5 (2.1–28.2)	0.406
		Overdominant	CT	29	5.4 (2.1–20.8)	CC + TT	63	5.5 (2.6–28.2)	0.980
rs1558139	Comparison group	Dominant	GG	12	10.4 (5.8–59.3)	AA + AG	38	7.8 (4.4–26.9)	0.140
		Recessive	AA	8	7.5 (4.4–14.6)	AG + GG	42	8.0 (4.7–59.3)	0.937
		Overdominant	AG	30	7.8 (4.7–26.9)	AA + GG	20	9.7 (4.4–59.3)	0.223
	SAP	Dominant	GG	10	7.5 (4.4–11.9)	AA + AG	20	7.2 (4.2–21.3)	0.947
		Recessive	AA	6	5.8 (5.0–7.7)	AG + GG	24	7.6 (4.2–21.3)	0.108
		Overdominant	AG	14	7.7 (4.2–21.3)	AA + GG	16	7.2 (4.4–11.9)	0.228
	ACS	Dominant	GG	24	6.1 (3.2–28.2)	AA + AG	68	5.4 (2.1–14.8)	0.284
		Recessive	AA	18	4.8 (2.8–7.4)	AG + GG	74	6.1 (2.1–28.2)	0.053
		Overdominant	AG	50	5.9 (2.1–14.8)	AA + GG	42	5.3 (2.8–28.2)	0.554

Table 3.19. Continued

<i>CYP4F2</i> variant	Group	Genetic model	Genotype	<i>n</i>	Median (min–max)	Reference genotypes	<i>n</i>	Median (min–max)	<i>p</i>
rs3093135	Comparison group	Dominant	AA	34	7.8 (4.4–14.6)	TT + AT	16	8.6 (5.3–59.3)	0.394
		Recessive	TT	0	–	AT + AA	50	8.0 (4.4–59.3)	–
		Overdominant	AT	16	8.6 (5.3–59.3)	AA + TT	34	7.8 (4.4–14.6)	0.394
	SAP	Dominant	AA	16	6.8 (4.4–10.3)	TT + AT	14	7.5 (4.2–21.3)	0.349
		Recessive	TT	1	11.9 (11.9–11.9)	AT + AA	29	7.2 (4.2–21.3)	0.203
		Overdominant	AT	13	7.3 (4.2–21.3)	AA + TT	17	7.2 (4.4–11.9)	0.645
ACS	ACS	Dominant	AA	55	5.4 (2.6–28.2)	TT + AT	37	5.7 (2.1–20.8)	0.556
		Recessive	TT	7	7.1 (3.8–10.9)	AT + AA	85	5.5 (2.1–28.2)	0.389
		Overdominant	AT	30	5.6 (2.1–20.8)	AA + TT	62	5.5 (2.6–28.2)	0.901
	Comparison group	Dominant	TT	34	7.8 (4.4–14.6)	CC + CT	16	8.6 (5.3–59.3)	0.394
		Recessive	CC	0	–	CT + TT	50	8.0 (4.4–59.3)	–
		Overdominant	CT	16	8.6 (5.3–59.3)	CC + TT	34	7.8 (4.4–14.6)	0.394
rs2074902	SAP	Dominant	TT	17	7.2 (4.4–11.9)	CC + CT	13	7.3 (4.2–21.3)	0.645
		Recessive	CC	1	7.3 (7.3–7.3)	CT + TT	29	7.2 (4.2–21.3)	1.000
		Overdominant	CT	12	7.5 (4.2–21.3)	CC + TT	18	7.3 (4.4–11.9)	0.656
	ACS	Dominant	TT	66	5.5 (2.6–28.2)	CC + CT	26	5.6 (2.1–20.8)	0.738
		Recessive	CC	4	7.7 (3.8–8.4)	CT + TT	88	5.5 (2.1–28.2)	0.449
		Overdominant	CT	22	5.4 (2.1–20.8)	CC + TT	70	5.6 (2.6–28.2)	0.996

ACS – acute coronary syndrome; SAP – stable angina pectoris.

Table 3.20. *Influence of CYP4F2 genetic inheritance models on 20-HEETE concentrations*

<i>CYP4F2</i> variant	Group	Genetic model	Genotype	<i>n</i>	Median (min–max)	Reference genotypes	<i>n</i>	Median (min–max)	<i>p</i>
rs2108622	Comparison group	Dominant	CC	33	48.4 (2.3–332.7)	TT + CT	17	55.0 (24.3–314.7)	0.227
		Recessive	TT	3	49.0 (34.9–70.8)	CT + CC	47	54.3 (2.3–332.7)	1.000
		Overdominant	CT	14	56.9 (24.3–314.7)	CC + TT	36	48.7 (2.3–332.7)	0.199
	SAP	Dominant	CC	15	25.1 (6.4–318.4)	TT + CT	15	28.2 (7.2–368.5)	0.319
		Recessive	TT	2	88.8 (55.6–122.0)	CT + CC	28	25.7 (6.4–368.5)	0.170
		Overdominant	CT	13	26.2 (7.2–368.5)	CC + TT	17	28.9 (6.4–318.4)	0.770
	ACS	Dominant	CC	57	5.3 (0.7–303.4)	TT + CT	35	6.8 (0.7–68.5)	0.190
		Recessive	TT	6	6.3 (0.9–17.9)	CT + CC	86	6.1 (0.7–303.4)	0.896
		Overdominant	CT	29	7.0 (0.7–68.5)	CC + TT	63	5.4 (0.7–303.4)	0.196
rs1558139	Comparison group	Dominant	GG	12	54.3 (2.3–241.7)	AA + AG	38	54.0 (6.9–332.7)	0.370
		Recessive	AA	8	50.3 (15.1–75.0)	AG + GG	42	54.6 (2.3–332.7)	0.587
		Overdominant	AG	30	63.2 (6.9–332.7)	AA + GG	20	52.7 (2.3–241.7)	0.231
	SAP	Dominant	GG	10	96.9 (22.5–368.5)	AA + AG	20	20.0 (6.4–318.4)	0.011¹
		Recessive	AA	6	26.6 (7.2–318.4)	AG + GG	24	27.2 (6.4–368.5)	0.876
		Overdominant	AG	14	20.0 (6.4–226.9)	AA + GG	16	71.3 (7.2–368.5)	0.023¹
	ACS	Dominant	GG	24	6.6 (0.7–68.5)	AA + AG	68	6.0 (0.7–303.4)	0.566
		Recessive	AA	18	7.1 (0.8–54.6)	AG + GG	74	5.8 (0.7–303.4)	0.213
		Overdominant	AG	50	5.6 (0.7–303.4)	AA + GG	42	6.9 (0.7–68.5)	0.133

Table 3.20. Continued

<i>CYP4F2</i> variant	Group	Genetic model	Genotype	<i>n</i>	Median (min–max)	Reference genotypes	<i>n</i>	Median (min–max)	<i>p</i>
rs3093135	Comparison group	Dominant	AA	34	49.0 (2.3–332.7)	TT + AT	16	56.9 (24.3–314.7)	0.173
		Recessive	TT	0	–	AT + AA	50	54.3 (2.3–332.7)	–
		Overdominant	AT	16	56.9 (24.3–314.7)	AA + TT	34	49.0 (2.3–332.7)	0.173
	SAP	Dominant	AA	16	23.8 (6.4–318.4)	TT + AT	14	40.1 (7.2–368.5)	0.329
		Recessive	TT	1	52.0 (52.0–52.0)	AT + AA	29	26.2 (6.4–368.5)	0.729
		Overdominant	AT	13	28.2 (7.2–368.5)	AA + TT	17	25.1 (6.4–318.4)	0.402
	ACS	Dominant	AA	55	5.3 (0.7–303.4)	TT + AT	37	6.6 (0.7–68.5)	0.265
		Recessive	TT	7	6.7 (0.9–11.2)	AT + AA	85	6.0 (0.7–303.4)	0.897
		Overdominant	AT	30	6.5 (0.7–68.5)	AA + TT	62	5.5 (0.7–303.4)	0.277
rs2074902	Comparison group	Dominant	TT	34	49.0 (2.3–332.7)	CC + CT	16	56.9 (24.3–314.7)	0.173
		Recessive	CC	0	–	CT + TT	50	54.3 (2.3–332.7)	–
		Overdominant	CT	16	56.9 (24.3–314.7)	CC + TT	34	49.0 (2.3–332.7)	0.173
	SAP	Dominant	TT	17	25.1 (6.4–318.4)	CC + CT	13	28.2 (7.2–368.5)	0.402
		Recessive	CC	1	122.0 (122.0–122.0)	CT + TT	29	26.2 (6.4–368.5)	0.204
		Overdominant	CT	12	27.2 (7.2–368.5)	CC + TT	18	27.0 (6.4–318.4)	0.719
	ACS	Dominant	TT	66	5.4 (0.7–303.4)	CC + CT	26	6.8 (0.7–68.5)	0.189
		Recessive	CC	4	3.8 (0.9–11.2)	CT + TT	88	6.1 (0.7–303.4)	0.598
		Overdominant	CT	22	7.1 (0.7–68.5)	CC + TT	70	5.4 (0.7–303.4)	0.098

¹Mann–Whitney U test. ACS – acute coronary syndrome; SAP – stable angina pectoris.

Associations of ACE2 and 20-HETE concentrations with clinical and laboratory parameters

ACE2 concentration was significantly associated with hemoglobin levels, showing a weak positive correlation ($r_s = 0.283$; $p = 0.003$) (Table 3.21). A statistically significant association was also observed between ACE2 concentration and platelet aggregation induced by ADP ($r_s = 0.193$; $p = 0.033$). Other analyzed parameters – age, creatinine concentration, AST activity, and platelet aggregation induced by epinephrine – were not significantly associated with ACE2 levels ($p > 0.05$). A moderate, statistically significant negative correlation was found between 20-HETE and creatinine concentrations ($r_s = -0.365$; $p < 0.001$), indicating that higher creatinine levels were associated with lower 20-HETE concentrations. In addition, a significant positive association was observed between 20-HETE and ADP-induced platelet aggregation ($r_s = 0.326$; $p < 0.001$), as well as a borderline significant positive association with epinephrine-induced platelet aggregation ($r_s = 0.178$; $p = 0.05$). Other examined variables, including age, hemoglobin concentration, and AST activity, were not significantly associated with 20-HETE levels ($p > 0.05$). No significant correlation was observed between ACE2 and 20-HETE concentrations ($r_s = 0.047$; $p = 0.605$).

Table 3.21. *Associations between ACE2 and 20-HETE concentrations and the analyzed parameters*

Variable	ACE2 (ng/mL)		20-HETE (ng/mL)	
	r_s	p	r_s	p
20-HETE (ng/mL)	0.047	0.605	1.000	–
Age, years	0.008	0.931	–0.072	0.431
Hemoglobin (g/L)	0.283	0.003	0.161	0.094
Creatinine ($\mu\text{mol/L}$)	–0.018	0.851	–0.365	< 0.001
AST (U/L)	–0.105	0.396	–0.158	0.203
Platelet aggregation induced by ADP (% ^{Aggr})	0.193	0.033	0.326	< 0.001
Platelet aggregation induced by epinephrine (% ^{Aggr})	0.053	0.562	0.178	0.05

20-HETE – 20-hydroxyeicosatetraenoic acid; ACE2 – angiotensin-converting enzyme 2; ADP – adenosine diphosphate; AST – aspartate aminotransferase; r_s – Spearman's rank correlation coefficient; %^{Aggr} – percentage platelet aggregation.

Univariate and multivariable logistic regression for the prediction of ACS

Clinical, laboratory, and functional parameters with potential relevance to the pathophysiology of ACS were included in the univariate logistic regression model, including age, hemoglobin concentration, creatinine levels, AST activity, platelet aggregation, and circulating biomarker concentrations (ACE2 and 20-HETE) (Table 3.22).

Higher creatinine levels were associated with an increased likelihood of ACS (OR = 1.05; $p = 0.001$). In contrast, higher hemoglobin levels (OR = 0.94; $p = 0.003$), platelet aggregation induced by ADP (OR = 0.92; $p < 0.001$) and epinephrine (OR = 0.96; $p < 0.001$), as well as higher concentrations of ACE2 (OR = 0.85; $p = 0.001$) and 20-HETE (OR = 0.95; $p < 0.001$), were associated with a lower likelihood of ACS.

Table 3.22. *Influence of biomarkers on the occurrence of ACS in the study cohort based on univariate logistic regression analysis*

Variable	OR	95% CI	<i>p</i>
Age	0.99	0.96–1.02	0.584
Hemoglobin	0.94	0.91–0.98	0.003
Creatinine	1.05	1.02–1.09	0.001
AST	1.05	1.00–1.10	0.056
Platelet aggregation induced by ADP	0.92	0.90–0.95	< 0.001
Platelet aggregation induced by epinephrine	0.96	0.94–0.98	< 0.001
ACE2	0.85	0.77–0.94	0.001
20-HETE	0.95	0.93–0.97	< 0.001

20-HETE – 20-hydroxyeicosatetraenoic acid; ACE2 – angiotensin-converting enzyme 2; ADP – adenosine diphosphate; AST – aspartate aminotransferase; OR – odds ratio; CI – confidence interval.

After performing multivariable logistic regression analysis, the association between biomarkers and the occurrence of ACS was evaluated (Table 3.23). It was found that both 20-HETE and ACE2 concentrations were independently associated with ACS. Higher 20-HETE levels were associated with a lower likelihood of ACS (OR = 0.953; $p < 0.001$), while ACE2 concentration was also significantly associated with a reduced likelihood of ACS (OR = 0.884; $p = 0.022$).

Table 3.23. *Influence of biomarkers on the occurrence of ACS in the study cohort based on multivariable logistic regression analysis*

Variable	OR	95% CI	<i>p</i>
20-HETE	0.953	0.934–0.972	< 0.001
ACE2	0.884	0.796–0.982	0.022

20-HETE – 20-hydroxyeicosatetraenoic acid; ACE2 – angiotensin-converting enzyme 2; CI – confidence interval; OR – odds ratio.

ROC curve analysis (Table 3.24) showed that adding ACE2 to the diagnostic model together with 20-HETE did not significantly improve its diagnostic performance, as the discriminative ability (AUC) of the combined model was similar to that of the model based on 20-HETE alone. Circulating 20-HETE levels reliably discriminated ACS from SAP (AUC = 0.91) (Fig. 3.1 A). The optimal cut-off value, determined using the Youden index, was ≤ 11.34 ng/mL, with a sensitivity of 86.9% and a specificity of 83.3%. When comparing ACS with healthy individuals, the AUC was 0.93 (Fig. 3.1 B), and when compared with all non-ACS cases, the AUC was 0.92 (Fig. 3.1 C).

Table 3.24. *Diagnostic performance of 20-HETE alone and in combination with ACE2*

Group comparison	AUC	95% CI	Cut-off value	Sensitivity (%)	Specificity (%)
20-HETE + ACE2 model					
ACS vs. SAP	0.87	0.79–0.94	–	84.8	80.0
ACS vs. comparison group	0.93	0.88–0.97	–	90.2	88.9
ACS vs. SAP + comparison group	0.91	0.86–0.96	–	89.1	82.7
20-HETE model					
ACS vs. SAP	0.91	0.84–0.97	≤ 11.34 ng/mL	86.9	83.3
ACS vs. comparison group	0.93	0.88–0.97	≤ 13.55 ng/mL	90.2	88.9
ACS vs. SAP + comparison group	0.92	0.87–0.96	≤ 13.55 ng/mL	90.2	84.5

20-HETE – 20-hydroxyeicosatetraenoic acid; ACE2 – angiotensin-converting enzyme 2; ACS – acute coronary syndrome; AUC – area under the curve; CI – confidence interval; SAP – stable angina pectoris.

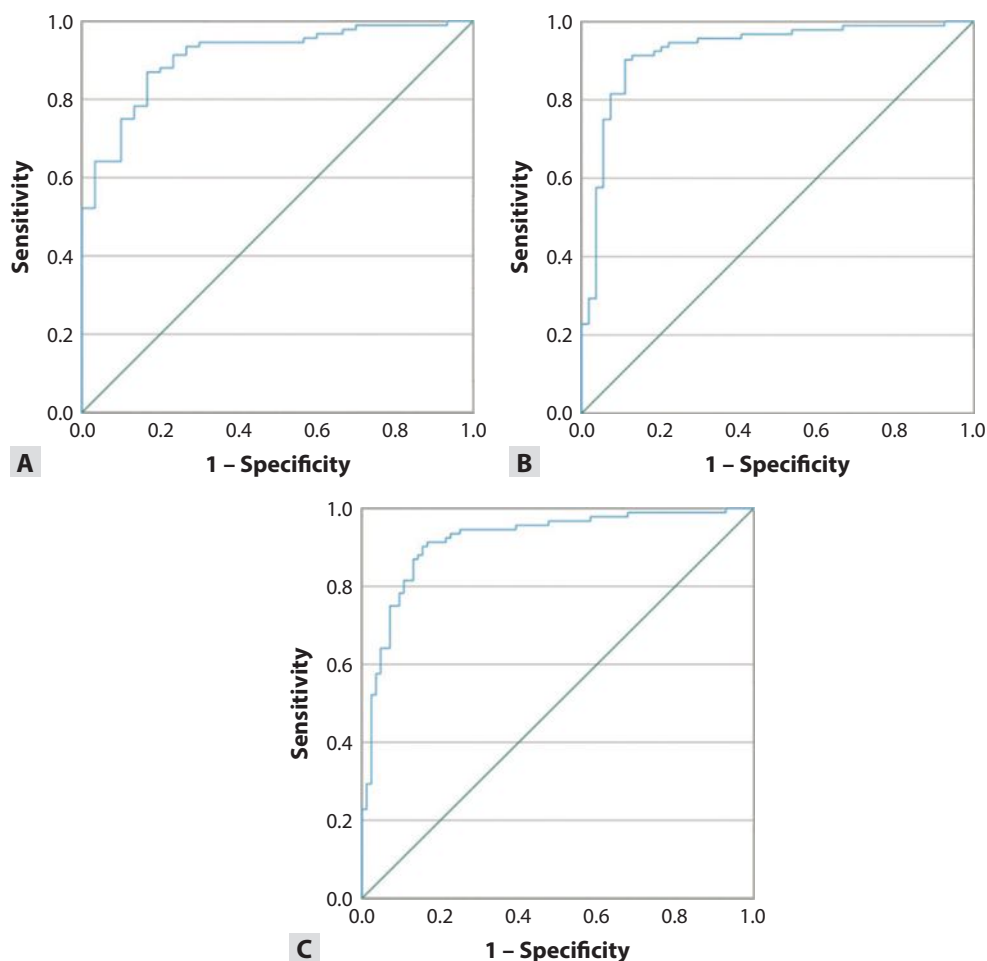


Fig. 3.1. ROC curves evaluating the prognostic value of 20-HETE concentration for ACS occurrence

A – differentiation of ACS from SAP (AUC = 0.91); **B** – differentiation of ACS from the comparison group (AUC = 0.925); **C** – differentiation of ACS from SAP and comparison groups (AUC = 0.92).

A schematic model, based on the key findings of the present study, illustrating the interplay between ACE2/RAS imbalance, ED, CYP4F2–20-HETE signaling, and vascular instability leading to ACS, is presented in Fig. 3.2.

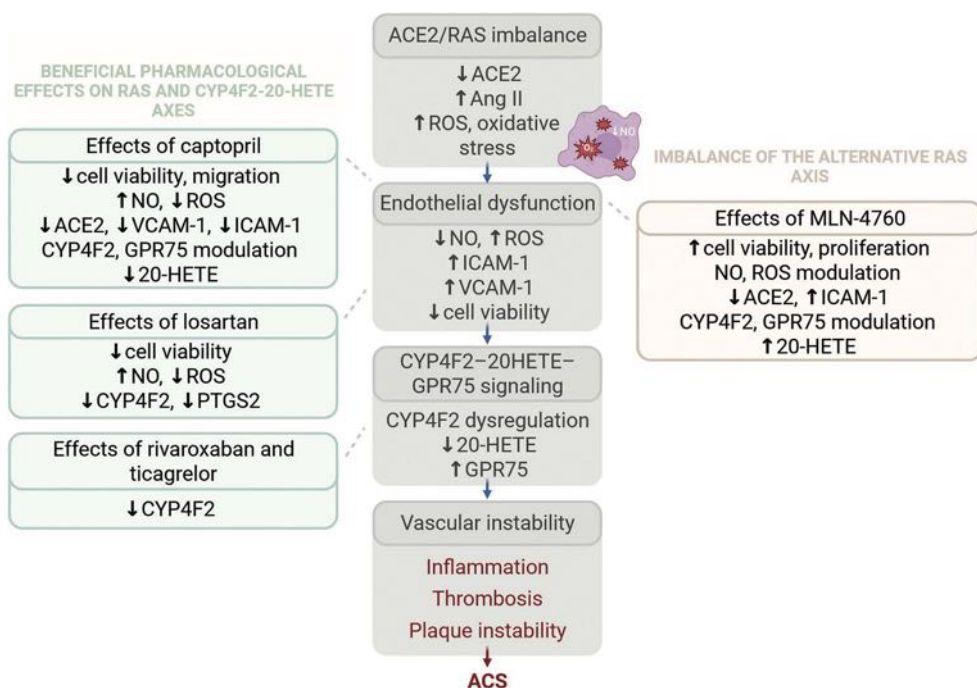


Fig. 3.2. Proposed model of ACE2–RAS–eicosanoid axis dysregulation in acute coronary syndromes

CONCLUSIONS

1. The impact of anticoagulants and antiplatelet agents on *CYP4F2* expression in endothelial cells is concentration-dependent. Both rivaroxaban and ticagrelor significantly suppress *CYP4F2* expression in HUVECs. However, *CYP4F2* protein levels decrease significantly only following treatment with ticagrelor, whereas rivaroxaban has no significant effect on protein concentration.
2. Captopril, losartan, and MLN-4760 exert differential effects on HUVEC, RPTEC/TERT1, and HepG2 cell cultures, with outcomes being cell-type specific. In HUVECs and RPTEC/TERT1 cells, captopril and losartan reduce the expression of RAS components and adhesion molecule genes, which correlates with favorable functional and metabolic changes. In HUVECs, captopril reduces 20-HETE activity, while losartan inhibits *CYP4F2* expression. The effect of MLN-4760 is associated with the inhibition of the alternative RAS axis, increased 20-HETE activity, and upregulation of *GPR75*. In HepG2 cells, alterations in the RAS and the

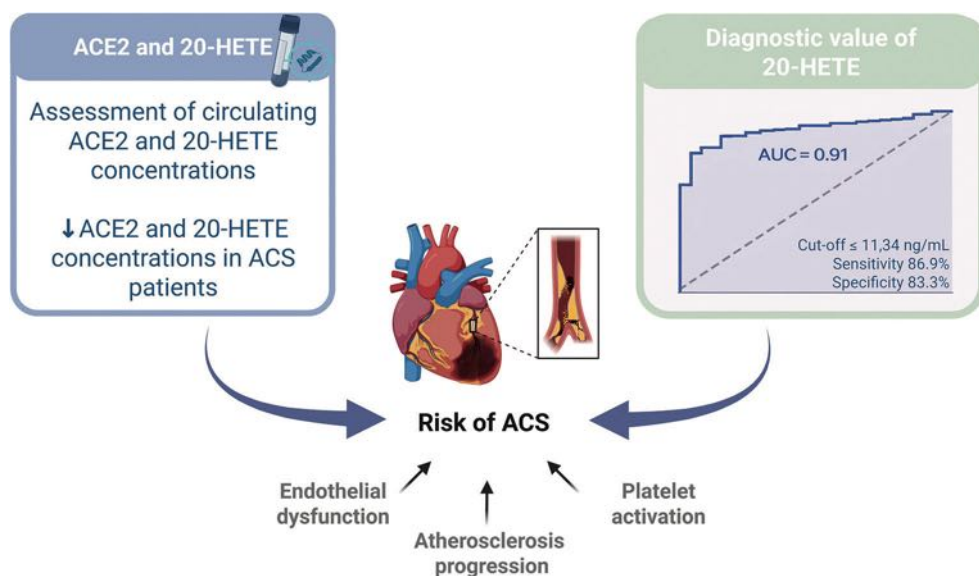
CYP4F2–20-HETE metabolic axis are less pronounced, highlighting their dependence on the cellular phenotype.

3. LFUS, applied in combination with captopril and losartan, modulates the functional response of HUVEC and RPTEC/TERT1 cells and potentiates the biological effects of these drugs. In HUVECs, LFUS enhances RAS inhibitor-induced cell migration and NO production, indicating a beneficial effect on endothelial function. Furthermore, LFUS alters the expression of genes involved in inflammation and eicosanoid metabolism, including *CYP4F2*, confirming the involvement of the CYP4F2–20-HETE axis in the cellular response. In RPTEC/TERT1 cells, the effects of LFUS vary depending on the specific RAS inhibitor used, modulating parameters of cell migration and oxidative response.
4. The influence of hydroxyeicosatetraenoic acids on cellular function is compound- and cell-type specific. 20-HETE reduces the metabolic activity of HUVEC, RPTEC/TERT1, and HepG2 cells, whereas 19(R)-HETE increases metabolic activity in HepG2 cells. 20-HETE upregulates *GPR75* receptor expression across all tested cell cultures, particularly in the HUVEC model, confirming the significance of the CYP4F2–20-HETE–GPR75 axis in the regulation of cellular function.
5. In patients with SAP treated with RAS inhibitors, higher ACE2 concentrations are associated with ACE inhibitor use, while ARB use is linked to lower ACE2 levels. No significant differences in ACE2 or 20-HETE concentrations are observed between different ACE inhibitors. Ticagrelor use is associated with higher 20-HETE levels in the ACS group, whereas clopidogrel use correlates with lower 20-HETE levels in both SAP and ACS groups. The *CYP4F2* rs1558139 variant is significantly associated with 20-HETE concentration in the SAP group: under the dominant model, patients with the GG genotype exhibit higher 20-HETE levels compared to AG and AA genotypes. Higher ADP-induced platelet aggregation correlates with elevated ACE2 and 20-HETE concentrations.
6. ACE2 and 20-HETE concentrations differ significantly across clinical IHD groups, with the lowest values observed in ACS patients compared to the SAP and comparison groups. Although both ACE2 and 20-HETE levels are independently associated with the probability of ACS, ROC analysis demonstrates that 20-HETE possesses superior diagnostic value. The inclusion of ACE2 into the model does not significantly improve its discriminative power. These findings suggest that 20-HETE is a pro-

mising biomarker for differentiating clinical forms of IHD and assessing disease progression.

PRACTICAL RECOMMENDATIONS

The determination of circulating ACE2 and 20-HETE concentrations may be useful in differentiating between stable and acute forms of ischemic heart disease, as significantly lower concentrations of these biomarkers are observed in patients with ACS.



Practical recommendations fig. Relevance of ACE2 and 20-HETE in the assessment of ACS

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. World Health Organization. Global health estimates 2021: deaths by cause, age, sex, by country and by region, 2000–2021 [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2024 [cited 2026 Feb 5].
2. Organisation for Economic Co-operation and Development, European Commission. Health at a glance: Europe 2024: state of health in the EU cycle. Paris: OECD Publishing; 2024. <https://doi.org/10.1787/b3704e14-en>
3. Eurostat. Cardiovascular diseases statistics [Internet]. Luxembourg: Eurostat; 2025 [cited 2025 Dec 17].
4. Boden WE, De Caterina R, Kaski JC, Bairey Merz N, Berry C, Marzilli M, et al. Myocardial ischemic syndromes: a new nomenclature to harmonize evolving international clinical practice guidelines. *Circulation*. 2024;150(20):1631–7. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.123.065656>
5. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Münzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2001;104(22):2673–8. <https://doi.org/10.1161/hc4601.099485>
6. Sara JD, Widmer RJ, Matsuzawa Y, Lennon RJ, Lerman LO, Lerman A. Prevalence of coronary microvascular dysfunction among patients with chest pain and nonobstructive coronary artery disease. *JACC Cardiovasc Interv*. 2015;8(11):1445–53. <https://doi.org/10.1016/j.jcin.2015.06.017>
7. Kumar S, Mehta PK, Eshtehardi P, Hung OY, Koh JS, Kumar A, et al. Functional coronary angiography in symptomatic patients with no obstructive coronary artery disease. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2021;98(5):827–35. <https://doi.org/10.1002/ccd.29237>
8. Daiber A, Steven S, Weber A, Shuvaev VV, Muzykantov VR, Laher I, et al. Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *Br J Pharmacol*. 2017;174(12):1589–619. <https://doi.org/10.1111/bph.13517>
9. Poredos P, Poredos AV, Gregoric ID. Endothelial dysfunction and its clinical implications. *Angiology*. 2021;72(7):604–15. <https://doi.org/10.1177/0003319720987752>
10. Blann AD. A reliable marker of vascular function: does it exist? *Trends Cardiovasc Med*. 2015;25(7):588–91. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2015.03.005>
11. Pacurari M, Kafoury R, Tchounwou PB, Ndebele K. The renin-angiotensin-aldosterone system in vascular inflammation and remodeling. *Int J Inflam*. 2014;2014:689360. <https://doi.org/10.1155/2014/689360>
12. Jacoby DS, Rader DJ. Renin-angiotensin system and atherothrombotic disease: from genes to treatment. *Arch Intern Med*. 2003;163(10):1155–64. <https://doi.org/10.1001/archinte.163.10.1155>
13. Silva GM, França-Falcão MS, Calzerra NTM, Luz MS, Gadelha DDA, Balarini CM, et al. Role of renin-angiotensin system components in atherosclerosis: focus on Ang II, ACE2, and Ang-(1-7). *Front Physiol*. 2020;11:1067. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.01067>
14. Yung LM, Wong WT, Tian XY, Leung FP, Yung LH, Chen ZY, et al. Inhibition of renin-angiotensin system reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in estrogen deficient rats. *PLoS One*. 2011;6(3):e17437. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017437>
15. Roman RJ. 20-HETE and hypertension. *Hypertension*. 2024;81(10):2012–5. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.124.21718>

16. Tatarunas V, Kupstyte-Kristapone N, Zvikas V, Jakstas V, Zaliunas R, Lesauskaite V. Factors associated with platelet reactivity during dual antiplatelet therapy in patients with diabetes after acute coronary syndrome. *Sci Rep.* 2020;10(1):3175. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59663-3>
17. World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs) fact sheet [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2025 [cited 2025 Nov 10].
18. Higienos instituto Sveikatos informacijos centras. Mirties priežastys 2024 [Internet]. Vilnius: Higienos institutas; 2025 [cited 2025 Nov 10].
19. Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med.* 2014;276(6):618–32. <https://doi.org/10.1111/joim.12296>
20. Abdu FA, Hu H, Lu P. Circulating metabolic and inflammatory biomarkers in MINOCA: pathophysiologic mechanisms and clinical implications. *Clin Chim Acta.* 2026;15;589: 121009. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2026.121009>
21. Alexander Y, et al. Endothelial function in cardiovascular medicine: a consensus paper of the European Society of Cardiology working groups. *Cardiovasc Res.* 2021;117(1): 29–42. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa085>
22. Kunadian V, Osto E, Schmidt-Trucksäss A, Shechter M, Trifunovic D, Duncker DJ, et al. An EAPCI expert consensus document on ischaemia with non-obstructive coronary arteries. *Eur Heart J.* 2020;41(37):3504–3520. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa503>
23. Husain K. Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis. *World J Biol Chem.* 2015;6(3):209–17. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i3.209>
24. Chistiakov DA, Revin VV, Sobenin IA, Orekhov AN. Vascular endothelium: functioning in norm, changes in atherosclerosis and current dietary approaches to improve endothelial function. *Mini Rev Med Chem.* 2015;15(4):338–50. <https://doi.org/10.2174/1389557515666150226114031>
25. Widlansky ME. Vascular endothelial function. In: Lanzer P, editor. *PanVascular medicine*. Berlin: Springer; 2015. pp. 1–16. https://doi.org/10.1007/978-3-642-37078-6_8
26. Sun HJ, Wu ZY, Nie XW, Bian JS. Role of endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the link between inflammation and hydrogen sulfide. *Front Pharmacol.* 2020;10:1568. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01568>
27. Park-Windhol C, D'Amore PA. Disorders of vascular permeability. *Annu Rev Pathol.* 2016;11:251–81. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044506>
28. Muniyappa R, Sowers JR. Role of insulin resistance in endothelial dysfunction. *Rev Endocr Metab Disord.* 2013;14(1):5–12. <https://doi.org/10.1007/s11154-012-9229-1>
29. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation.* 2007;115(10):1285–95. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.652859>
30. Lüscher TF, Richard V, Tschudi M, Yang Z, Boulanger C. Endothelial control of vascular tone in large and small coronary arteries. *J Am Coll Cardiol.* 1990;15(3):519–27. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(90\)90619-Z](https://doi.org/10.1016/0735-1097(90)90619-Z)
31. Baenziger NL, Fogerty FJ, Mertz LF, Chernuta LF. Regulation of histamine-mediated prostacyclin synthesis in cultured human vascular endothelial cells. *Cell.* 1981;24(3): 915–23. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90117-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90117-3)
32. Campbell WB, Harder DR. Endothelium-derived hyperpolarizing factors and vascular cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in the regulation of tone. *Circ Res.* 1999;84(4):484–8. <https://doi.org/10.1161/01.RES.84.4.484>

33. Nishiyama SK, Zhao J, Wray DW, Richardson RS. Vascular function and endothelin-1: tipping the balance between vasodilation and vasoconstriction. *J Appl Physiol (1985)*. 2017;122(2):354–60. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00772.2016>
34. Virdis A, Duranti E, Taddei S. Oxidative stress and vascular damage in hypertension: role of angiotensin II. *Int J Hypertens*. 2011;2011:916310. <https://doi.org/10.4061/2011/916310>
35. MacKenzie A. Endothelium-derived vasoactive agents, AT1 receptors and inflammation. *Pharmacol Ther*. 2011;131(2):187–203. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.11.001>
36. Nafisa A, Gray SG, Cao Y, Wang T, Xu S, Wattoo FH, et al. Endothelial function and dysfunction: impact of metformin. *Pharmacol Ther*. 2018;192:150–62. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.07.007>
37. Meng LB, Chen K, Zhang YM, Gong T. Common injuries and repair mechanisms in the endothelial lining. *Chin Med J (Engl)*. 2018;131(19):2338–45. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.241805>
38. Pilard M, Ollivier EL, Gourdou-Latyszenok V, Couturaud F, Lemarié CA. Endothelial cell phenotype, a major determinant of venous thrombo-inflammation. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9:864735. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.864735>
39. Cardner M, Yalcinkaya M, Goetze S, Luca E, Balaz M, Hunjadi M, et al. Structure-function relationships of HDL in diabetes and coronary heart disease. *JCI Insight*. 2020;5(1):131491. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.131491>
40. Dri E, Lampas E, Lazaros G, Lazarou E, Theofilis P, Tsioufis C, et al. Inflammatory mediators of endothelial dysfunction. *Life (Basel)*. 2023;13(6):1420. <https://doi.org/10.3390/life13061420>
41. Bottaro B, Larsen B, Madhur MS. OxLDL and endothelial dysfunction. *Free Radic Biol Med*. 2014;75:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.02.014>
42. Fosse JH, Haraldsen G, Falk K, Edelmann R. Endothelial cells in emerging viral infections. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:619690. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.619690>
43. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EHC, Félétou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)*. 2009;196(2):193–222. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2009.01964.x>
44. Gimbrone MA Jr, García-Cardena G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):620–36. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306301>
45. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33(7):829–37. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>
46. Rossi GP, Seccia TM, Barton M, Danser AHJ, de Leeuw PW, Dhaun N, et al. Endothelial factors in the pathogenesis and treatment of chronic kidney disease. Part I: general mechanisms: a joint consensus statement from the European Society of Hypertension Working Group on Endothelin and Endothelial Factors and the Japanese Society. *J Hypertens*. 2018;36(3):451–61. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000001599>
47. Moorhouse RC, Webb DJ, Kluth DC, Dhaun N. Endothelin antagonism and its role in the treatment of hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2013;15(5):489–96. <https://doi.org/10.1007/s11906-013-0380-1>
48. Six I, Flissi N, Lenglet G, Louvet L, Kamel S, Gallet M, et al. Uremic toxins and vascular dysfunction. *Toxins (Basel)*. 2020;12(6):404. <https://doi.org/10.3390/toxins12060404>

49. Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol*. 2018;100:1–19. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2017.05.005>
50. An Y, Xu BT, Wan SR, Ma XM, Long Y, Xu Y, et al. The role of oxidative stress in diabetes mellitus-induced vascular endothelial dysfunction. *Cardiovasc Diabetol*. 2023;22(1):17. <https://doi.org/10.1186/s12933-023-01965-7>
51. Kaur R, Singh V, Kumari P, Singh R, Chopra H, Bin Emran T. Novel insights on the role of VCAM-1 and ICAM-1: potential biomarkers for cardiovascular diseases. *Ann Med Surg (Lond)*. 2022;84:104802. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2022.104802>
52. Zhang J, Alcaide P, Liu L, Sun J, He A, Lusinskas FW, et al. Regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by mast cells, macrophages, and neutrophils. *PLoS One*. 2011;6(1):e14525. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014525>
53. Prado Y, Pérez L, Eltit F, Echeverría C, Llancalahuen FM, Tapia P, et al. Procoagulant phenotype induced by oxidized high-density lipoprotein associates with acute kidney injury and death. *Thromb Res*. 2023;223:7–23. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2023.01.014>
54. Valencia I, Lumpuy-Castillo J, Magalhaes G, Sánchez-Ferrer CF, Lorenzo Ó, Peiró C. Mechanisms of endothelial activation, hypercoagulation and thrombosis in COVID-19: a link with diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*. 2024;23(1):18. <https://doi.org/10.1186/s12933-023-02097-8>
55. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001;357(Pt 3):593–615. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3570593>
56. Crane BR, Arvai AS, Ghosh DK, Wu C, Getzoff ED, Stuehr DJ, et al. The crystal structure of inducible nitric oxide synthase oxygenase domain dimer with L-arginine and tetrahydrobiopterin. *Chemtracts*. 2000;13(13):859–66. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.279.5359.2121>
57. Michel T, Vanhoutte PM. Cellular signaling and NO production. *Pflugers Arch*. 2010;459(6):807–16. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0765-9>
58. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(10):803–15. <https://doi.org/10.1038/nri2171>
59. Chiu JJ, Chien S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev*. 2011;91(1):327–87. <https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2009>
60. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA Jr, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation: nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest*. 1995;96(1):60–8. <https://doi.org/10.1172/JCI118074>
61. Tousoulis D, Kampoli AM, Tentolouris C, Papageorgiou N, Stefanadis C. The role of nitric oxide on endothelial function. *Curr Vasc Pharmacol*. 2012;10(1):4–18. <https://doi.org/10.2174/157016112798829760>
62. Francis SH, Busch JL, Corbin JD. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev*. 2010;62(3):525–63. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002907>
63. Kovacs I, Lindermayr C. Nitric oxide-based protein modification: formation and site-specificity of protein S-nitrosylation. *Front Plant Sci*. 2013;4:137. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00137>

64. Ding J, Yu M, Jiang J, Luo Y, Zhang Q, Wang S, et al. Angiotensin II decreases endothelial nitric oxide synthase phosphorylation via AT1R Nox/ROS/PP2A pathway. *Front Physiol.* 2020;11:566410. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.566410>
65. Mundi S, Massaro M, Scoditti E, Carluccio MA, van Hinsbergh VWM, Iruela-Arispe ML, et al. Endothelial permeability, LDL deposition, and cardiovascular risk factors: a review. *Cardiovasc Res.* 2018;114(1):35–52. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx226>
66. Katusic ZS, d'Uscio LV, Nath KA. Vascular protection by tetrahydrobiopterin: progress and therapeutic prospects. *Trends Pharmacol Sci.* 2009;30(1):48–54. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.10.003>
67. Nauli SM. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and the cardiovascular system: in physiology and in disease states. *Am J Biomed Sci Res.* 2022;15(2):155–79. <https://doi.org/10.34297/ajbsr.2022.15.002087>
68. Ambrosino P, Bachetti T, D'Anna SE, Galloway B, Bianco A, D'Agnano V, et al. Mechanisms and clinical implications of endothelial dysfunction in arterial hypertension. *J Cardiovasc Dev Dis.* 2022;9(5):136. <https://doi.org/10.3390/jcdd9050136>
69. Joffe HV, Adler GK. Effect of aldosterone and mineralocorticoid receptor blockade on vascular inflammation. *Heart Fail Rev.* 2005;10(1):31–7. <https://doi.org/10.1007/s10741-005-2346-0>
70. Rincon-Choles H, Kasinath BS, Gorin Y, Abboud HE. Angiotensin II and growth factors in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl.* 2002;82:S8–S11. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.62.s82.3.x>
71. Forrester SJ, Booz GW, Sigmund CD, Coffman TM, Kawai T, Rizzo V, et al. Angiotensin II signal transduction: an update on mechanisms of physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2018;98(3):1627–738. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2017>
72. Thomas WG. Regulation of angiotensin II type 1 (AT1) receptor function. *Regul Pept.* 1999;79(1):9–23. [https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(98\)00140-2](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(98)00140-2)
73. Morgan T, Griffiths C, Delbridge L. Interaction of ACE inhibitors and AT(1)-receptor blockers on maximum blood pressure response in spontaneous hypertensive rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2002;3(1):16–8. <https://doi.org/10.3317/jraas.2002.002>
74. Scialo F, Daniele A, Amato F, Pastore L, Matera MG, Cazzola M, et al. ACE2: the major cell entry receptor for SARS-CoV-2. *Lung.* 2020;198(6):867–77. <https://doi.org/10.1007/s00408-020-00408-4>
75. Perrotta F, Matera MG, Cazzola M, Bianco A. Severe respiratory SARS-CoV-2 infection: does ACE2 receptor matter? *Respir Med.* 2020;168:105996. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2020.105996>
76. Santos RAS, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DMR, Machado RP, de Buhr I, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(14):8258–63. <https://doi.org/10.1073/pnas.1432869100>
77. Sampaio WO, Dos Santos RAS, Faria-Silva R, da Mata Machado LT, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension.* 2007;49(1):185–92. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000251865.35728.2f>
78. Koleva DI, Orbetzova MM, Nikolova JG, Deneva TI. Pathophysiological role of adiponectin, leptin and asymmetric dimethylarginine in the process of atherosclerosis. *Folia Med (Plovdiv).* 2016;58(4):234–40. <https://doi.org/10.1515/folmed-2016-0039>

79. Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, Mehta JL. Oxidative stress in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2017;19(11):42. <https://doi.org/10.1007/s11883-017-0678-6>
80. Freitas Lima LC, Braga VA, do Socorro de França Silva M, Cruz JC, Sousa Santos SH, de Oliveira Monteiro MM, et al. Adipokines, diabetes and atherosclerosis: an inflammatory association. *Front Physiol*. 2015;6:304. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00304>
81. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res*. 2014;114(12):1852–66. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302721>
82. Nguyen Dinh Cat A, Montezano AC, Burger D, Touyz RM. Angiotensin II, NADPH oxidase, and redox signaling in the vasculature. *Antioxid Redox Signal*. 2013;19(10):1110–20. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4641>
83. Montezano AC, Nguyen Dinh Cat A, Rios FJ, Touyz RM. Angiotensin II and vascular injury. *Curr Hypertens Rep*. 2014;16(6):431. <https://doi.org/10.1007/s11906-014-0431-2>
84. Schiffrin EL, Touyz RM. Inflammation and vascular hypertrophy induced by angiotensin II: role of NADPH oxidase-derived reactive oxygen species independently of blood pressure elevation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(5):707–9. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000069907.12357.7E>
85. Durante A, Peretto G, Laricchia A, Ancona F, Spartera M, Mangieri A, et al. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in the pathogenesis of atherosclerosis. *Curr Pharm Des*. 2012;18(7):981–1004. <https://doi.org/10.2174/138161212799436467>
86. Liang B, Wang X, Zhang N, Yang H, Bai R, Liu M, et al. Angiotensin-(1-7) attenuates angiotensin II-induced ICAM-1, VCAM-1, and MCP-1 expression via the MAS receptor through suppression of p38 and NF- κ B pathways in HUVECs. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35(6):2472–82. <https://doi.org/10.1159/000374047>
87. Lubrano V, Balzan S. Roles of LOX-1 in microvascular dysfunction. *Microvasc Res*. 2016;105:132–40. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2016.02.006>
88. Poznyak AV, Grechko AV, Orekhova VA, Chegodaev YS, Wu WK, Orekhov AN. Oxidative stress and antioxidants in atherosclerosis development and treatment. *Biology (Basel)*. 2020;9(3):60. <https://doi.org/10.3390/biology9030060>
89. Abe K, Nakashima H, Ishida M, Miho N, Sawano M, Soe NN, et al. Angiotensin II-induced osteopontin expression in vascular smooth muscle cells involves Gq/11, Ras, ERK, Src and Ets-1. *Hypertens Res*. 2008;31(5):987–98. <https://doi.org/10.1291/hypres.31.987>
90. Collins AR, Schnee J, Wang W, Kim S, Fishbein MC, Bruemmer D, et al. Osteopontin modulates angiotensin II-induced fibrosis in the intact murine heart. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43(9):1698–705. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2003.11.058>
91. Ding Y, Chen J, Cui G, Wei Y, Lu C, Wang L, et al. Pathophysiological role of osteopontin and angiotensin II in atherosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;471(1):5–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.01.142>
92. Giachelli CM, Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol*. 2000;19(7):615–22. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(00\)00108-6](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(00)00108-6)
93. Villalobos LA, San Hipólito-Luengo Á, Ramos-González M, Cercas E, Vallejo S, Romero A, et al. The angiotensin-(1-7)/Mas axis counteracts angiotensin II-dependent and -independent pro-inflammatory signaling in human vascular smooth muscle cells. *Front Pharmacol*. 2016;7:482. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00482>
94. Zhang F, Ren J, Chan K, Chen H. Angiotensin-(1-7) regulates angiotensin II-induced VCAM-1 expression on vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;430(2):642–6. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.11.098>

95. Yang J, Sun Y, Dong M, Yang X, Meng X, Niu R, et al. Comparison of angiotensin-(1-7), losartan and their combination on atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E knockout mice. *Atherosclerosis*. 2015;240(2):544–9. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.02.055>
96. Zhang YH, Zhang YH, Dong XF, Hao QQ, Zhou XM, Yu QT, et al. ACE2 and Ang-(1-7) protect endothelial cell function and prevent early atherosclerosis by inhibiting inflammatory response. *Inflamm Res*. 2015;64(3-4):253–60. <https://doi.org/10.1007/s00011-015-0805-1>
97. Santos SHS, Braga JF, Mario EG, Pôrto LC, Rodrigues-Machado Mda G, Murari A, et al. Improved lipid and glucose metabolism in transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1-7). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(5):953–61. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.200493>
98. Mehta JK, Kaur G, Buttar HS, Bagabir HA, Bagabir RA, Bagabir SA, et al. Role of the renin-angiotensin system in the pathophysiology of coronary heart disease and heart failure: diagnostic biomarkers and therapy with drugs and natural products. *Front Physiol*. 2023;14:1034170. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1034170>
99. Constans J, Conri C. Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease. *Clin Chim Acta*. 2006;368(1-2):33–47. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.12.030>
100. Nozaki T, Sugiyama S, Koga H, Sugamura K, Ohba K, Matsuzawa Y, et al. Significance of a multiple biomarkers strategy including endothelial dysfunction to improve risk stratification for cardiovascular events in patients at high risk for coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(7):601–8. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.05.022>
101. Walczak M, Suraj J, Kus K, Kij A, Zakrzewska A, Chlopicki S. Towards a comprehensive endothelial biomarkers profiling and endothelium-guided pharmacotherapy. *Pharmacol Rep*. 2015;67(4):771–7. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.06.008>
102. Alexandru N, Badila E, Weiss E, Cochior D, Stępień E, Georgescu A. Vascular complications in diabetes: microparticles and microparticle associated microRNAs as active players. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;472(1):1–10. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.02.038>
103. Santilli F, Marchisio M, Lanuti P, Boccattonda A, Miscia S, Davì G. Microparticles as new markers of cardiovascular risk in diabetes and beyond. *Thromb Haemost*. 2016;116(2):220–34. <https://doi.org/10.1160/TH16-03-0176>
104. Amabile N, Cheng S, Renard JM, Larson MG, Ghorbani A, McCabe E, et al. Association of circulating endothelial microparticles with cardiometabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Eur Heart J*. 2014;35(42):2972–9. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu153>
105. Chen Y, Feng B, Li X, Ni Y, Luo Y. Plasma endothelial microparticles and their correlation with the presence of hypertension and arterial stiffness in patients with type 2 diabetes. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2012;14(7):455–60. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1716.2012.00631.x>
106. Hu Y, Li W, Cheng X, Yang H, She ZG, Cai J, et al. Emerging roles and therapeutic applications of arachidonic acid pathways in cardiometabolic diseases. *Circ Res*. 2024;135(1):e1–e20. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.124.324383>
107. Nelson JR, Raskin S. The eicosapentaenoic acid:arachidonic acid ratio and its clinical utility in cardiovascular disease. *Postgrad Med*. 2019;131(4):268–77. <https://doi.org/10.1080/00325481.2019.1607414>
108. Młynarska E, Bojdo K, Frankenstein H, Krawiranda K, Kustosik N, Lisińska W, et al. Endothelial dysfunction as the common pathway linking obesity, hypertension and

- atherosclerosis. *Int J Mol Sci.* 2025;26(20):10096. <https://doi.org/10.3390/ijms262010096>
109. Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(6 Suppl):1505S–19S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.6.1505S>
 110. Wang B, Wu L, Chen J, Dong L, Chen C, Wen Z, et al. Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):94. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00443-w>
 111. Zhou Y, Khan H, Xiao J, Cheang WS. Effects of arachidonic acid metabolites on cardiovascular health and disease. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21):12029. <https://doi.org/10.3390/ijms222112029>
 112. Tallima H, El Ridi R. Arachidonic acid: physiological roles and potential health benefits – a review. *J Adv Res.* 2018;11:33–41. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.11.004>
 113. Mitchell JA, Kirkby NS, Ahmetaj-Shala B, Armstrong PC, Crescente M, Ferreira P, et al. Cyclooxygenases and the cardiovascular system. *Pharmacol Ther.* 2021;217:107624. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107624>
 114. Lipsky PE, Brooks P, Crofford LJ, DuBois R, Graham D, Simon LS, et al. Unresolved issues in the role of cyclooxygenase-2 in normal physiologic processes and disease. *Arch Intern Med.* 2000;160(7):913–20. <https://doi.org/10.1001/archinte.160.7.913>
 115. Stemme V, Swedenborg J, Claesson HE, Hansson GK. Expression of cyclo-oxygenase-2 in human atherosclerotic carotid arteries. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2000;20(2):146–52. <https://doi.org/10.1053/ejvs.2000.1145>
 116. Beloui O, Páramo JA, Orbe J, Benito A, Colina I, Monasterio A, et al. Monocyte cyclooxygenase-2 overactivity: a new marker of subclinical atherosclerosis in asymptomatic subjects with cardiovascular risk factors? *Eur Heart J.* 2005;26(2):153–8. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehi016>
 117. Hanna VS, Hafez EAA. Synopsis of arachidonic acid metabolism: a review. *J Adv Res.* 2018;11:23–32. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.03.005>
 118. Sonnweber T, Pizzini A, Nairz M, Weiss G, Tancevski I. Arachidonic acid metabolites in cardiovascular and metabolic diseases. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11):3285. <https://doi.org/10.3390/ijms19113285>
 119. Wan M, Tang X, Stsiapanava A, Haeggström JZ. Biosynthesis of leukotriene B4. *Semin Immunol.* 2017;33:3–15. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.07.012>
 120. Friedrich EB, Tager AM, Liu E, Pettersson A, Owman C, Munn L, et al. Mechanisms of leukotriene B4-triggered monocyte adhesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(10):1761–7. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000092941.77774.3C>
 121. Van Den Borne P, van der Laan SW, Bovens SM, Koole D, Kowala MC, Michael LF, et al. Leukotriene B4 levels in human atherosclerotic plaques and abdominal aortic aneurysms. *PLoS One.* 2014;9(1):e86522. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086522>
 122. Filgueiras LR, Serezani CH, Jancar S. Leukotriene B4 as a potential therapeutic target for the treatment of metabolic disorders. *Front Immunol.* 2015;6:515. <https://doi.org/10.3389/fim mu.2015.00515>
 123. Imig JD. Epoxyeicosatrienoic acids and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid on endothelial and vascular function. In: *Adv Pharmacol.* 2016;77:105–41. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2016.04.003>
 124. Fan F, Roman RJ. Effect of cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in nephrology. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(10):2845–55. <https://doi.org/10.1681/ASN.2017030252>

125. Wu CC, Gupta T, Garcia V, Ding Y, Schwartzman ML. 20-HETE and blood pressure regulation: clinical implications. *Cardiol Rev*. 2014;22(1):1–12. <https://doi.org/10.1097/CRD.0b013e3182961659>
126. Chen L, Joseph G, Zhang FF, Nguyen H, Jiang H, Gotlinger KH, et al. 20-HETE contributes to ischemia-induced angiogenesis. *Vascul Pharmacol*. 2016;83:57–65. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2016.04.002>
127. Tunaru S, Bonnavion R, Brandenburger I, Preussner J, Thomas D, Scholich K, et al. 20-HETE promotes glucose-stimulated insulin secretion in an autocrine manner through FFAR1. *Nat Commun*. 2018;9(1):177. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02539-4>
128. Zhang C, Booz GW, Yu Q, He X, Wang S, Fan F. Conflicting roles of 20-HETE in hypertension and renal end organ damage. *Eur J Pharmacol*. 2018;833:190–200. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.06.010>
129. Rocic P, Schwartzman ML. 20-HETE in the regulation of vascular and cardiac function. *Pharmacol Ther*. 2018;192:74–87. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.07.004>
130. Ishizuka T, Cheng J, Singh H, Vitto MD, Manthathi VL, Falck JR, et al. 20-Hydroxy-eicosatetraenoic acid stimulates nuclear factor- κ B activation and the production of inflammatory cytokines in human endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;324(1):103–10. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.130336>
131. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 2017;2:17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
132. Cheng J, Ou JS, Singh H, Falck JR, Narsimhaswamy D, Pritchard KA Jr, et al. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid causes endothelial dysfunction via eNOS uncoupling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294(2):H1018–H26. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01172.2007>
133. Medhora M, Chen Y, Gruenloh S, Harland D, Bodiga S, Zielonka J, et al. 20-HETE increases superoxide production and activates NADPH oxidase in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;294(5):L902–L11. <https://doi.org/10.1152/ajplun g.00278.2007>
134. Pascale JV, Wolf A, Kadish Y, Diegisser D, Kulapathazhe MM, Yemane D, et al. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE): bioactions, receptors, vascular function, cardiometabolic disease and beyond. In: *Adv Pharmacol*. 2023;97:229–55. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2023.01.002>
135. Zeng Q, Han Y, Bao Y, Li W, Li X, Shen X, et al. 20-HETE increases NADPH oxidase-derived ROS production and stimulates the L-type Ca²⁺ channel via a PKC-dependent mechanism in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299(4):H1109–H17. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00067.2010>
136. Imig JD. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid and angiotensin: a positive feedback system to cause hypertension. *Hypertension*. 2010;56(5):822–3. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.156174>
137. Cheng J, Garcia V, Ding Y, Wu CC, Thakar K, Falck JR, et al. Induction of angiotensin-converting enzyme and activation of the renin-angiotensin system contribute to 20-hydroxyeicosatetraenoic acid-mediated endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(8):1917–24. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.248344>
138. Houeiss P, Njeim R, Tamim H, Hamdy AF, Azar TS, Azar WS, et al. Urinary 20-HETE: a prospective non-invasive prognostic and diagnostic marker for diabetic kidney disease. *J Adv Res*. 2023;44:109–17. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2022.04.013>

139. Alexanian A, Sorokin A. Targeting 20-HETE producing enzymes in cancer: rationale, pharmacology, and clinical potential. *Onco Targets Ther.* 2013;6:243–55. <https://doi.org/10.2147/OTT.S31586>
140. Schuck RN, Theken KN, Edin ML, Caughey M, Bass A, Ellis K, et al. Cytochrome P450-derived eicosanoids and vascular dysfunction in coronary artery disease patients. *Atherosclerosis.* 2013;227(2):442–8. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.01.034>
141. Wu CC, Schwartzman ML. The role of 20-HETE in androgen-mediated hypertension. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2011;96(1-4):45–53. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2011.06.006>
142. Hirani V, Yarovoy A, Kozeska A, Magnusson RP, Lasker JM. Expression of CYP4F2 in human liver and kidney: assessment using targeted peptide antibodies. *Arch Biochem Biophys.* 2008;478(1):59–68. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.06.025>
143. Turner RM, Park BK, Pirmohamed M. Parsing interindividual drug variability: an emerging role for systems pharmacology. *WIREs Syst Biol Med.* 2015;7(4):221–41. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1302>
144. Goh LL, Lim CW, Sim WC, Toh LX, Leong KP. Analysis of genetic variation in CYP450 genes for clinical implementation. *PLoS One.* 2017;12(1):e0169233. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169233>
145. Czekaj P, Skowronek R. Transcription factors potentially involved in regulation of cytochrome P450 gene expression. In: *Cytochrome P450*. Rijeka: IntechOpen; Topics on Drug Metabolism, Dr. James Paxton (Ed.); 2012.
146. de Jong LM, Jiskoot W, Swen JJ, Manson ML. Distinct effects of inflammation on cytochrome P450 regulation and drug metabolism: lessons from experimental models and a potential role for pharmacogenetics. *Genes (Basel).* 2020;11(12):1509. <https://doi.org/10.3390/genes11121509>
147. Shah RR, Smith RL. Inflammation-induced phenocconversion of polymorphic drug metabolizing enzymes: hypothesis with implications for personalized medicine. *Drug Metab Dispos.* 2015;43(3):400–10. <https://doi.org/10.1124/dmd.114.061093>
148. Ogbu OO, Chaturvedi RR, Chahal JS. Drugs and Devices. In: Camm AJ, Lüscher TF, Serruys PW, editors. *The ESC Textbook of Cardiovascular Medicine*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press; 2009.
149. Danese E, Raimondi S, Montagnana M, Tagetti A, Langaee T, Borgiani P, et al. Effect of CYP4F2, VKORC1, and CYP2C9 in influencing coumarin dose: a single-patient data meta-analysis in more than 15,000 individuals. *Clin Pharmacol Ther.* 2019;105(6):1477–91. <https://doi.org/10.1002/cpt.1323>
150. Stec DE, Roman RJ, Flasch A, Rieder MJ. Functional polymorphism in human CYP4F2 decreases 20-HETE production. *Physiol Genomics.* 2007;30(1):74–81. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00003.2007>
151. Zhang T, Yu K, Li X. Cytochrome P450 family 4 subfamily F member 2 (CYP4F2) rs1558139, rs2108622 polymorphisms and susceptibility to several cardiovascular and cerebrovascular diseases. *BMC Cardiovasc Disord.* 2018;18(1):63. <https://doi.org/10.1186/s12872-018-0763-y>
152. Nie S, Chen K, Guo C, Pei Q, Zou C, Yao L, et al. Effect of CYP4F2 polymorphisms on ticagrelor pharmacokinetics in healthy Chinese volunteers. *Front Pharmacol.* 2022;12:797278. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.797278>
153. Tatarunas V, Kupstyte-Kristapone N, Norvilaite R, Tamakauskas V, Skipskis V, Audrone V, et al. The impact of CYP2C19 and CYP4F2 variants and clinical factors on

- treatment outcomes during antiplatelet therapy. *Pharmacogenomics*. 2019;20(7):483–92. <https://doi.org/10.2217/pgs-2018-0178>
154. Gecys D, Tatarunas V, Veikutienė A, Lesauskaitė V. New potential modulators of CYP4F2 enzyme activity in angina pectoris: hsa-miR-24-3p and hsa-miR-34a-5p. *Biomarkers*. 2020;25(1):40–7. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2019.1690580>
 155. Said S, Hernandez GT. The link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *J Nephropathol*. 2014;3(3):99–104. <https://doi.org/10.12860/jnp.2014.19>
 156. Krishnan S, Suarez-Martinez AD, Bagher P, Gonzalez A, Liu R, Murfee WL, et al. Microvascular dysfunction and kidney disease: challenges and opportunities? *Microcirculation*. 2021;28(3):e12661. <https://doi.org/10.1111/micc.12661>
 157. Cepoi MR, Duca ST, Chetran A, Costache AD, Spiridon MR, Afrăsănie I, et al. Chronic kidney disease associated with ischemic heart disease: to what extent do biomarkers help? *Life (Basel)*. 2024;14(1):34. <https://doi.org/10.3390/life14010034>
 158. Sarnak MJ, Amann K, Bangalore S, Cavalcante JL, Charytan DM, Craig JC, et al. Chronic kidney disease and coronary artery disease: JACC state-of-the-art review. *J Am Coll Cardiol*. 2019;74(14):1823–38. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.08.1017>
 159. Sharma N, Anders HJ, Gaikwad AB. Fiend and friend in the renin angiotensin system: an insight on acute kidney injury. *Biomed Pharmacother*. 2019;110:764–74. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.018>
 160. Georgianos PI, Agarwal R. Revisiting RAAS blockade in CKD with newer potassium-binding drugs. *Kidney Int*. 2018;93(2):325–34. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.08.038>
 161. Liu Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(2):212–22. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008121226>
 162. Alshahrani S. Renin-angiotensin-aldosterone pathway modulators in chronic kidney disease: a comparative review. *Front Pharmacol*. 2023;14:1101068. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1101068>
 163. Baaten CCFMJ, Vondenhoff S, Noels H. Endothelial cell dysfunction and increased cardiovascular risk in patients with chronic kidney disease. *Circ Res*. 2024;134(8):1098–116. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.123.321752>
 164. Annuk M, Lind L, Linde T, Fellström B. Impaired endothelium-dependent vasodilation in renal failure in humans. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16(2):302–6. <https://doi.org/10.1093/ndt/16.2.302>
 165. Yilmaz MI, Stenvinkel P, Sonmez A, Saglam M, Yaman H, Kilic S, et al. Vascular health, systemic inflammation and progressive reduction in kidney function: clinical determinants and impact on cardiovascular outcomes. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(11):3537–43. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr081>
 166. Harlacher E, Wollenhaupt J, Baaten CCFMJ, Noels H. Impact of uremic toxins on endothelial dysfunction in chronic kidney disease: a systematic review. *Int J Mol Sci*. 2022;23(1):531. <https://doi.org/10.3390/ijms23010531>
 167. Rong R, Hu G, Wang W, Muroya Y, Miura T, Ogawa Y, et al. Angiotensin II upregulates CYP4A isoform expression in the rat kidney through angiotensin II type 1 receptor. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2018;139:80–6. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2018.09.003>
 168. Fan F, Ge Y, Lv W, Elliott MR, Muroya Y, Hirata T, et al. Molecular mechanisms and cell signaling of 20-hydroxyecosatetraenoic acid in vascular pathophysiology. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2016;21:1427–63. <https://doi.org/10.2741/4465>

169. Lukaszewicz KM, Lombard JH. Role of the CYP4A/20-HETE pathway in vascular dysfunction of the Dahl salt-sensitive rat. *Clin Sci (Lond)*. 2013;124(12):695–700. <https://doi.org/10.1042/CS20120483>
170. Han J, Li J, Liu L, Li K, Zhang C, Han Y. 20-HETE mediates Ang II-induced cardiac hypertrophy via ROS and Ca²⁺ signaling in H9c2 cells. *Sci Rep*. 2025;15(1):2342. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-85992-2>
171. Su JB. Role of bradykinin in the regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by cardiovascular drugs. *Curr Pharm Des*. 2017;23(40):6215–22. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170622112253>
172. Schoolwerth AC, Sica DA, Ballermann BJ, Wilcox CS. Renal considerations in angiotensin converting enzyme inhibitor therapy: a statement for healthcare professionals from the Council on the Kidney in Cardiovascular Disease and the Council for High Blood Pressure Research of the American Heart Association. *Circulation*. 2001;104(16):1985–91. <https://doi.org/10.1161/hc4101.096153>
173. Kobori H, Mori H, Masaki T, Nishiyama A. Angiotensin II blockade and renal protection. *Curr Pharm Des*. 2013;19(17):3033–42. <https://doi.org/10.2174/1381612811319170009>
174. Stoiljkovic M, Jakovljevic V, Milosavljevic J, Bolevich S, Jeremic N, Canovic P, et al. Cardioprotective role of captopril: from basic to applied investigations. *Int J Mol Sci*. 2025;26(15):7215. <https://doi.org/10.3390/ijms26157215>
175. Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V, Rodriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, et al. Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(1):16–20. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfi265>
176. Asaba K, Tojo A, Onozato ML, Goto A, Quinn MT, Fujita T, et al. Effects of NADPH oxidase inhibitor in diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2005;67(5):1890–8. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00287.x>
177. Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD; The Collaborative Study Group. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. *N Engl J Med*. 1993;329(20):1456–62. <https://doi.org/10.1056/NEJM199311113292004>
178. Álvarez Y, Pérez-Girón JV, Hernanz R, Briones AM, García-Redondo AB, Beltrán A, et al. Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007; 321(1):381–8. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.115287>
179. Al-Majed ARA, Assiri E, Khalil NY, Abdel-Aziz HA. Losartan: comprehensive profile. In: *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol*. 2015;40:159–94. <https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2015.02.003>
180. Sachinidis A, Ko Y, Weisser P, Meyer zu Brickwedde MK, Düsing R, Christian R, et al. EXP3174, a metabolite of losartan (MK 954, DuP 753), is more potent than losartan in blocking the angiotensin II-induced responses in vascular smooth muscle cells. *J Hypertens*. 1993;11(2):155–62. <https://doi.org/10.1097/00004872-199302000-00007>
181. Wolff ML, Cruz JL, Vanderman AJ, Brown JN. The effect of angiotensin II receptor blockers on hyperuricemia. *Ther Adv Chronic Dis*. 2015;6(6):339–46. <https://doi.org/10.1177/2040622315596119>
182. Praga M, Fernández-Andrade C, Luño J, Arias M, Poveda R, Mora J, et al. Antiproteinuric efficacy of losartan in comparison with amlodipine in non-diabetic proteinuric renal diseases: a double-blind, randomized clinical trial. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18(9):1806–13. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfg284>

183. Zou J, Zhou X, Ma Y, Yu R. Losartan ameliorates renal interstitial fibrosis through metabolic pathway and Smurfs-TGF- β /Smad. *Biomed Pharmacother.* 2022;149: 112931. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112931>
184. Sharma G, Song LF, Merz KM. Effect of an inhibitor on the ACE2-receptor-binding domain of SARS-CoV-2. *J Chem Inf Model.* 2022;62(24):6574–85. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c01283>
185. Soler MJ, Wysocki J, Ye M, Lloveras J, Kanwar Y, Batlle D. ACE2 inhibition worsens glomerular injury in association with increased ACE expression in streptozotocin-induced diabetic mice. *Kidney Int.* 2007;72(5):614–23. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002373>
186. Hoopes SL, Garcia V, Edin ML, Schwartzman ML, Zeldin DC. Vascular actions of 20-HETE. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2015;120:9–16. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2015.03.002>
187. Cheng MK, McGiff JC, Carroll MA. Renal arterial 20-hydroxyeicosatetraenoic acid levels: regulation by cyclooxygenase. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;284(3):F474–F9. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00239.2002>
188. Cheng J, Wu CC, Gotlinger KH, Zhang F, Falck JR, Narsimhaswamy D, et al. 20-Hydroxy-5,8,11,14-eicosatetraenoic acid mediates endothelial dysfunction via I κ B kinase-dependent endothelial nitric-oxide synthase uncoupling. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;332(1):57–65. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.159863>
189. Ge Y, Murphy SR, Fan F, Williams JM, Falck JR, Liu R, et al. Role of 20-HETE in the impaired myogenic and TGF responses of the Af-Art of Dahl salt-sensitive rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014;307(5):F509–F15. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00273.2014>
190. Garcia V, Gilani A, Shkolnik B, Pandey V, Zhang FF, Dakarapu R, et al. 20-HETE signals through G-protein-coupled receptor GPR75 (Gq) to affect vascular function and trigger hypertension. *Circ Res.* 2017;120(11):1776–88. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.310525>
191. Froogh G, Garcia V, Laniado Schwartzman M. The CYP/20-HETE/GPR75 axis in hypertension. In: *Adv Pharmacol.* 2022;94:1–25. <https://doi.org/10.1016/BS.APHA.2022.02.003>
192. Fan F, Roman RJ. GPR75 identified as the first 20-HETE receptor: a chemokine receptor adopted by a new family. *Circ Res.* 2017;120(11):1696–8. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311022>
193. Tunaru S, Chennupati R, Nüsing RM, Offermanns S. Arachidonic acid metabolite 19(S)-HETE induces vasorelaxation and platelet inhibition by activating prostacyclin (IP) receptor. *PLoS One.* 2016;11(9):e0163633. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163633>
194. Dakarapu R, Errabelli R, Manthathi VL, Adebessin AM, Barma DK, Barma D, et al. 19-Hydroxyeicosatetraenoic acid analogs: antagonism of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid-induced vascular sensitization and hypertension. *Bioorg Med Chem Lett.* 2019;29(19): 126616. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.08.020>
195. Pascale JV, Park EJ, Adebessin AM, Falck JR, Schwartzman ML, Garcia V. Uncovering the signalling, structure and function of the 20-HETE-GPR75 pairing: identifying the chemokine CCL5 as a negative regulator of GPR75. *Br J Pharmacol.* 2021;178(18): 3813–28. <https://doi.org/10.1111/bph.15525>
196. Sutton JT, Haworth KJ, Pyne-Geithman G, Holland CK. Ultrasound-mediated drug delivery for cardiovascular disease. *Expert Opin Drug Deliv.* 2013;10(5):573–92. <https://doi.org/10.1517/17425247.2013.772578>

197. Deprez J, Lajoinie G, Engelen Y, De Smedt SC, Lentacker I. Opening doors with ultrasound and microbubbles: beating biological barriers to promote drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2021;172:9–36. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.02.015>
198. Uddin SMZ, Komatsu DE, Motyka T, Petterson S. Low-intensity continuous ultrasound therapies – a systematic review of current state-of-the-art and future perspectives. *J Clin Med.* 2021;10(12):2698. <https://doi.org/10.3390/jcm10122698>
199. Miller DL, Smith NB, Bailey MR, Czarnota GJ, Hynynen K, Makin IRS. Overview of therapeutic ultrasound applications and safety considerations. *J Ultrasound Med.* 2012; 31(4):623–34. <https://doi.org/10.7863/jum.2012.31.4.623>
200. Tao W, Lai Y, Zhou X, Yang G, Wu P, Yuan L. A narrative review: ultrasound-assisted drug delivery: improving treatments via multiple mechanisms. *Ultrasonics.* 2025; 151:107611. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2025.107611>
201. Karthikesh MS, Yang X. The effect of ultrasound cavitation on endothelial cells. *Exp Biol Med (Maywood).* 2021;246(7):758–70. <https://doi.org/10.1177/1535370220982301>
202. Altland OD, Dalecki D, Suchkova VN, Francis CW. Low-intensity ultrasound increases endothelial cell nitric oxide synthase activity and nitric oxide synthesis. *J Thromb Haemost.* 2004;2(4):637–43. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2004.00655.x>
203. Yang Q, Nanayakkara G, Drummer C, Sun Y, Johnson C, Cueto R, et al. Low-intensity ultrasound-induced anti-inflammatory effects are mediated by several new mechanisms including gene induction, immunosuppressor cell promotion, and enhancement of exosome biogenesis and docking. *Front Physiol.* 2017;8:818. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00818>
204. Li X, Li X, Lin J, Sun X, Ding Q. Exosomes derived from low-intensity pulsed ultrasound-treated dendritic cells suppress tumor necrosis factor-induced endothelial inflammation. *J Ultrasound Med.* 2019;38(8):2081–91. <https://doi.org/10.1002/jum.14898>
205. Yuan X, Zhao X, Wang W, Li C. Mechanosensing by Piezo1 and its implications in the kidney. *Acta Physiol (Oxf).* 2024;240(6):e14152. <https://doi.org/10.1111/apha.14152>
206. Jiang X, Savchenko O, Li Y, Qi S, Yang T, Zhang W, et al. A review of low-intensity pulsed ultrasound for therapeutic applications. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2019; 66(10):2704–18. <https://doi.org/10.1109/TBME.2018.2889669>
207. Kureel SK, Maroto R, Aniqua M, Powell S, Singh E, Margadant F, et al. Rejuvenation of senescent cells, in vitro and in vivo, by low-frequency ultrasound. *Aging Cell.* 2025;24(6):e70008. <https://doi.org/10.1111/accel.70008>
208. Hutcheson JD, Schlicher RK, Hicks HK, Prausnitz MR. Saving cells from ultrasound-induced apoptosis: quantification of cell death and uptake following sonication and effects of targeted calcium chelation. *Ultrasound Med Biol.* 2010;36(6):1008–21. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2010.03.011>
209. Lagneaux L, De Meulenaer EC, Delforge A, Dejeneffe M, Bernier M, Bron D. Ultrasonic low-energy treatment: a novel approach to induce apoptosis in human leukemic cells. *Exp Hematol.* 2002;30(11):1293–301. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(02\)00913-0](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(02)00913-0)
210. Li K, Tan L, Zhou JH. HPLC determination of captopril in human plasma and its pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr.* 1996;10(5):237–9. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0801\(199609\)10:5<237::AID-BMC593>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0801(199609)10:5<237::AID-BMC593>3.0.CO;2-X)
211. Shaw TRD, Duncan FM, Williams BC, Crichton E, Thomson SA, Davis JRE, et al. Plasma free captopril concentrations during short and long term treatment with oral captopril for heart failure. *Br Heart J.* 1985;54(2):160–5. <https://doi.org/10.1136/hrt.54.2.160>

212. Goswami D, Kumar A, Verma PRP, Thareja S, Iyer SS, Khuroo AH. Pharmacokinetic estimation of losartan, losartan carboxylic acid and hydrochlorothiazide in human plasma by LC/MS/MS validated method. *Clin Res Regul Aff*. 2008;25(4):235–58. <https://doi.org/10.1080/10601330802600901>
213. Bienert A, Brzeziński R, Szałek E, Książek M, Sobiak J, Ruchała M, et al. Bioequivalence study of two losartan formulations administered orally in healthy male volunteers. *Arzneimittelforschung*. 2006;56(11):723–8. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1296781>
214. Wang L, Wu Q, Yao X, Ge H, Zhu Y, Chen K, et al. Discovery of potential small molecular SARS-CoV-2 entry blockers targeting the spike protein. *Acta Pharmacol Sin*. 2022;43(4):788–96. <https://doi.org/10.1038/s41401-021-00735-z>
215. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell viability assays. In: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, Auld D, Austin C, et al., editors. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004–2016.
216. Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res*. 2007;100(6):782–94. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000259593.07661.1e>
217. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*. 2007;2(2):329–33. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>
218. Kemfack AM, Hernandez-Morato I, Moayed Y, Pitman MJ. An optimized method for high-quality RNA extraction from distinctive intrinsic laryngeal muscles in the rat model. *Sci Rep*. 2022;12(1):21665. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25643-y>
219. Bustin SA. Improving the quality of quantitative polymerase chain reaction experiments: 15 years of MIQE. *Mol Aspects Med*. 2024;96:101249. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2024.101249>
220. Bustin SA, Ruijter JM, van den Hoff MJB, Kubista M, Pfaffl MW, Shipley GL, et al. MIQE 2.0: revision of the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments guidelines. *Clin Chem*. 2025;71(6):634–51. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaf043>
221. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*. 2013; 3(3):71–85.
222. Vrints C, Knuuti J, Saraste A, Kelm M, Kunadian V, van Royen N, et al. 2024 ESC Guidelines for the management of chronic coronary syndromes. *Eur Heart J*. 2024; 45(36):3415–537. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehae177>
223. Narula J, Chandrashekar Y, Ahmadi A, Abbata S, Berman DS, Blankstein R, et al. SCCT 2021 expert consensus document on coronary computed tomographic angiography: a report of the Society of Cardiovascular Computed Tomography. *J Cardiovasc Comput Tomogr*. 2021;15(3):192–217. <https://doi.org/10.1016/j.jcct.2020.11.001>
224. Collet JP, Thiele H, Barbato E, Barthélémy O, Bauersachs J, Bhatt DL, et al. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J*. 2021;42(14):1289–367. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa575>
225. Byrne RA, Rossello X, Coughlan JJ, Barbato E, Berry C, Chieffo A, et al. 2023 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes. *Eur Heart J*. 2023; 44(38):3720–826. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehad191>

226. Čiapienė I, Tatarūnas V, Giedraitienė A, Zvikas V, Jakštas V, Veikutienė A, et al. The effect of rivaroxaban on CYP4F2 and transcription factors' activity in HUVECs. *Appl Sci (Basel)*. 2021;11(22):10851. <https://doi.org/10.3390/app112210851>
227. Meškauskaitė U, Andruskevičiūtė S, Čiapienė I, Giedraitienė A, Lesauskaitė V, Tatarūnas V. Pleiotropic effects of ticagrelor: influence on CYP4F2 gene and protein expression in HUVEC and HepG2, and *Escherichia coli* bacterial survival. *Drug Des Devel Ther*. 2022;16:2559–68. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S357985>
228. Čiapienė I, Vėžys V, Tatarūnas V, Giedraitienė A, Lesauskaitė V, et al. Synergistic effects of low-frequency ultrasound and therapeutic agents on endothelial and renal cells: emphasis on cell functionality, oxidative stress, and inflammatory markers. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2025;18(3):404. <https://doi.org/10.3390/ph18030404>
229. Campo G, Viecei Dalla Sega F, Pavasini R, Aquila G, Gallo F, Fortini F, et al. Biological effects of ticagrelor over clopidogrel in patients with stable coronary artery disease and chronic obstructive pulmonary disease. *Thromb Haemost*. 2017;117(6):1208–16. <https://doi.org/10.1160/TH16-12-0973>
230. Adamski P, Ostrowska M, Navarese EP, Kubica J. Overview of pleiotropic effects of platelet P2Y12 receptor inhibitors. *Thromb Haemost*. 2014;112(2):224–42. <https://doi.org/10.1160/TH13-11-0915>
231. Kubisa MJ, Jezewski MP, Gasecka A, Siller-Matula JM, Postuła M. Ticagrelor – toward more efficient platelet inhibition and beyond. *Ther Clin Risk Manag*. 2018;14:129–40. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S152369>
232. Alemayehu M, Kim RB, Lavi R, Gong I, Gros R, Cho WJ, et al. Effect of ticagrelor versus clopidogrel on vascular reactivity. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69(17):2246–8. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.02.048>
233. Bonello L, Frere C, Cointe S, Laine M, Mancini J, Thuny F, et al. Ticagrelor increases endothelial progenitor cell level compared to clopidogrel in acute coronary syndromes: a prospective randomized study. *Int J Cardiol*. 2015;187:502–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.03.414>
234. Jia Z, Huang Y, Ji X, Sun J, Fu G. Ticagrelor and clopidogrel suppress NF-κB signaling pathway to alleviate LPS-induced dysfunction in vein endothelial cells. *BMC Cardiovasc Disord*. 2019;19(1):318. <https://doi.org/10.1186/s12872-019-01287-1>
235. Viecei Dalla Sega F, Fortini F, Aquila G, Campo G, Vaccarezza M, Rizzo P. Ticagrelor improves endothelial function by decreasing circulating epidermal growth factor (EGF). *Front Physiol*. 2018;9:337. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00337>
236. Ancion A, Tridetti J, Nguyen Trung ML, Oury C, Lancellotti P. A review of the role of bradykinin and nitric oxide in the cardioprotective action of angiotensin-converting enzyme inhibitors: focus on perindopril. *Cardiol Ther*. 2019;8(2):179–91. <https://doi.org/10.1007/s40119-019-00150-w>
237. Hamdi HK, Castellon R. ACE inhibition actively promotes cell survival by altering gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;310(4):1227–35. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.149>
238. Yu W, Akishita M, Xi H, Nagai K, Sudoh N, Hasegawa H, et al. Angiotensin converting enzyme inhibitor attenuates oxidative stress-induced endothelial cell apoptosis via p38 MAP kinase inhibition. *Clin Chim Acta*. 2006;364(1-2):328–34. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.07.021>
239. Watanabe T, Suzuki J, Yamawaki H, Sharma VK, Sheu SS, Berk BC. Losartan metabolite EXP3179 activates Akt and endothelial nitric oxide synthase via vascular endothelial growth factor receptor-2 in endothelial cells: angiotensin II type 1 receptor-

- independent effects of EXP3179. *Circulation*. 2005;112(12):1798–805. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATION.AHA.104.509760>
240. Radenković M, Stojanović M, Nešić IM, Prostran M. Angiotensin receptor blockers and endothelial dysfunction: possible correlation and therapeutic implications. *Indian J Med Res*. 2016;144(2):154–68. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.195022>
 241. Van Belle E, Rivard A, Chen D, Silver M, Bunting S, Ferrara N, et al. ACE inhibition accelerates endothelial regrowth in vivo: a possible explanation for the benefit observed with ACE inhibitors following arterial injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;231(3):577–81. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6061>
 242. Momose N, Fukuo K, Morimoto S, Ogihara T. Captopril inhibits endothelin-1 secretion from endothelial cells through bradykinin. *Hypertension*. 1993;21(6 Pt 2):921–4. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.21.6.921>
 243. Wenzel P, Schuhmacher S, Kienhöfer J, Müller J, Hortmann M, Oelze M, et al. AT1-receptor blockade by telmisartan upregulates GTP-cyclohydrolase I and protects eNOS in diabetic rats. *Free Radic Biol Med*. 2008;45(5):619–26. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.009>
 244. Liu H, Mauci G, Zhang X, Yao J, Liu B, Jiao X, et al. Protective mechanisms of the angiotensin II type 1 receptor blocker candesartan against cerebral ischemia: in-vivo and in-vitro studies. *J Hypertens*. 2008;26(7):1435–45. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e3282ff5d52>
 245. Eljovich F, Laffer CL. Detrimental effects of dual ACEI-ARB therapy: is the (pro)renin receptor the culprit? *Kidney Int*. 2011;80(9):911–4. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.264>
 246. van der Giet M, Erinola M, Zidek W, Tepel M. Captopril and quinapril reduce reactive oxygen species. *Eur J Clin Invest*. 2002;32(10):732–7. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.2002.01064.x>
 247. Miguel-Carrasco JL, Zambrano S, Blanca AJ, Mate A, Vázquez CM. Captopril reduces cardiac inflammatory markers in spontaneously hypertensive rats by inactivation of NF-κB. *J Inflamm (Lond)*. 2010;7:21. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-7-21>
 248. Pialoux V, Foster GE, Ahmed SB, Beaudin AE, Hanly PJ, Poulin MJ. Losartan abolishes oxidative stress induced by intermittent hypoxia in humans. *J Physiol*. 2011;589(Pt 22):5529–37. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.218156>
 249. Raei M, Ahmadi M, Abrotan S, Razavi A, Hedayatzadeh-Omran A, Shamshirian A, et al. Effect of losartan on cell proliferation and reactive oxygen species scavenging in gastric cancer cell lines. *Eurasian J Med Oncol*. 2024;8(2):135–40. <https://doi.org/10.14744/ejmo.2024.61923>
 250. Kluknavsky M, Micurova A, Cebova M, Šaman E, Cacanyiova S, Bernatova I. MLN-4760 induces oxidative stress without blood pressure and behavioural alterations in SHR: roles of Nfe2l2 gene, nitric oxide and hydrogen sulfide. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(12):2385. <https://doi.org/10.3390/antiox11122385>
 251. Melchinger I, Guo K, Li X, Guo J, Cantley LG, Xu L. VCAM-1 mediates proximal tubule-immune cell cross talk in failed tubule recovery during AKI-to-CKD transition. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2024;327(4):F610–F22. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00076.2024>
 252. Manucha W, Oliveros L, Carrizo L, Seltzer A, Vallés P. Losartan modulation on NOS isoforms and COX-2 expression in early renal fibrogenesis in unilateral obstruction. *Kidney Int*. 2004;65(6):2091–107. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00643.x>
 253. Williams J. Enzyme inhibition and induction. *Anaesth Intensive Care Med*. 2008;9(4):165–6. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2008.02.004>

254. Mitragotri S. Healing sound: the use of ultrasound in drug delivery and other therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(3):255–60. <https://doi.org/10.1038/nrd1662>
255. Liang HD, Tang J, Halliwell M. Sonoporation, drug delivery, and gene therapy. *Proc Inst Mech Eng H.* 2010;224(2):343–61. <https://doi.org/10.1243/09544119JEIM565>
256. Bernasconi R, Nyström A. Balance and circumstance: the renin angiotensin system in wound healing and fibrosis. *Cell Signal.* 2018;51:34–46. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.07.011>
257. Chen L, Zheng Q, Chen X, Wang J, Wang L. Low frequency ultrasound enhances vascular endothelial growth factor expression, thereby promoting the wound healing in diabetic rats. *Exp Ther Med.* 2019;18(5):4040–8. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.8051>
258. Han Y, Yu X, Marfavi Z, Chen Y, Zhang L, Chu J, et al. A perspective on ultrasound-triggered production of reactive oxygen species by inorganic nano/microparticles. *Adv NanoBiomed Res.* 2024;4(9):2400060. <https://doi.org/10.1002/anbr.202400060>
259. Memari E, Singh D, Alkins R, Helfield B. Shear stress and microbubble-mediated modulation of endothelial cell immunobiology. *Small Sci.* 2025;5(4):2400489. <https://doi.org/10.1002/sssc.202400489>
260. Trask AJ, Groban L, Westwood BM, Varagic J, Ganten D, Gallagher PE, et al. Inhibition of angiotensin-converting enzyme 2 exacerbates cardiac hypertrophy and fibrosis in Ren-2 hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 2010;23(6):687–93. <https://doi.org/10.1038/ajh.2010.51>
261. Guo AM, Arbab AS, Falck JR, Chen P, Edwards PA, Roman RJ, et al. Activation of vascular endothelial growth factor through reactive oxygen species mediates 20-hydroxyeicosatetraenoic acid-induced endothelial cell proliferation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;321(1):18–27. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.115360>
262. Lakhkar A, Dhagia V, Joshi SR, Gotlinger K, Patel D, Sun D, et al. 20-HETE-induced mitochondrial superoxide production and inflammatory phenotype in vascular smooth muscle is prevented by glucose-6-phosphate dehydrogenase inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2016;310(9):H1107–H117. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00961.2015>
263. Fragner ML, Parikh MA, Jackson KA, Laniado Schwartzman M, Frishman WH, Peterson SJ. GPR75: a newly identified receptor for targeted intervention in the treatment of obesity and metabolic syndrome. *Cardiol Rev.* 2024;32(4):219–26. <https://doi.org/10.1097/CRD.0000000000000711>
264. Han J, Li J, Yao S, Wei Z, Jiang H, Xu T, et al. GPR75: advances, challenges in deorphanization, and potential as a novel drug target for disease treatment. *Int J Mol Sci.* 2025;26(9):4084. <https://doi.org/10.3390/ijms26094084>
265. Freedman AA, Colangelo LA, Ning H, Borrowman JD, Lewis CE, Schreiner PJ, et al. Sex differences in age of onset of premature cardiovascular disease and subtypes: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study. *J Am Heart Assoc.* 2026;15(3):e044922. <https://doi.org/10.1161/JAHA.125.044922>
266. Cassis LA, Police SB, Yiannikouris F, Thatcher SE. Local adipose tissue renin-angiotensin system. *Curr Hypertens Rep.* 2008;10(2):93–8. <https://doi.org/10.1007/s11906-008-0019-9>
267. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105(9):1135–43. <https://doi.org/10.1161/hc0902.104353>
268. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 2000;87(5):E1–E9. <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.5.e1>

269. Santos RAS, Sampaio WO, Alzamora AC, Motta-Santos D, Alenina N, Bader M, et al. The ACE2/angiotensin-(1-7)/Mas axis of the renin-angiotensin system: focus on angiotensin-(1-7). *Physiol Rev.* 2018;98(1):505–53. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2016>
270. Dhanasekaran A, Bodiga S, Gruenloh S, Gao Y, Dunn L, Falck JR, et al. 20-HETE increases survival and decreases apoptosis in pulmonary arteries and pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;296(3):H777–H86. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01087.2008>
271. Bodiga S, Cheng J, Zhang F, Zheng J, Sun D, Falck JR, et al. 20-HETE-induced nitric oxide production in pulmonary artery endothelial cells is mediated by NADPH oxidase, H₂O₂, and PI3-kinase/Akt. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2010;298(4):L564–L74. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00298.2009>
272. Oni-Orisan A, Edin ML, Lee JA, Wells MA, Christensen ES, Vendrov KC, et al. Cytochrome P450-derived epoxyeicosatrienoic acids and coronary artery disease in humans: a targeted metabolomics study. *J Lipid Res.* 2016;57(1):109–19. <https://doi.org/10.1194/jlr.M061697>
273. Deng Y, Theken KN, Lee CR. Cytochrome P450 epoxygenases, soluble epoxide hydrolase, and the regulation of cardiovascular inflammation. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48(2):331–41. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.10.022>
274. Jamieson KL, Endo T, Darwesh AM, Samokhvalov V, Seubert JM. Cytochrome P450-derived eicosanoids and heart function. *Pharmacol Ther.* 2017;179:47–83. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.05.005>
275. Zhang C, He M, Ni L, He K, Su K, Deng Y, et al. The role of arachidonic acid metabolism in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cell Biochem Biophys.* 2020; 78(3):255–65. <https://doi.org/10.1007/s12013-020-00928-z>
276. Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, Zeiher AM, Eiserich JP, Münzel T, et al. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2003;108(12):1440–5. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000090690.67322.51>
277. Brennan ML, Penn MS, Van Lente F, Nambi V, Shishehbor MH, Aviles RJ, et al. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N Engl J Med.* 2003;349(17):1595–604. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa035003>
278. Epelman S, Shrestha K, Troughton RW, Francis GS, Sen S, Klein AL, et al. Soluble angiotensin-converting enzyme 2 in human heart failure: relation with myocardial function and clinical outcomes. *J Card Fail.* 2009;15(7):565–71. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2009.01.014>
279. Rabelo LA, Alenina N, Bader M. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis and oxidative stress in cardiovascular disease. *Hypertens Res.* 2011;34(2):154–60. <https://doi.org/10.1038/hr.2010.235>
280. Ramchand J, Patel SK, Srivastava PM, Farouque O, Burrell LM. Elevated plasma angiotensin converting enzyme 2 activity is an independent predictor of major adverse cardiac events in patients with obstructive coronary artery disease. *PLoS One.* 2018;13(6):e0198144. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198144>

PASKELBTOS PUBLIKACIJOS

Publikacijos, kuriose skelbti mokslinio darbo rezultatai

1. **Čiapienė, Ieva**; Ivanauskienė, Aistė; Kupstytė-Krištaponė, Nora; Lesauskaitė, Vaiva; Pranevičius, Robertas; Šakalytė, Gintarė; Stanislovaitienė, Daiva; Sithole, Cynthia N.; Tatarūnas, Vacis. Reduced Circulating 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid and ACE2 in Acute Coronary Syndrome with Exploratory Cell-Based Observations // *Scientific Reports*. London : Springer Nature. ISSN 2045-2322, 2026. doi: 10.1038/s41598-026-56316-9. [Citav. rodiklis: 3.9, bendr. cit. rod.: 5.844, kvartilis: Q1 (2024. InCites JCR SCIE)].
2. **Čiapienė, Ieva**; Vėžys, Joris; Lesauskaitė, Vaiva; Matulevičiūtė, Indrė; Meškauskaitė, Ugnė; Skipskis, Vilius; Strazdasas, Arvydas; Trumbekaitė, Sonata; Bubulis, Algimantas; Jūrėnas, Vytautas; Ostaševičius, Vytautas; Tamakauskas, Vytenis; Tatarūnas, Vacis. Synergistic Effects of Low-Frequency Ultrasound and Therapeutic Agents on Endothelial and Renal Cells: Emphasis on Cell Functionality, Oxidative Stress, and Inflammatory Markers // *Pharmaceuticals*. Basel, Switzerland : MDPI. ISSN 1424-8247, 2025, t. 18, nr. 3, p. 1–23. doi: 10.3390/ph18030404. [Citav. rodiklis: 4.8, bendr. cit. rod.: 4.384, kvartilis: Q1 (2024. InCites JCR SCIE)].
3. Meškauskaitė, Ugnė; Andruškevičiūtė, Silvija; **Čiapienė, Ieva**; Giedraitienė, Agnė; Lesauskaitė, Vaiva; Tatarūnas, Vacis. Pleiotropic Effects of Ticagrelor: Influence on CYP4F2 Gene and Protein Expression in HUVEC and HepG2, and Escherichia coli Bacterial Survival // *Drug Design, Development and Therapy*. Albany : Dove Medical Press LTD. ISSN 1177-8881, 2022, t. 16. doi: 10.2147/DDDT.S357985. [Citav. rodiklis: 4.8, bendr. cit. rod.: 4.5, kvartilis: Q1 (2022. InCites JCR SCIE)].
4. **Čiapienė, Ieva**; Tatarūnas, Vacis; Giedraitienė, Agnė; Žvikas, Vaidotas; Jakštas, Valdas; Veikutienė, Audronė; Meškauskaitė, Ugnė; Venckytė, Ugnė; Pukalskas, Audrius; Lesauskaitė, Vaiva. The Effect of Rivaroxaban on CYP4F2 and Transcription Factors' Activity in HUVECs // *Applied Sciences*. Basel, Switzerland : MDPI. ISSN 2076-3417, 2021, t. 11, nr. 22, p. 1–13. doi: 10.3390/app112210851. [Citav. rodiklis: 2.838, bendr. cit. rod.: 5.796, kvartilis: Q2 (2021. InCites JCR SCIE)].

Publikacijos, kurios nesusiję su mokslinio darbo tema

1. Čereškevičius, Darius; **Čiapienė, Ieva**; Aldujeli, Ali; Zabiela, Vytautas; Lesauskaitė, Vaiva; Zubielenė, Kristina; Raškevičius, Vytautas; Žalia-duonytė, Diana; Unikas, Ramūnas; Pranevičius, Robertas; Simanauskas, Ignas; Bakšytė, Giedrė; Tamošiūnas, Abdonas; Lukšienė, Dalia; Šakalytė, Gintarė; Tatarūnas, Vacis. The Impact of SNP Score on Low-Density Lipoprotein Cholesterol Concentration and Coronary Artery Disease // *International Journal of Molecular Sciences*. Basel, Switzerland : MDPI. ISSN 1422-0067, 2025, t. 26, nr. 5, p. 1–13. doi:10.3390/ijms26052337. [Citav. rodiklis: 4.9, bendr. cit. rod.: 5.946, kvartilis: Q1 (2024. InCites JCR SCIE)].
2. Rodaitė, Raminta; Kairytė, Laura; Varnagiris, Šarūnas; Giedraitienė, Agnė; Šiugždinienė, Rita; Ružauskas, Modestas; **Čiapienė, Ieva**; Tatarūnas, Vacis; Milčius, Darius. Multifunctional WO3 Nanoparticle-Coated Smart Textiles via Plasma Sputtering: Antibacterial Efficiency and Cellular Safety // *ACS Applied Nano Materials*. Washington, DC : American Chemical Society. ISSN: 2574-0970, 2025, t. 8, nr. 47, p. 22525–22539). doi:10.1021/acsanm.5c03018. [Citav. rodiklis: 5.5, bendr. cit. rod.: 7.436, kvartilis: Q2 (2024. InCites JCR SCIE)].
3. Rodaitė, Raminta; Kairytė, Laura; Giedraitienė, Agnė; Ružauskas, Modestas; Šiugždinienė, Rita; **Čiapienė, Ieva**; Tatarūnas, Vacis; Varnagiris, Šarūnas; Milčius, Darius. Towards Safe and Effective Biomedical Nanocoatings: Plasma-Sputtered Magnesium-Based Nanoparticles with Cytoprotective, Antimicrobial and Antifungal Properties // *Molecules*. Basel, Switzerland : MDPI. ISSN 1420-3049, 2025, t. 30, nr. 17, p. 1–19. doi: 10.3390/molecules30173526. [Citav. rodiklis: 4.6, bendr. cit. rod.: 5.946, kvartilis: Q2 (2024. InCites JCR SCIE)].
4. Aldujeli, Ali; Tsai, Tsung-Ying; Haq, Ayman; Tatarūnas, Vacis; Garg, Scot; Hughes, Diarmaid; **Čiapienė, Ieva**; Unikas, Ramūnas; Sharif, Faisal; Lesauskaitė, Vaiva; Onuma, Yoshinobu; Serruys, Patrick W. The Association between Trimethylamine N-Oxide Levels and Coronary Microvascular Dysfunction and Prognosis in Patients with ST-Elevation Myocardial Infarction // *Atherosclerosis*. ISSN 0021-9150, 2024, t. 398, p. 1–12. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2024. 118597. [Citav. rodiklis: 5.7, bendr. cit. rod.: 4.216, kvartilis: Q1 (2024. InCites JCR SCIE)].
5. Čereškevičius, Darius; Zabiela, Vytautas; Aldujeli, Ali; Lesauskaitė, Vaiva; Zubielenė, Kristina; Raškevičius, Vytautas; **Čiapienė, Ieva**; Žalia-duonytė, Diana; Giedraitienė, Agnė; Žvikas, Vaidotas; Jakštas, Valdas; Skipskis, Vilius; Dobilienė, Olivija; Šakalytė, Gintarė; Tatarūnas, Vacis. Impact of CYP2C19 Gene Variants on Long-Term Treatment with

- Atorvastatin in Patients with Acute Coronary Syndromes // International Journal of Molecular Sciences. Basel, Switzerland : MDPI. ISSN 1422-0067, 2024, t. 25, nr. 10, p. 1–11. doi: 10.3390/ijms25105385. [Citav. rodiklis: 4.9, bendr. cit. rod.: 5.946, kvartilis: Q1 (2024. InCites JCR SCIE)].
6. Jarienė, Vaiva; Valiukevičius, Paulius; Mačiulaitis, Justinas; Kuzaitytė, Ugnė; Insodaitė, Rūta; **Čiapienė, Ieva**; Mačiulaitis, Romaldas; Valiukevičienė, Skaidra. Activated and Naïve Allogenic Human Placental Mesenchymal Stromal Cells Exert an Immunomodulatory Effect on Hidradenitis Suppurativa Patient Peripheral Blood Mononuclear Cells // Journal of Interferon & Cytokine Research. ISSN 1079-9907, 2024, t. 44, nr. 7, p. 291–299. doi: 10.1089/jir.2024.0035. [Citav. rodiklis: 1.8, bendr. cit. rod.: 5.848, kvartilis: Q4 (2024. InCites JCR SCIE)].
 7. Giedraitienė, Agnė; Tatarūnas, Vacis; Kaminskaitė, Kornelija; Meškauskaitė, Ugnė; Boieva, Svitlana; Ajima, Yu; **Čiapienė, Ieva**; Veikutienė, Audronė; Žvikas, Vaidotas; Kupstytė-Krištaponė, Nora; Jakštas, Valdas; Lukšienė, Dalia; Tamošiūnas, Abdonas; Lesauskaitė, Vaiva. Enterobacteriales Biofilm-Specific Genes and Antimicrobial and Anti-Inflammatory Biomarkers in the Blood of Patients with Ischemic Heart Disease // Diagnostics. Basel, Switzerland : MDPI. ISSN 2075-4418, 2024, t. 14, nr. 5, p. 1–14. doi: 10.3390/diagnostics14050546. [Citav. rodiklis: 3.3, bendr. cit. rod.: 3.037, kvartilis: Q1 (2024. InCites JCR SCIE)].
 8. Tatarūnas, Vacis; **Čiapienė, Ieva**; Giedraitienė, Agnė. Precise Therapy Using the Selective Endogenous Encapsulation for Cellular Delivery Vector System // Pharmaceutics. Basel, Switzerland : MDPI. ISSN 1999-4923, 2024, t. 16, nr. 2, p. 1–20. doi: 10.3390/pharmaceutics16020292. [Citav. rodiklis: 5.5, bendr. cit. rod.: 4.264, kvartilis: Q1 (2024. InCites JCR SCIE)].
 9. Tamakauskas, Vytenis; Žaliūnas, Remigijus; Lesauskaitė, Vaiva; Kupstytė-Krištaponė, Nora; **Čiapienė, Ieva**; Šakalytė, Gintarė; Plisienė, Jurgita; Skipskis, Vilius; Tatarūnas, Vacis. The Effect of Platelet Activity, ABCB1 Genetic Polymorphism, and Renal Function on the Development of Ticagrelor-Related Dyspnea in Patients with Acute Coronary Syndrome // Drug Design, Development and Therapy. ISSN 1177-8881, 2024, t. 18, p. 109–119. doi: 10.2147/DDDT.S435477. [Citav. rodiklis: 5.1, bendr. cit. rod.: 4.384, kvartilis: Q1 (2024. InCites JCR SCIE)].
 10. Valiukevičius, Paulius; Mačiulaitis, Justinas; Pangonytė, Dalia; Kluszczyńska, Katarzyna; Siratavičiūtė, Vitalija; Kuzaitytė, Ugnė; Insodaitė, Rūta; **Čiapienė, Ieva**; Grigalevičiūtė, Ramunė; Zigmantaitė, Vilma; Vitkauskienė, Astra; Mačiulaitis, Romaldas. Human Placental Mesenchymal Stem Cells and Derived Extracellular Vesicles Ameliorate Lung

- Injury in Acute Respiratory Distress Syndrome Murine Model // Cells. Basel, Switzerland : MDPI. ISSN 2073-4409, 2023, t. 12, nr. 23, p. 1–20. doi: 10.3390/cells12232729. [Citav. rodiklis: 5.1, bendr. cit. rod.: 6.694, kvartilis: Q2 (2023. InCites JCR SCIE)].
11. Matulevičiūtė, Indrė; Tatarūnas, Vacis; Skipskis, Vilius; **Čiapienė, Ieva**; Veikutienė, Audronė; Lesauskaitė, Vaiva; Dobilienė, Olivija; Žaliūnienė, Dalia. Coronary Artery Disease, Its Associations with Ocular, Genetic and Blood Lipid Parameters // Eye. London : Nature Publishing Group. ISSN 0950-222X, 2024, t. 38, nr. 2, p. 372–379. doi: 10.1038/s41433-023-02703-9. [Citav. rodiklis: 3.2, bendr. cit. rod.: 2.418, kvartilis: Q1 (2024. InCites JCR SCIE)].
 12. Tamakauskas, Vytenis; Žaliūnas, Remigijus; Lesauskaitė, Vaiva; Kupsty-tė-Krištaponė, Nora; Šakalytė, Gintarė; Jurgaitytė, Julija; **Čiapienė, Ieva**; Tatarūnas, Vacis. Factors Determining Ticagrelor-Induced Dyspnea in Patients with Acute Coronary Syndrome // Applied Sciences. Basel, Switzerland : MDPI. ISSN 2076-3417, 2022, t. 12, nr. 19, p. 1–15. doi: 10.3390/app121910021. [Citav. rodiklis: 2.7, bendr. cit. rod.: 5.55, kvartilis: Q2 (2022. InCites JCR SCIE)].
 13. Giedraitienė, Agnė; Pereckaitė, Laura; Bredelytė-Gruodienė, Evelina; Virgailis, Marius; **Čiapienė, Ieva**; Tatarūnas, Vacis. CTX-M-Producing Escherichia coli Strains: Resistance to Temocillin, Fosfomycin // Future Microbiology. London : Future Medicine. ISSN 1746-0913, 2022, t. 17, p. 789–802. doi: 10.2217/fmb-2021-0202. [Citav. rodiklis: 3.1, bendr. cit. rod.: 5.6, kvartilis: Q3 (2022. InCites JCR SCIE)].
 14. Tatarūnas, Vacis; Aldujeli, Ali; Jašinė, Žemyna; Maciulevičius, Laury-nas; Burkanas, Marius; Venius, Jonas; **Čiapienė, Ieva**; Skipskis, Vilius; Norvilaitė, Rita; Giedraitienė, Agnė; Unikas, Ramūnas; Bakšytė, Giedrė; Dobilienė, Olivija; Šakalytė, Gintarė; Lesauskaitė, Vaiva. Blood Direct PCR: Impact of CYP2C19 and CYP4F2 Variants for Bleeding Prediction in ST-Elevation Myocardial Infarction Patients with Ticagrelor // Personalized Medicine. London : Future Medicine. ISSN 1741-0541, 2022, t. 19, nr. 3, p. 207–217. doi: 10.2217/pme-2021-0152. [Citav. rodiklis: 2.3, bendr. cit. rod.: 4.5, kvartilis: Q3 (2022. InCites JCR SCIE)].

Konferencijos, kuriose skelbti mokslinio darbo rezultatai

1. Stendinis pranešimas. **Čiapienė, Ieva**, Vėžys, Joris, Lesauskaitė, Vaiva, Ostaševičius, Vytautas, Tatarūnas, Vacis. Low-frequency ultrasound enhances therapeutic effects on endothelial and renal cells: impact on function, oxidative stress, and inflammation // European Journal of Clinical Pharmacology : 17th Congress of the European Association for

- Clinical Pharmacology and Therapeutics (EACPT) : June 28–July 1, 2025, Helsinki, Finland. Heidelberg : Springer. ISSN 0031-6970, 2025, t. 81, suppl. 1, p. 53–53. doi:10.1007/s00228-025-03859-x. Prieiga per internetą: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00228-025-03859-x>. [T1a] [M.kr.: N010, T009] [Citav. rodiklis: 2.7, bendr. cit. rod.: 4.264, kvartilis: Q2 (2024. InCites JCR SCIE)].
2. Žodinis pranešimas. **Čiapienė, Ieva**; Vėžys, Joris; Lesauskaitė, Vaiva; Ostaševičius, Vytautas; Tatarūnas, Vacis. Low-frequency ultrasound as a therapeutic enhancer of renin-angiotensin system inhibitor effects in endothelial, renal, and hepatic cells: focus on cellular function and inflammation markers // Cardiovascular Renal Metabolic Liver and Obesity Conference (CaReMeLo) : Abstract Book, May 30–31, 2025, Warsaw, Poland. 2025, p. 14–14. Prieiga per internetą: <https://hdl.handle.net/20.500.12512/254006>. [T2] [M.kr.: M001, T009].
 3. Žodinis pranešimas. **Čiapienė, Ieva**; Tatarūnas, Vacis. Impact of renin-angiotensin system inhibitors on the CYP4F2/20-HETE/GPR75 axis and inflammatory-related biomarkers in endothelial cells // International Health Sciences Conference for All (IHSC for All) "Precision Medicine" : Abstract Book, March 25–26, 2024, Kaunas, Lithuania. Edited by Ignas Lapeikis, Livija Petrokaitė. Kaunas : Lithuanian University of Health Sciences Students' Scientific Society, 2024. 2024, p. 456–458. Prieiga per internetą: https://smd.lt/uploads/publications/IHSCforAll_2024.pdf. [T1e] [M.kr.: M001, N010].
 4. Žodinis pranešimas. **Čiapienė, Ieva**; Meškauskaitė, Ugnė; Andruškevičiūtė, Silvija; Lesauskaitė, Vaiva; Tatarūnas, Vacis. Pleiotropic effect of antiplatelet ticagrelor: expression of CYP4F2 in HUVEC and HepG2 // Cardiovascular Research : EuroThrombosis & EuroVessels 2022. ESC Working Group on Thrombosis together with the ESC Working Group on Aorta and Peripheral Vascular Diseases : October 20–22, 2022, Lisbon, Portugal : Abstract Book. Oxford : Oxford University Press. ISSN 0008-6363, 2022, t. 118, suppl. 2, p. 1–1. doi:10.1093/cvr/cvac157.076. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvac157.076>. [T1a1] [M.kr.: M001] [Citav. rodiklis: 10.9, bendr. cit. rod.: 5.2, kvartilis: Q1 (2022. InCites JCR SCIE)].
 5. Žodinis pranešimas. **Čiapienė, Ieva**. Netipinių žymenų nustatymas išemine širdies liga sergantiems pacientams. Lietuvos kardiologų draugijos konferencija „Fundamentiniai mokslai – kardiologijai“. 2022-02-23, Kaunas, Lietuva.

Pateikta patentinė paraiška

Lietuvos Respublikos patentų biurui pateikta patentinė paraiška „Ultragarsinio ląstelių kultūrų stebėjimo sistema ir būdas“. Patento autoriai: Vytautas Ostaševičius (KTU), Vytautas Jūrėnas (KTU), Algimantas Bubulis (KTU), Joris Vėžys (KTU), Vytenis Tamakauskas (LSMU), Vacis Tatarūnas (LSMU), Ieva Čiapienė (LSMU). Paraiškos Nr. LT2024 545.

PRIEDAI

1 priedas

Biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimas atlikti tyrimą

Dokumentas pasirašytas el. parašu: GINTAUTAS GUMBREVIČIUS
Pasirašymo šalis: Data: 2023-03-15 20:22:44 GMT+2



KAUNO REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS
Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, A. Mickevičiaus g. 9, LT-44307 Kaunas, tel. +370 37 32 72 29; el. paštas: kaunortek@lsmuni.lt

PRITARIMAS BIOMEDICININIO TYRIMO PAPILDYMOI/PRATĖSIMUI

2023-03-15 Nr. P1-BE-2-19/2019

Biomedicininio tyrimo pavadinimas: „Ligonų, vartojančių naujos kartos antikoagulantus, kraujavimo rizikos nustatymas atliekant trombocitų agregacijos bei genų polimorfizmo tyrimus“	
Pagrindinis tyrėjas:	dr. Nora Kupstytė-Krištaponė
Biomedicininio tyrimo vieta:	Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninė Kauno klinikos Kardiologijos klinika
Adresas:	Eivenių g. 2, LT-50161 Kaunas

Peržiūrėti šie [✓] su minėtu tyrimu susiję dokumentai:

[✓] Biomedicininio tyrimo „Ligonų, vartojančių naujos kartos antikoagulantus, kraujavimo rizikos nustatymas atliekant trombocitų agregacijos bei genų polimorfizmo tyrimus“ pagrindinio tyrėjo prašymas dėl leidimo papildyti biomedicininį tyrimą;

[✓] Paraiška biomedicininiam tyrimui „Ligonų, vartojančių naujos kartos antikoagulantus, kraujavimo rizikos nustatymas atliekant trombocitų agregacijos bei genų polimorfizmo tyrimus“;

[✓] Biomedicininio tyrimo „Ligonų, vartojančių naujos kartos antikoagulantus, kraujavimo rizikos nustatymas atliekant trombocitų agregacijos bei genų polimorfizmo tyrimus“ protokolas (nr. Xarelto2018, versija: Nr. 2, data: 2022-12-08);

[✓] Biomedicininio tyrimo „Ligonų, vartojančių naujos kartos antikoagulantus, kraujavimo rizikos nustatymas atliekant trombocitų agregacijos bei genų polimorfizmo tyrimus“ protokolo (nr. Xarelto2018, versija: Nr. 2, data: 2022-12-08) santrauka;

[✓] Biomedicininio tyrimo „Ligonų, vartojančių naujos kartos antikoagulantus, kraujavimo rizikos nustatymas atliekant trombocitų agregacijos bei genų polimorfizmo tyrimus“ informuotas asmens sutikimas (pagrindiniam tyrimui) (versijos nr. 2a, data: 2022-12-08);

[✓] Biomedicininio tyrimo „Ligonų, vartojančių naujos kartos antikoagulantus, kraujavimo rizikos nustatymas atliekant trombocitų agregacijos bei genų polimorfizmo tyrimus“ informuotas asmens sutikimas (genetiniam tyrimui) (versijos nr. 2b, data: 2022-12-08);

[✓] Biomedicininio tyrimo „Ligonų, vartojančių naujos kartos antikoagulantus, kraujavimo rizikos nustatymas atliekant trombocitų agregacijos bei genų polimorfizmo tyrimus“ etinio vertinimo anketa;

[✓] V. Tamakausko gyvenimo aprašymas.

[✓] **Nutarta: Pritarti biomedicininio tyrimo papildymui/pratėsimui**

Kauno regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto nariai		
Nr.	Vardas, pavardė	Veiklos sritis
1.	Doc. dr. Gintautas Gumbrevičius	Klinikinė farmakologija
2.	Prof. dr. Kęstutis Petrikonis	Neurologija
3.	Dr. Saulius Raugėlė	Chirurgija
4.	Dr. Lina Jankauskaitė	Pediatrija
5.	Prof. dr. Džilda Veličkienė	Endokrinologija
6.	Doc. dr. Eimantas Pečiūš	Visuomenės sveikata
7.	Aušra Degutytė	Visuomenės sveikata
8.	Dr. Žydrūnė Luneckaitė	Visuomenės sveikata
9.	Viktorija Bučinskaitė	Teisė

Kauno regioninis biomedicininų tyrimų etikos komitetas dirba vadovaudamasis etikos principais nustatytais biomedicininų tyrimų Etikos įstatyme, Helsinkio deklaracijoje, vaistų tyrinėjimo Geros klinikinės praktikos taisyklėmis.

Pirmininkas



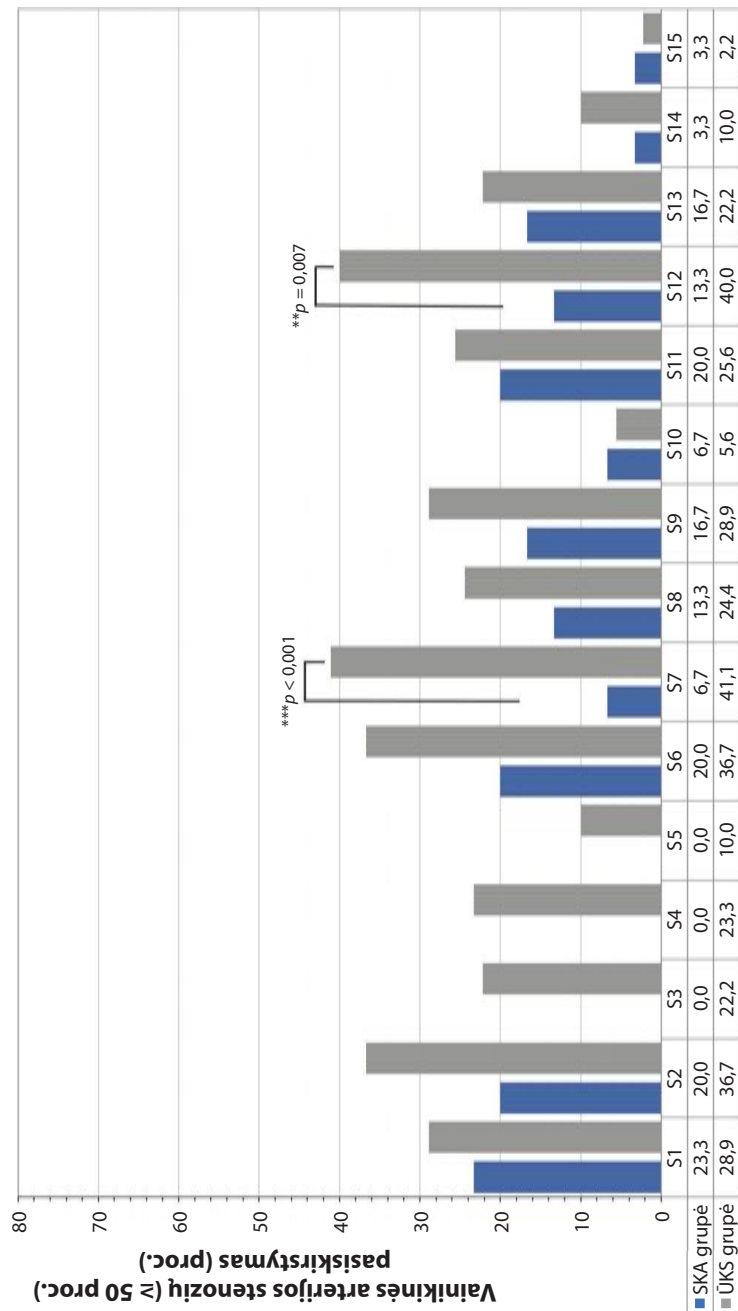
doc. dr. Gintautas Gumbrevičius

**CYP4F2 baltymo koncentracija HUVEC ląstelėse,
paveiktose 0,1–10 μ M rivaroksabano koncentracijomis**

Ląstelių mėginiai	CYP4F2 koncentracija (ng/ml)		p^*
	mediana	min.–maks. reikšmė	
Kontrolė – 0 μ M rivaroksabanas	61,0	17,0–104,0	–
0,1 μ M rivaroksabanas	14,0	7,0–22,0	0,191
0,2 μ M rivaroksabanas	14,0	9,0–35,0	0,191
0,5 μ M rivaroksabanas	13,0	8,0–54,0	0,267
1 μ M rivaroksabanas	14,0	8,0–43,0	0,191
2 μ M rivaroksabanas	14,0	7,0–40,0	0,191
5 μ M rivaroksabanas	13,0	3,0–59,0	0,267
10 μ M rivaroksabanas	13,0	5,0–46,0	0,191

* p reikšmė palyginti su kontroline grupe (ląstelės inkubuotos auginimo terpėje be rivaroksabano), atlikus $n = 6$ nepriklausomus eksperimentus.

Kliniškai reikšmingų (≥ 50 proc.) vainikinių arterijų stenozijų dažnio pasiskirstymas pagal segmentus, įvertinus VAA duomenis



Vainikinės arterijos segmentas

p – statistinio reikšmingumo lygmuo palyginus SKA ir UKS grupes, taikant Fisher's Exact testą.

CURRICULUM VITAE

Name, Surname: Ieva Čiapienė

Address: Lithuanian University of Health Sciences, Institute of Cardiology, Laboratory of Molecular Cardiology, Sukilelių 15, LT-50103 Kaunas, Lithuania

E-mail: ieva.ciapiene@lsmu.lt

Education:

2021–2025 **Ph.D. studies in Natural Sciences**
Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania

2018–2020 **M.S. in Biology of Laboratory Medicine**
Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania

2014–2018 **B.S. in Medical and Veterinary Genetics**
Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania

Research experience:

08/2020–present **Junior Researcher**
Lithuanian University of Health Sciences,
Institute of Cardiology, Laboratory of Molecular Cardiology,
Kaunas, Lithuania

04/2018–08/2020 **Laboratory Technician**
Lithuanian University of Health Sciences,
Institute of Cardiology, Laboratory of Molecular Cardiology,
Kaunas, Lithuania

Research projects:

01/2026–present **Project Junior Researcher**
“Link between coronary artery disease, bacteria and viruses”,
funded by the Research Council of Lithuania
(Grant No. S-MIP-24-125)

04/2025–02/2026 **Project Junior Researcher**
“A model of epigenetic regulation based on the mathematical properties of the genetic code (MEGRAC)”, a joint Lithuanian University of Health Sciences – Kaunas University of Technology scientific project.

04/2024–02/2025 **Project Junior Researcher**
“The effect of ultrasound, drugs, and bacterial biofilms on endothelial cell properties (Ultracell)”, a joint Lithuanian University of Health Sciences – Kaunas University of Technology scientific project.

- 01/2024–12/2024 **Project implementer**
 “Evaluation of endothelial dysfunction biomarkers in patients with ischemic heart disease”, Lithuanian University of Health Sciences Science Fund supported project.
- 01/2023–12/2023 **Project implementer**
 “The impact of arachidonic acid metabolites (20-HETE, 19-HETE) on endothelial function and the expression of their receptors”, Lithuanian University of Health Sciences Science Fund supported project.
- 01/2022–12/2022 **Project implementer**
 “Endothelial function studies: the effects of ARBs, ACEi, and MLN-4760 on ACE gene expression in cell cultures”, Lithuanian University of Health Sciences Science Fund supported project.
- 11/2021–09/2023 **Project Junior Researcher**
 “Development of an innovative cellular therapy prototype for the treatment of acute respiratory distress syndrome caused by the SARS-CoV-2 virus (REGEN)”, funded by the Research Council of Lithuania (Grant No. 01.2.2-LMT-K-718-05-0093).

Supervision of students’ work:

Master’s Thesis Consultant. Pharmacy, Lithuanian University of Health Sciences, work defended in 2026 (title: “Trimethylamine N-oxide (TMAO) in patients with cardiovascular disease”).

Master’s Thesis Consultant. Pharmacy, Lithuanian University of Health Sciences, work defended in 2026 (title: “Human endogenous retrovirus in cell cultures”).

Master’s Thesis Consultant. Pharmacy, Lithuanian University of Health Sciences, work defended in 2026 (title: “The effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors on cell cultures”).

Master’s Thesis Consultant. Pharmacy, Lithuanian University of Health Sciences, work defended in May 2025 (title: “The effect of statins on endothelial cells and the expression of human endogenous retroviruses and cyclooxygenase genes”).

Supervisor of Practice of professional activity (Medical and veterinary genetics, Lithuanian University of Health Sciences), September-October 2023.

Master’s Thesis Consultant. Pharmacy, Lithuanian University of Health Sciences, work defended in June 2023 (title: “Metabolism of apixaban in Novikoff and HepG2 cell cultures”).

Scientific achievements

- 2025 3rd Place Awardee in the “Best PhD Student” Competition of the Lithuanian University of Health Sciences Science Fund.
- 2023 Promotional scholarship of the Research Council of Lithuania for PhD students in science, actively conducting scientific research (No. P-DAP-23-233).

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo mokslinio darbo vadovui prof. dr. Vaciiui Tata-
rūnui už pasitikėjimą, begalę mokslinių idėjų, vertingas įžvalgas ir kryptingą
vadovavimą viso doktorantūros laikotarpio metu. Esu dėkinga už nuolatinį
skatinimą judėti pirmyn, tobulėti, už atvertas bendradarbiavimo galimybes,
konstruktyvias pastabas ir visokeriopą rūpestį.

Dėkoju darbo konsultantei prof. dr. Agnei Giedraitienei už visapusišką
pagalbą rengiant šį mokslinį darbą, vertingus patarimus, šiltą bendravimą ir
palaikymą. Jūsų dėmesys ir profesionalumas buvo labai svarbūs šiame kelyje.

Esu dėkinga Molekulinės kardiologijos laboratorijos vadovei prof. habil.
dr. Vaivai Lesauskaitei už įkvepiančią akademinę lyderystę, suteiktas galimy-
bes įgyvendinti mokslines idėjas, padaršinius ir palankią terpę akademi-
niam augimui.

Dėkoju visam Molekulinės kardiologijos laboratorijos kolektyvui už
pagalbą atliekant eksperimentinius tyrimus, dalijimąsi žiniomis ir kasdienį
bendradarbiavimą, kuris buvo svarbus viso darbo metu.

Dėkoju Kauno technologijos universiteto mokslininkui dr. Joriui Vėžiui
kartu su kolegomis už sukonstruotą žemo dažnio ultragarso įrenginį bei
bendradarbiavimą parenkant tinkamiausias eksperimentines sąlygas tyri-
mams su ląstelių kultūromis. Jūsų indėlis buvo reikšmingas šio darbo dalis.

Nuoširdi padėka Kauno klinikų Širdies centro gydytojams kardiologams
už pagalbą renkant klinikinę medžiagą, bendradarbiavimą ir vertingas disku-
sijas, prisidėjusias prie šio darbo įgyvendinimo.

Dėkoju LSMU Mokslo fondui ir Atvirajam fondui už skirtą finansavimą,
sudariusį galimybes vykdyti tyrimus bei pristatyti rezultatus tarptautinėse
mokslinėse konferencijose.

Dėkoju savo šeimai už supratimą, nuolatinį palaikymą ir tikėjimą mani-
mi viso šio kelio metu. Jūsų parama buvo tvirtas pagrindas siekiant užsibrėžtų
tikslų.

Ypatingą padėką skiriu savo vyrui Aivarui už meilę, kantrybę, padarši-
nimą ir nuolatinį buvimą šalia. Be Tavęs šis kelias būtų buvęs gerokai sun-
kesnis.