

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Jelena S. Tošić Dragović

**UTICAJ GENSKOG POLIMORFIZMA ZA
ANGIOTENZIN KONVERTUJUĆI ENZIM, MATRIKSNU
METALOPROTEINAZU 3, ENDOTELNU AZOT OKSID
SINTETAZU, INTERLEUKINE 6 I 10 I FAKTOR
NEKROZE TUMORA NA KARDIOVASKULARNI
MORBIDITET I MORTALITET BOLESNIKA NA
HEMODIJALIZI**

doktorska disertacija

Beograd, 2018. godina

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Jelena S. Tošić Dragović

**INFLUENCE OF GENE POLYMORPHISMS FOR
ANGIOTENSINE CONVERTING ENZYME, MATRIX
METALLOPROTEINASE 3, ENDOTHELIAL NITRIC OXIDASE,
INTERLEUKINS 6 AND 10 AND TUMOR NECROSIS
FACTOR ON CARDIOVASCULAR MORBIDITY AND
MORTALITY IN HEMODIALYSIS PATIENTS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018.

MENTOR: Prof. dr Nada Dimković, nefrolog, Profesor Interne medicine, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

1. **Prof. dr Višnja Ležaić**, nefrolog, Profesor Interne medicine, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
2. **Prof. dr Branislava Ivanović**, kardiolog, Profesor Interne medicine, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
3. **Prof. dr Dejan Petrović**, nefrolog, Profesor Interne medicine, Univerzitet u Kragujevcu, Medicinski fakultet

UTICAJ GENSKOG POLIMORFIZMA ZA ANGIOTENZIN KONVERTUJUĆI ENZIM, MATRIKSNU METALOPROTEINAZU 3, ENDOTELNU AZOT OKSID SINTETAZU, INTERLEUKINE 6 I 10 I FAKTOR NEKROZE TUMORA NA KARDIOVASKULARNI MORBIDITET I MORTALITET BOLESNIKA NA HEMODIJALIZI

Rezime

Uvod: Kardiovaskularne bolesti (KVB) su glavni uzrok morbiditeta (Mb) i mortaliteta (Mt) bolesnika u terminalnoj fazi hronične bubrežne slabosti (HBS). Godišnja stopa Mt usled KVB iznosi 9%, što je 10-20 puta više nego u opštoj populaciji nakon prilagođavanja za starost, pol, rasu i diabetes mellitus. Visoka incidenca smrti od infarkta miokarda kod bolesnika srednje životne dobi na hroničnoj hemodijalizi (HD) zapažena je još ranih '70- tih godina i objašnjena je hipotezom o “akcelerirajućoj aterosklerozi”, koja je i danas podjednako aktuelna. Klasični faktori rizika kao što su starija životna dob, hipertenzija, dislipidemija, dijabetes melitus, fizička neaktivnost i pušenje nisu mogli zadovoljavajuće objasniti visoku prevalencu koronarne bolesti u HBS. Kasnija istraživanja su pokazala da se ubrzana aterogeneza kod bolesnika sa HBS pojavljuje usled sinergizma mehanizama koji obuhvataju malnutriciju, inflamaciju, oksidativni stres i genetske komponente.

Zbog toga u poslednje vreme pažnju mnogih istraživača privlače takozvani netradicionalni faktori rizika, u koje se od skora pored vrednosti ukupnog homocisteina, lipoproteina a (Lp(a)), infekcija Herpesvirusima i Chlamidiom pneumonie, ubraja i polimorfizam gena za različite proteine koji učestvuju u genezi ateroskleroze. Tokom proteklih nekoliko godina najveći broj ovih istraživanja bavio se polimorfizmima za različite gene endotelne disfunkcije i gene inflamatornog odgovora (angiotenzin konvertujući enzim (ACE) i matriksne metaloproteinaze (MMP), endotelna azot oksid sintetaza (eNOS), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), faktor nekroze tumora (TNF)).

Cilj ove studije bio je analiza kardiovaskularnog morbiditeta i ukupnog i kardiovaskularnog mortaliteta u odnosu na genski polimorfizam za ACE, MMP-3, eNOS, IL-10, IL-6 i TNF kod bolesnika koji se leče hroničnim hemodijalizama, kao i da se odredi koji od navedenih genskih polimorfizama ima najviše uticaja na pojavu kardiovaskularnih događaja u navedenoj populaciji .

Metod: Ovom studijom obuhvaćeno je ukupno 315 bolesnika koji se nalaze na hroničnom programu lečenja hemodijalizama duže od šest meseci u Kliničkom odeljenju za bolesti bubrega i poremećaje metabolizma sa dijalizom Kliničko-bolničkog centra „Zvezdara“ u Beogradu. Svi bolesnici imali su tri hemodijalizna tretmana nedeljno u trajanju od 4-5 sati. Uzorak venske krvi uziman je na redovnoj dijalizi i upućivan na genotipizaciju. Tokom istraživanja prekinuto je praćenje 21 bolesnika, te je krajnji broj bolesnika bio 294. Praćenje je za 21 bolesnika prekinuto jer je 7 bolesnika prešlo u drugi dijalizni centar, kod 10 bolesnika je urađena transplantacija bubrega, 3 bolesnika su prešla na drugu metodu zamene bubrežne funkcije (peritoneumska dijaliza), dok je jedan bolesnik ušao u remisiju osnovne bolesti i prekinuo lečenje dijalizama. Kod 201 bolesnika iz ove grupe je određivan genski polimorfizam za IL-10, IL-6 i TNF, dok je kod 200 bolesnika određivan genski polimorfizam za MMP-3, ACE i eNOS, pri čemu su svi ispitivani genski polimorfizmi određivani kod 85 ispitanika. Deo genetskih analiza (MMP3, ACE i eNOS) radjen je u laboratoriji odeljenja za Citogenetiku i prenatalnu dijagnostiku KBC “Zvezdara”, a drugi deo (IL-10, IL-6, TNF) u laboratoriji Instituta za imunologiju Kliničkog centra Srbije.

Retrospektivni deo studije obuhvatao je prikupljanje podataka o kardiovaskularnom morbiditetu iz istorija bolesti (preležani akutni infarkt miokarda, cerebrovaskularni insult, prisustvo ishemijske bolesti srca, poremećaja srčanog ritma, hipertenzije, prisustvo hipertrofije leve komore i periferne vaskularne bolesti) i ispitivanje njegove povezanosti sa genetskim polimorfizmom. Prospektivni deo studije podrazumevao je praćenje bolesnika u periodu od 5 godina i analizu mortaliteta shodno genskom polimorfizmu.

Rezultati: U odnosu na gen za IL-6 utvrđena je statistički značajna povezanost sa koronarnom arterijskom bolešću i cerebrovaskularnim insultom, a heterozigoti za ovaj gen pokazali su značajno niži rizik za nastanak cerebrovaskularnog insulta u odnosu na CC homozigote. Značajna povezanost pronađena je između IL-10 genskog polimorfizma i infarkta miokarda kod bolesnika na hemodijalizi, dok su GG homozigoti za ovaj gen imali 5 puta niži rizik za nastanak koronarne

bolesti u odnosu na AA homozigote. Nosioci A alela za TNF genski polimorfizam pokazali su 6 puta viši rizik za nastanak hiperlipidemije.

Ukupni petogodišnji mortalitet u odnosu na IL-10 genski polimorfizam najviši je među GG homozigotima, a najveći kardiovaskularni mortalitet imali su AA homozigoti. U odnosu na IL-6 genski polimorfizam najkraće ukupno preživljavanje registrovano je među GC heterozigotima, dok u odnosu na kardiovaskularni mortalitet nije bilo većih razlika među pojedinim genotipovima. Bolesnici sa GG genotipom za TNF genski polimorfizam imali su najlošije preživljavanje, dok u ukupnom mortalitetu nije bilo razlika među genotipovima.

U odnosu na MMP3 genski polimorfizam rezultati su pokazali statistički značajnu povezanost sa koronarnom arterijskom bolešću i srčanim aritmijama, a rizik za ove dve bolesti značajno je viši među heterozigotima za ovaj gen u odnosu na 6A homozigote. Homozigoti 5A/5A za ovaj gen imali su najviši ukupni, kao i kardiovaskularni mortalitet ali bez statističke značajnosti.

Rezultati našeg istraživanja pokazali su statistički značajnu povezanost I/I genotipa za ACE gen sa nastankom srčanih aritmija. Ukupni mortalitet najviši je među I/D heterozigotima dok su D/D homozigoti imali najkraće kardiovaskularno preživljavanje.

U odnosu na eNOS genski polimorfizam TT homozigoti pokazali su duplo viši rizik za koronarnu arterijsku bolest. Ukupni i kardiovaskularni mortalitet najviši je među TT homozigotima.

Zaključak: Pretpostavka je da ispitivani genski polimorfizmi u kombinaciji sa spoljašnjim faktorima ili u specifičnim udruženim dejstvom sa drugim genima mogu imati značajnog uticaja na kardiovaskularni morbiditet i mortalitet. Stoga, za definitivni zaključak potrebno je još mnogo dodatnih ispitivanja.

Ključne reči: hemodijaliza, genski polimorfizam, citokini, angiotenzin konvertujući enzim, metaloproteinaze, kardiovaskularni morbiditet, endotelna disfunkcija, oksidativni stres

Naučna oblast: medicina

Uža naučna oblast: nefrologija

INFLUENCE OF GENE POLYMORPHISMS FOR ANGIOTENSINE CONVERTING ENZYME, MATRIX METALLOPROTEINASE 3, ENDOTHELIAL NITRIC OXIDASE, INTERLEUKINS 6 AND 10 AND TUMOR NECROSIS FACTOR ON CARDIOVASCULAR MORBIDITY AND MORTALITY IN HEMODIALYSIS PATIENTS

Summary

Introduction: Cardiovascular disease (CVD) is leading cause of morbidity and death in haemodialysis patients. The risk for developing cardiovascular event is 10-20 folds higher in patients with end stage renal disease (ESRD) than in the general population, after adjustment for age, gender, race and diabetes mellitus. High mortality rate in hemodialysis patients was observed in early '70ies and was explained with "accelerated atherosclerosis" hypothesis.

Traditional risk factors (elderly patients, hypertension, dislipidaemia, diabetes, sedentary life style and smoking), could not explain high prevalence of cardiovascular disease in haemodialysis patients. That why recent reports have suggested a role of non-traditional risk factors in pathogenesis of CVD, such as malnutrition, inflammation, oxidative stress, homocysteine levels, Lp(a), infections with Herpes and Chlamidia pneumoniae and gene polymorphism of proteins involved in pathogenesis of atherosclerosis. For the last few years investigators were focused on genes of endothelial dysfunction (ACE, MMP3, eNOS) and genes of inflammatory response (IL/6, IL/10, TNF). Gene polymorphism includes egzistance of two or more variant of one gene when frequency of its rarest allele in population is more than 1%.

The aim of this study was to analyse cardiovascular morbidity and overall and cardiovascular mortality regarding the gene polymorphisms for ACE, MMP3, eNOS, IL-10, IL-6 and TNF in patients on chronic dialysis and to detect which gene polymorphism has the highest impact on cardiovascular events in henodialysis patients.

Methods: The study included 315 patients on regular hemodialysis longer than 6 months in University Clinical Center „Zvezdara“, Belgrade. All patients had 3 dialysis sessions weekly in

duration of 4/5 hours. Venous blood sample was collected in midweek dialysis and was sent for genotyping.

During the research, 21 patients was dropped out from the study, 7 due to transferring to another dialysis center, 10 of them due to renal transplantation, 3 were switched to peritoneal dialysis and one had a remission. Genotyping for IL-10, IL-6 and TNF was done in 201 of 315 patients, while genetic analysis for MMP3, eNOS and ACE were done in 200 patients. All genetic analysis were performed in 85 patients.

Genetic analysis for ACE, MMP3 and eNOS were performed in Department for genetic and prenatal diagnostics of “Zvezdara” University Clinical Center, while genetic analysis for IL-10, IL-6 and TNF were performed at Institute for immunology Faculty of Medicine, Belgrade University.

Retrospective analysis included data collection from the patients history regarding cardiovascular morbidity (myocardial infarction, cerebrovascular accident, coronary artery disease, heart arrhythmia, hypertension, left ventricular hypertrophy, peripheral artery disease). Collected data were analysed regarding genetic polymorphisms. The prospective part of this study included 5 years follow-up in order to analyse CV morbidity and all-cause and CV mortality regarding MMP3 gene polymorphism.

Results: Regarding IL-6 gene polymorphism there were significant correlation with coronary artery disease and cerebrovascular accident, while heterozygots for IL-10 gene had significantly lower risk for developing cerebrovascular accident regarding the CC homozygots. Our results showed significant correlation between gene polymorphism for IL-10 and myocardial infarction, while GG homozygots showed 5 fold lower risk for developing coronary artery disease. Heterozygots for IL-10 gene showed significantly lower incidence of cardiovascular events ($p=0.05$) and more than twice lower risk for developing of myocardial infarction, but experienced twice higher risk for left ventricular hypertrophy regarding GG homozygots. Also, A allele carriers for TNF experienced 6 fold higher risk for development of hyperlipidemia.

Overall mortality rate was highest in GG homozygots for IL-10, while highest cardiovascular mortality experienced AA homozygots for this gene. Regarding the IL-6, the lowest survival had heterozygots, while there was no significant difference between different genotypes

regarding cardiovascular mortality rate. Homozygots GG for TNF gene had lowest cardiovascular survival rate, while there were no difference regarding overall mortality rate.

Result of our study showed statistically significant correlation between MMP3 gene polymorphism and coronary artery disease and heart arrhythmia and risk for this conditions was higher in heterozygots for MMP3 gene regarding 6A homozygots. Homozygots 5A/5A had the highest overall and cardiovascular mortality rate.

Regarding ACE gene polymorphism, I/I homozygots had statistically significant correlation with development of heart arrhythmia. Overall mortality was highest among I/D heterozygots while D/D homozygots had shortest cardiovascular survival.

Homozygots TT for eNOS gene had twice higher risk for coronary artery disease. Overall and cardiovascular mortality rate was the highest among TT homozygots for eNOS gene.

Conclusion: So far, it was shown that certain genes in interaction with other genes and enviromental factors may cause some of cardiovascular diseases. We will need longer follow-up in order to get definitive conclusion about influence of gene polymorphism on cardiovascular morbidity.

Keywords: hemodialysis, gene polymorphism, cytokines, angiotensin converting enzyme, metalloproteinase, cardiovascular morbidity, endothelial dysfunction, oxidative stress

Scientific field: Internal medicine

Subspecialty: nephrology

SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
1.1. Netradicionalni faktori rizika za kardiovaskularna oboljenja.....	1
1.2. Geni koji kodiraju molekule endotelne disfunkcije.....	4
1.2.1. Matriksna metaloproteinaza 3.....	5
1.2.2. Angiotenzin konvertujući enzim.....	6
1.2.3. Endotelna azot oksid sintetaza.....	8
1.3. Geni inflamatornog odgovora.....	9
1.3.1. Interleukin 6.....	9
1.3.2. Faktor nekroze tumora.....	10
1.3.3. Interleukin 10.....	11
2. Ciljevi istraživanja.....	13
3. Materijal i metode.....	13
3.1. Bolesnici.....	13
3.2. Metode.....	14
3.2.1. Genotipizacija polimorfizma za ACE gen.....	16
3.2.2. Genotipizacija polimorfizma za MMP3.....	16
3.2.3. Genotipizacija polimorfizma za IL-10, IL-6, TNF i eNOS.....	17
3.3. Statistička obrada podataka.....	18

4. Rezultati	18
4.1. Genski polimorfizam za IL-10, IL-6 i TNF polimorfizmi i kardiovaskularni morbiditet i mortalitet	18
4.1.2. Relativni rizik za kardiovaskularne bolesti u odnosu na genski polimorfizam za IL-10, IL-6 i TNF.....	24
4.1.3. Ukupni i kardiovaskularni mortalitet u odnosu na genski polimorfizam za IL-6, IL-10 i TNF.....	28
4.2. Povezanost genskih polimorfizama za MMP3, ACE i eNOS sa kardiovaskularnim bolestima kod hemodijaliznih bolesnika.....	34
4.3. Povezanost ukupnog i kardiovaskularnog mortaliteta sa genskim polimorfizmima za ACE, MMP3 i eNOS.....	42
4.4. Uticaj ispitivanih genskih polimorfizama, kao i kombinacija različitih genotipova na kardiovaskularne događaje i kardiovaskularni mortalitet kod bolesnika na hroničnoj hemodijalizi	48
5. Diskusija	51
6. Zaključak	59
7. Literatura	61

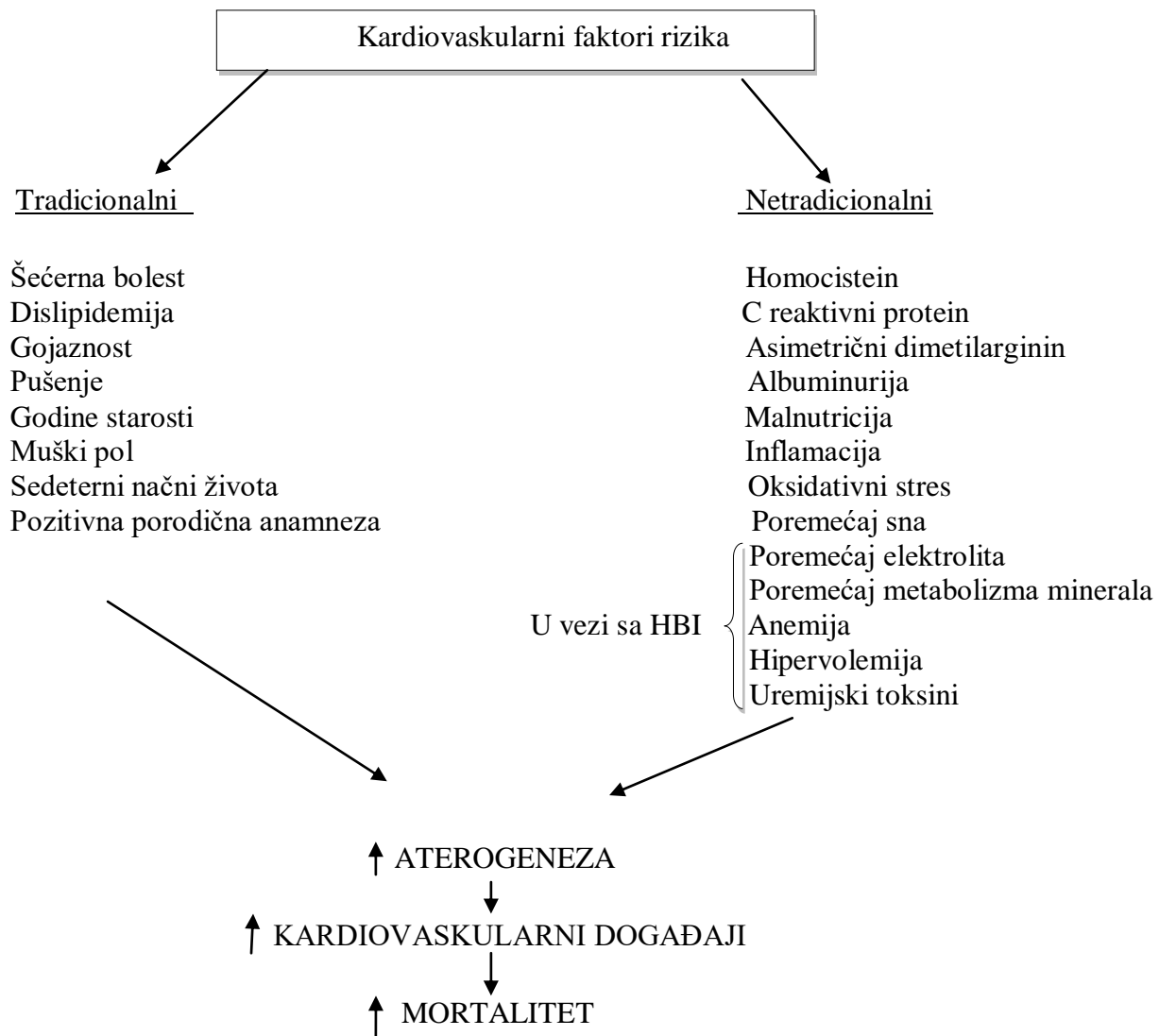
1. Uvod

Kardiovaskularne bolesti (KVB) ubedljivo prednjače kao uzrok smrti bolesnika koji se leče ponavljanim hemodijalizama. Prema dosadašnjim podacima iz literature rizik za nastanak kardiovaskularnih oboljenja (koronarna bolest, akutni koronarni sindrom, infarkt miokarda, periferna vaskularna bolest) je do 30 puta veći među hemodijaliznim bolesnicima u odnosu na opštu populaciju (Pernod i sar., 2006; Locatelli i sar., 2001; Cheung i sar, 2000; Foley i Parafrey, 1998). U osnovi ovih oboljenja je ateroskleroza, koja predstavlja inflamatornu bolest i odvija se prema modelu odgovora na povredu. Upravo zbog toga sve veću pažnju istraživača privlače takozvani netradicionalni faktori rizika za nastanak KVB, za koje se veruje da imaju ključnu ulogu u otpočinjanju i održavanju inflamatornog procesa u zidu krvnog suda (Ross, 1999). U pomenute faktore rizika između ostalog ubrajaju se polimorfizmi različitih gena koji kodiraju molekule endotelne disfunkcije (angiotenzin konvertujući enzim- ACE, matriksna metaloproteinaza- MMP, endotelna azot oksid sintetaza- eNOS), kao i markere inflamatornog odgovora (faktor nekroze tumora- TNF, interleukini- IL).

Polimorfizam gena znači postojanje dve ili više varijanti gena, a da bi se genski lokus smatrao polimorfim potrebno je da učestalost pojavljivanja najređeg alela u populaciji bude veća od 1%. Najveći broj polimorfizama humanog genoma javlja se u obliku polimorfizma u jednom nukleotidu (SNP- single nucleotide polymorphisms), dok su inserciono-delecioni polimorfizmi, koji sadrže promene većih segmenata DNK znatno ređi (Roden i Brown, 2001). U ljudskom genomu je prisutno preko tri miliona SNP-ova, međutim neće svaki polimorfizam dovesti do funkcionalnog poremećaja.

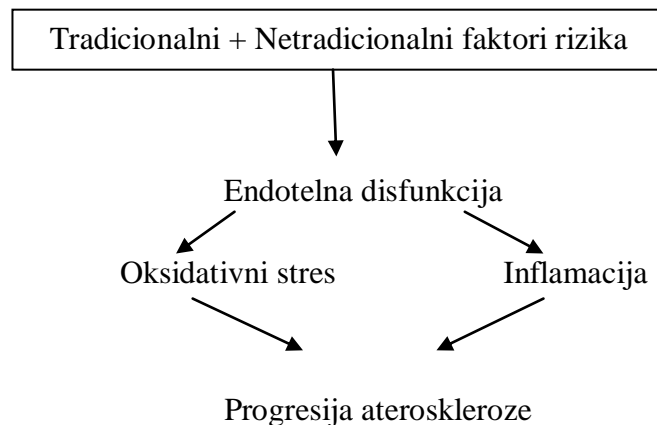
1.1. Netradicionalni faktori rizika za kardiovaskularna oboljenja

Pored dobro poznatih, takozvanih tradicionalnih faktora rizika (Longerneck i sar, 2002), u fokusu istraživača su sve češće netradicionalni faktori rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti (Ross, 1999; Cheng i sar, 1997; Cheng i sar, 1997)- Šema 1.



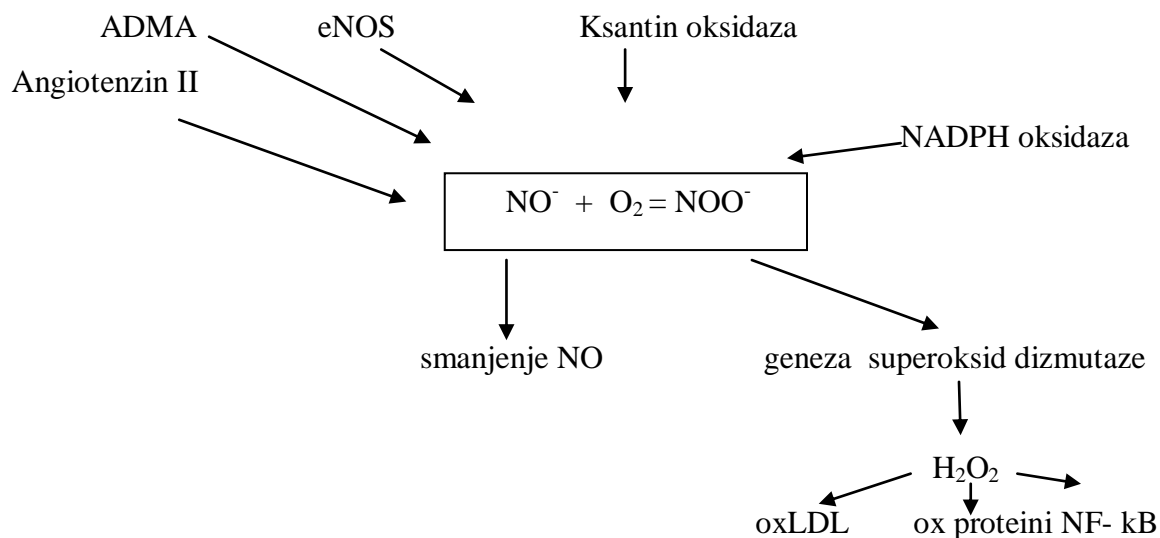
Šema 1. Kardiovaskularni faktori rizika

Od navedenih netradicionalnih faktora rizika mnogi dele zajedničke patofiziološke mehanizme, kao na primer asimetrični dimetil arginin (ADMA), homocistein i C reaktivni protein (CRP), koji kao rezultat daju snižene nivoe azot oksida (NO), dovode do endotelne disfunkcije i inflamacije u zidu krvnog suda. A, ključnu ulogu u inicijaciji i održavanju kaskade aterogeneze imaju oksidativni stres, imunski odgovor i fibrinogeneza (Ross, 1999) -Šema 2.



Šema 2. Endotelna disfunkcija

Oksidativni stress je prisutan u svakoj fazi ateroskleroze, od endotelne disfunkcije do formiranja plaka i njegove rupture (Chade i sar, 2005; Yasushi i Lerman, 2014). Slobodni radikali, kao glavni produkti oksidativnog stresa, preko oksidacije lipida, proteina i ugljenih hidrata dovode do smanjenja endotelne funkcije, pojave sistemske inflamacije i povećanja fibrinogeneze. Takođe, putem geneze NF- kB, regulišu i gensku ekspresiju mnogih transkripcionih faktora povezanih sa inflamacijom, ćelijskom proliferacijom, apoptozom i remodelovanjem tkiva, kao što su interleukini, faktor nekroze tumora, metaloproteinaze, eNOS, RAAS, itd. (Yasushi i Lerman, 2014; Nanayakkara i Gaillard, 2010; Nordfors i sar, 2005)- Šema 3.



Šema 3. Oksidativni stres

Inflamacija učestvuje u inicijaciji endotelne disfunkcije i formiranju plaka, a može biti i posledica ovih procesa, tako što oxLDL iz ateromatoznih plakova dalje indukuje stvaranje interleukina, TNF, interferona i dovodi do amplifikacije zapaljenskog procesa.

Uremijski toksini koji se nakupljaju u organizmu bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću (indoxyl sulfat, p- krezol i drugi) dovode do produkcije slobodnih radikala, aktivacije proinflamatornih citokina i akumulacije oksidovanih proteina i kolagena u srcu i krvnim sudovima, što vodi endotelnoj disfunkciji (Nanayakkara i Gaillard, 2010; Nordfos i sar, 2005; Ritz i Bommer, 2009).

Takođe, akumulacija lipida (oxLDL) u makrofagama intime krvnih sudova, dovodi do lokalne inflamacije, što predstavlja okidač za specifični imunski odgovor protiv auto antigena u zidu krvnog suda, i na taj način doprinosi sistemske inflamaciji (Ross, 1999; Chade i sar, 2005; Nordfors i sar, 2005).

1.2. Geni koji kodiraju molekule endotelne disfunkcije

Geni koji kodiraju molekule endotelne disfunkcije obuhvaćeni ovim istraživanjem su geni za matriksnu metaloproteinazu 3 (MMP3), angiotenzin konvertujući enzim (ACE) i endotelnu azot oksid sintetazu (eNOS).

1.2.1. Matriksna metaloproteinaza 3

Matriksna metaloproteinaza 3 jedna je od dvadeset proteolitičkih enzima koji učestvuju u degradaciji ekstracelularnog matriksa, faktora koagulacije, lipoproteina, faktora rasta, hemotaktičnih i adhezionih molekula (Ye, 2006; Nagase i Woessner, 1999; Sternlicht i Werb, 2001). Posledično dolazi do remodelovanja tkiva, kako u normalnim fiziološkim procesima, tako i u patološkim stanjima, kao što je aterogeneza i rast i diseminacija tumorskog tkiva (Ye, 2006; Koch i sar, 2010). U procesu odgovora na povredu zida krvnog suda, MMP3 dovodi do aktivacije različitih citokina, drugih proteolitičkih enzima i hemotakse zapaljenskih ćelija, što dalje vodi formiranju ateromatoznog plaka ili destabilizaciji i leziji već postojećeg plaka (Jones i sar, 2003; Newby, 2005).

Relativno nova klasa molekula, nazvana MMP-slični molekuli ili disintegrini nađeni su isključivo u aterosklerotskim lezijama, dok ih u zidovima neizmenjenih krvnih sudova nema (Ross, 1999).

Polimorfizam gena za MMP3 je inserciono- delecionog tipa i karakteriše ga niz od 5 ili 6 adenzinskih baza (5A/6A) na lokaciji -1612 baznih parova (bp) ushodno od početnog mesta transkripcije. Na osnovu toga izdvajaju se tri različita genotipa, homozigoti 5A/5A i 6A/6A, kao i heterozigot 5A/6A. Dosadašnja istraživanja pokazala su da 5A/6A polimorfizam promotora gena za MMP3 utiče na njegovu ekspresiju, kao i da postoji izvesna povezanost ovog genskog polimorfizma sa učestalošću određenih kardiovaskularnih oboljenja. U *in vitro* eksperimentima, rađenim na kulturama makrofaga, glatkih mišićnih ćelija i fibroblasta, 5A alel je pokazao veću aktivnost od 6A alela u odnosu na ekspresiju gena (Ye, 2006; Quinones i sar, 1989; Quinones i sar, 1994). Takođe, nivo iRNK za MMP3, kao i nivoi samih enzima razlikuju se u serumima osoba sa različitim genotipom. Najviši nivo izmeren je kod 5A homozigota, najniži kod 6A homozigota, dok su heterozigoti imali intermedijerni nivo ovog enzima u krvi. Razlike u vrednostima enzima u odnosu na polimorfizam MMP3 gena mogle bi se objasniti postojanjem dva humana proteina, koji se mogu vezati za 5A ili 6A niz baznih parova i na taj način menjati jačinu transkripcije gena. Prvi protein, ZBP89, ima jednak afinitet za oba alela i funkcioniše kao pojačivač transkripcije, dok se drugi protein, NFkB, sastoji od nekoliko dimernih jedinica od

kojih se jedna jače vezuje za 6A alel ispoljavajući pri tome ulogu transkripcionog represora. Na osnovu ovakvih saznanja, može se doneti zaključak o postojanju funkcionalnog modela u kome je veća promoterska aktivnost 5A alela rezultat njegove smanjene interakcije sa transkripcionim represorom u odnosu na 6A alel (Quinones i sar., 1989; Ye i sar., 1999).

Kako je osnovna uloga MMP3 enzima razgradnja ekstracelularnog matriksa, osobe sa 5A alelom (5A/5A i 5A/6A genotip) koje imaju veću ekspresiju ovog gena, za posledicu imaju i veću učestalost akutnih kardiovaskularnih događaja. Obrnuto, 6A homozigoti imaju povećanu depoziciju matriksnih proteina i veću sklonost akcelerirajućoj aterosklerozi, ali sa manjom incidencom njenih akutnih komplikacija (Ye i sar., 1999).

1.2.2. Angiotenzin konvertujući enzim

Angiotenzin konvertujući enzim je cink metalopeptidaza difuzno raspoređena na površini endotelnih i epitelih ćelija, a sastavni je deo renin-angiotenzin-aldosteron sistema (RAAS), kao i kinin-kalikrein sistema. Ovaj enzim ima vitalnu ulogu u fiziološkim procesima u organizmu, kao što je balans vode i elektrolita, regulacija krvnog pritiska i ćelijskog rasta, a svoje efekte ostvaruje vršeći hidrolizu inaktivnog dekapeptida angiotenzina I u angiotenzin II (Sayed-Tabatabaei i sar., 2006; Erdos i Skigel, 1987). Takođe, ACE razlaže kinine u kinin-kalikrein kaskadi, gde metaboliše važan vazodilatator bradikinin u neaktivni metabolit bradikinin 1-5, pa se još zove i kininaza II (Sayed-Tabatabaei i sar., 2006). Angiotenzin konvertujući enzim nije jedini koji učestvuje u formaciji angiotenzina II. Smatra se da jedna serin-proteaza, himaza, posreduje u više od 80% formacije angiotenzina II u srcu, a preko 60% u krvnim sudovima (Huang i sar., 2003). Otkriven je i ACE II, smešten na membranama kardiomiocita, endotelnim i tubularnim bubrežnim ćelijama i ćelijama testisa. Deluje tako što hidrolizuje angiotenzin I u angiopeptidazu 1-9, a angiotenzin II u angiopeptidazu 1-7, dok bradikinin inaktivise. Aktivnost ovog enzima ne može se inhibirati lekovima iz grupe ACE inhibitora (Rüster i Wolf, 2006). Angiopeptidaza 1-9 je potentni vazokonstriktor i pojačava dejstvo bradikinina na B2 receptore. Angiopeptidaza 1-7 se stvara u bubregu, povećava JGF, inhibiše Na^+/K^+ ATP-azu, dovodi do vazodilatacije i smanjuje broj AT_1 receptora, uključena je u procese apoptoze i zaustavljanja ćelijskog rasta, a poseduje i antiinflamatorne efekte (Rüster i Wolf, 2006). *In vitro* ispitivanja

pokazala su da je glavna uloga ACE II konverzija angiotenzina II u angiopeptidazu 1-7, koja ima već opisana kardioprotektivna dejstva (Vickers i sar., 2002).

Pored sistemskog RAAS-a, postoji i njegov lokalni oblik, koji funkcioniše potpuno nezavisno od svog sistemskog ekvivalenta, a nalazi se uglavnom u ćelijama proksimalnih tubula bubrega. Klinički značaj toga je da čak potpuna sistemska farmakološka inhibicija sinteze angiotenzina II nije praćena redukcijom lokalne produkcije angiotenzina II u bubrezima (Rúster i Wolf, 2006; Nishiyama i sar., 2002).

Gen za ACE nalazi se na dugom kraku hromozoma 17 i do sada je pronađeno više od 160 polimorfizama ovog gena od kojih se najveći broj javlja kao polimorfizam u jednom nukleotidu (SNP), dok su I/D polimorfizmi ređi (Sayed- Tabatabaei i sar., 2006).

Gen kodira dve izoforme ACE- somatsku i testikularnu formu. Ove dve izoforme nastaju inicijacijom dva različita promotora gena za ACE. Somatski promoter aktivan je u endotelnim, epitelnim i nervnim ćelijama, dok je germinalni promoter aktivan samo u određenom stadijumu razvoja muških polnih ćelija (El- Dorry i sar., 1982; Jaspard i sar., 1993; Soubrier i sar., 1988).

Nivo ACE u plazmi je stabilan u ponavljanim merenjima kod iste osobe, ali postoje velike interindividualne razlike, koje bi se mogle objasniti polimorfizmom gena za ovaj enzim (Alhenc-Gelas i sar., 1991). Radi se o inserciono- delecionom polimorfizmu, koji se zasniva na prisustvu ili odsustvu DNK sekvence u dužini od 287 bp u intronu 16. Smatra se da mutaciju predstavlja delecija, a ne insercija sekvenci. Insercija unutar regulatorne regije ACE gena suprimira, a delecija unutar iste regije aktivira ACE gen (Rigat i sar., 1990).

Na osnovu toga, izdvajaju se tri genotipa, dva homozigota, I/I i D/D i heterozigot I/D. Dokazano je da najviše vrednosti enzima u plazmi imaju nosioci D/D genotipa, a najniže vrednosti I/I homozigoti, dok heterozigoti imaju intermedijarni nivo enzima u krvi (Rigat i sar., 1990).

Iako je uticaj I/D polimorfizma ACE gena često ispitivan u odnosu na kardiovaskularna oboljenja, njegova pozicija u nekodirajućem regionu ukazuje na to da bi on teško mogao da bude funkcionalni polimorfizam (Sayed- Tabatabaei i sar., 2006). Ali, kako priroda i pozicija funkcionalnog polimorfizma ovog gena odgovornih za interindividualne razlike u plazma nivoima ACE i dalje ostaje misterija, istraživači nastavljaju da koriste I/D polimorfizam kao

validni marker povezanosti nepoznatog funkcionalnog polimorfizma i određenih patoloških stanja.

1.2.3. Endotelna azot oksidaza

Azot oksid je signalni molekul koji se sintetise iz L- arginina uz pomoć enzima azot oksid sintetaze (NOS). Azot oksid ili endotelni relaksirajući faktor je značajan vazoaktivni molekul koji u normalnim uslovima ima povoljne efekte na kardiovaskularni sistem. Deluje vazodilatatorno, smanjujuci intacelularni Ca^{2+} , zatim antitrombotski inhibirajući agregaciju trombocita, a ispoljava i antiinflamatorno i antioksidativno dejstvo (Kim i sar., 2010; Förstermann, 2006). Antiinflamatorne efekte ostvaruje putem inhibicije nuklearnog faktora kapa b (NF-kB), koji indukuje ekspresiju hemokina i adhezionih molekula za leukocite na vaskularnom endotelu. Azot oksid, produkovan od strane eNOS, indirektno ispoljava i antioksidativna svojstva, tako što povećava sintezu enzima superoksid dizmutaze (Dias i sar., 2011).

Postoje tri izoforme ovog enzima, endotelna (eNOS ili NOS III), neuronalna (nNOS ili NOS I) i inducibilna (iNOS ili NOS II). U fiziološkim stanjima normalno su eksprimovane nNOS i eNOS, dok se iNOS pojavljuje samo u patološkim stanjima, naročito u inflamatornim bolestima. Endotelna NOS je dominantno eksprimovana na površini endotelnih ćelija i esencijalna je za održavanje bazalnog tonusa glatke muskulature krvnih sudova (Dias i sar., 2011; Ferreiro i sar., 2004).

Endotelna NOS je dimer, koji se sastoji iz dva identična monomera, te u nedostatku svog kofaktora, koji je od esencijalne važnosti (BH_4), prelazi u monomernu formu i kao takva, umesto u sintezi NO, učestvuje u produkciji superoksidnog anjona i slobodnih radikala, što ima negativne posledice na kardiovaskularni sistem (Ferreiro i sar., 2004).

Gen za eNOS nalazi se na hromozomu 7 i njegove varijacije u nukleotidnim sekvencama zapažene su u promotorskom regionu, egzonima i intronima. Ovi polimorfizmi rezultuju različitom ekspresijom gena i utiču na interindividualne razlike u aktivnosti ovog enzima, što bi moglo imati uticaja na individualni rizik za nastanak kardiovaskularnih oboljenja.

Najčešće ispitivana su tri SNP polimorfizma ovog gena, od koji je 894G>T naročito dovođen u vezu sa pojavom kardiovaskularnih oboljenja. U osnovi ovog polimorfizma je zamena glutamata (Glu) za aspartat (Asp) na poziciji 298 enkodirajućeg proteina. Na osnovu pomenutog polimorfizma izdvajaju se tri različita genotipa, dva homozigota T/T i G/G i heterozigot G/T. Mutirani alel predstavlja alel T i dovodi se u vezu sa postojanjem endotelne disfunkcije (Hingorani, 2000).

Dosadašnja saznanja govore u prilog tome da mutirane varijante ovog polimorfizma (T/T i G/T genotip) uzrokuju nisku produkciju NO, što rezultuje kardiovaskularnim komplikacijama, kao što su hipertenzija, tromboze, vazokonstrikcija, endotelna disfunkcija i akcelerirajuća ateroskleroza (Kim i sar., 2010; Szabó, 2013).

Obzirom da NO ima važnu ulogu u normalnoj homeostazi vaskularnog endotela i tonusa, njegova smanjena produkcija i raspoloživost su prepoznati kao važan segment u patogenezi kardiovaskularnih oboljenja.

1.3. Geni inflamatornog odgovora

U gene koji kodiraju markere inflamatornog odgovora obuhvaćene ovim istraživanjem spadaju geni za interleukin 6 (IL-6), faktor nekroze tumora (TNF) i interleukin 10 (IL-10).

1.3.1. Interleukin 6

Interleukin 6 jedan je od markera inflamacije i zavisno od okolnih činioca može imati i proinflamatorne i antiinflamatorne efekte. Izlučuju ga makrofage i T limfociti, kao i glatkomišićne ćelije u zidovima krvnih sudova, ali i skeletni mišići, osteoblasti i adipociti (Stenvinkel i sar., 2005). Svoje proinflamatorne efekte ostvaruje putem inicijacije imunskog odgovora, podstaknutog traumom tkiva, tako što stimuliše sintezu IL-10, dok antiinflamatorno deluje tako što inhibiše izlučivanje faktora nekroze tumora (TNF) i interleukina 1 (IL-1).

On je reaktant akutne faze, slobodno prolazi hemato-encefalnu barijeru i inicira sintezu prostaglandina E₂ (PGE₂) u hipotalamusu, te tako posredno učestvuje u povećanju telesne temperature. U odgovoru na infektivne agense, luče ga makrofage, a IL-6 tada preko toll like receptora (TLR) aktivira intracelularne signalne puteve, što vodi amplifikaciji inflamatornog odgovora i dodatnoj produkciji citokina (Mihara i sar., 2012).

Kod velikog broja bolesnika, koji se leče ponavljanim hemodijalizama postoji serološki dokaz o pojačanom inflamatornom odgovoru u vidu povišenih nivoa cirkulišućih markera inflamacije, kao što su IL-6 i CRP (Stenvinkel i sar., 2005; Girdnt i sar., 1995). Obzirom da postoje interindividualne razlike u serumskim nivoima IL-6, posumnjano je da se u osnovi ovih varijacija nalazi polimorfizam gena koji kodira IL-6. Sprovedena istraživanja su dokazala da je polimorfizam u promotoru ovog gena, G-174C, funkcionalan i da utiče na nivo produkcije IL-6 (Fishman i sar., 1998). Na osnovu ovog polimorfizma izdvajaju se tri genotipa, dva homozigota, G/G i C/C, i jedan heterozigot G/C. Bolesnici koji imaju C alel u svom genomu imaju i više vrednosti IL-6 u krvi u odnosu na G/G homozigote (Fishman i sar., 1998).

Dosadašnje studije su pokazale uticaj ovog polimorfizma gena za IL-6 na ukupni i kardiovaskularni mortalitet kod bolesnika na hroničnoj hemodijalizi (Nanayakkara i Gaillard, 2010; Stenvinkel i sar., 2005; Aker i sar., 2009; Badiou i sar., 2008).

1.3.2. Faktor nekroze tumora

Faktor nekroze tumora (TNF) je potentan imunomodulator i proinflamatorni citokin, koga u najvećoj meri produkuju makrofage. Ima važnu ulogu u patologiji kardiovaskularnog sistema i doprinosi razvoju, progresiji i komplikacijama ateroskleroze, aktivišući faktore rasta, druge citokine i adhezione molekule. Smatra se reaktantom akutne faze inflamatornog odgovora i kao takav učestvuje u regulaciji imunskog odgovora. Takođe, ima ulogu u indukciji apoptoze, inhibiše tumorogenezu i virusnu replikaciju (Stenvinkel i sar., 2005). Gen za TNF nalazi se na hromozomu 6, a lokus je lociran u sklopu gena MHC klase II, veličine je 12 kilobaza i ima 4 egzona, od kojih poslednji kodira više od 80% izlučenog proteina (Wilson i sar., 1997). Njegov osnovni oblik je transmembranski protein, koji pod proteolitičkim dejstvom TNF konvertujućeg enzima (TACE ili ADAM 17) postaje finalni, solubilni protein.

Postoje dva receptora za TNF, TNFR₁ i TNFR₂, od kojih se prvi nalazi u većini tkiva i podložan je dejstvu i transmembranske i solubilne forme TNF. Drugi receptor se nalazi samo u ćelijama imunskog sistema i može ga aktivirati isključivo transmembranski oblik ovog proteina. Polimorfizam promotora ovog gena utiče na nivo produkcije TNF, reguliše njegovu transkripcionu aktivnost i odgovoran je za interindividualne razlike u nivoima cirkulišućeg TNF. Promotorski region ovog gena sadrži nekoliko funkcionalnih polimorfizama (308GA, 238GA, -1031T>C i -863C>A), od kojih je 308GA najčešće ispitivan u odnosu na kardiovaskularne bolesti. Kod osoba sa A alelom u ovom genu nivoi TNF u krvi su viši u odnosu na GG homozigote (Nanayakkara i Gaillard, 2010; Wilson i sar., 1997).

Dosadašnja istraživanja u ovoj oblasti pokazala su da u populaciji hemodijaliznih bolesnika postoje povišeni nivoi cirkulišućeg TNF, kao i da postoji njegova povezanost sa patogeneom hronične bubrežne slabosti i njenih komplikacija, uključujući i kardiovaskularne bolesti (Desecamps-Latscha i sar., 1995; Buraczynska i sar., 2007).

1.3.3. Interleukin 10

Interleukin 10 (IL-10) otkriven je 1991. godine i jedan je od najvažnijih antiinflamatornih i antiaterogenih citokina. Primarno ga proizvode monociti, limfociti i mastociti (Nanayakkara i Gaillard, 2010; Stenvinkel i sar., 2005). Njegova produkcija je minimalna u nestimulisanim tkivima, te deluje da je neophodan neki okidač za sekreciju IL-10, poput patogene ili komensalne flore. Indukcija sekrecije IL-10 obuhvata transkripcionu aktivaciju pomoću faktora NF- κ B i AP-1, koji se vezuju za promotor gena i vrše regulaciju njegove ekspresije (Chávez-Sánchez i sar., 2010). Ovaj citokin poseduje i mogućnost autoregulacije mehanizmom negativne povratne sprege, a postoji i mehanizam regulacije ekspresije ovog gena na posttranskripcionom nivou.

Učestvuje u imunomodulaciji i regulaciji inflamacije, a ima i brojne pleotropne efekte. Indukuje nishodnu regulaciju Th₁ citokina, antigena MHC klase II i kostimulatornih molekula na makrofagama. Poboljšava preživljavanje B limfocita, njihovu proliferaciju i sekreciju antitela. Uključen je i u regulaciju JAK-STAT signalnog puta. U bakterijskim infekcijama inhibiše lipopolisaharide i bakterijske produkte i na taj način smanjuje inflamaciju i sekreciju

proinflamatornih citokina. Takođe, poseduje antikancerogeno dejstvo, preko indukcije interferona gama i CD8+ T limfocita, uključujući i stimulaciju sekrecije granzima B i perforina.

Od skora se pominje i njegova kardioprotektivna uloga, koja se ogleda u inhibiciji i usporavanju procesa aterogeneze. On interferira u prvom koraku aterogeneze, tako što sprečava vezivanje cirkulišućih ćelija imunskog sistema za endotel krvnog suda, a to ostvaruje nishodnom regulacijom adhezivnih molekula (CD18, CD60L i ICAM-1). Takođe, redukuje i produkciju hemotaktičnih molekula, pa na taj način smanjuje akumulaciju makrofaga i leukocita, a samim tim i subendotelnu inflamaciju. Inhibira dejstvo matriksnih metaloproteinaza i drugih proteolitičkih enzima, suprimira proizvodnju superoksidnih anjona, pa na taj način dovodi i do stabilizacije plaka (Stenvinkel i sar., 2005).

Kako se IL-10 isključivo izlučuje putem bubrega, kod pacijenata sa terminalnom bubrežnom slabošću njegov poluživot je produžen, a vrednosti u krvi ovog citokina su povišene (Morita i sar., 1997). Takođe se smatra da kod bolesnika sa uremijom postoji hronična aktivacija monocita koji proizvode značajno veće količine IL-10 u odnosu na zdrave osobe, a tokom postupka hemodijalize njegovo stvaranje mogu indukovati endotoksini i komponente komplekta, u sklopu reakcija bioinkompatibilnosti (Brunet i sar., 1998). Za sada su ispitivanja o antiaterosklerotskim efektima ovog citokina pokazala kontroverzne rezultate.

Gen za IL-10 lociran je na hromozomu 1, a u promotorskom regionu ovog gena su opisani polimorfizmi na pozicijama -592 C/A, -818 C/T i /1082 G/A. Do sada je najviše ispitan polimorfizam -1082 G/A, za koji je dokazano da utiče na nivo IL-10 u krvi (Nanayakkara i Gaillard, 2010; Stenvinkel i sar., 2005). Nosioci GG genotipa proizvode za oko 30% više ovog citokina u odnosu na AA homozigote, za koje je dokazano da postoji povezanost sa povišenim mortalitetom među hemodijaliznim bolesnicima koji su nosioци ovog genotipa (Girndt i sar., 2002).

2. Cilj istraživanja

Obzirom da su literaturni podaci u vezi uticaja polimorfizama gena za ACE, MMP3, eNOS, IL-6 i TNF i kardiovaskularnih bolesti kod bolesnika na hroničnoj hemodijalizi retko ispitivani, cilj ovog rada bio je da se utvrdi povezanost:

- genskog polimorfizma za ACE i kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta;
- genskog polimorfizma za MMP3 i kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta;
- genskog polimorfizma za eNOS i kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta;
- genskog polimorfizma za IL-6 i kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta;
- genskog polimorfizma za TNF i kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta
- i da se utvrdi koji od ispitivanih genetskih polimorfizama ili koja kombinacija ovih polimorfizama u određenom genomu ima najviše uticaja na kardiovaskularni morbiditet i mortalitet u grupi bolesnika na hroničnoj hemodijalizi.

3. Materijal i metode

3.1. Bolesnici

Ovom studijom preseka obuhvaćeno je 315 bolesnika, koji se nalaze na hroničnom programu lečenja hemodijalizama duže od 6 meseci na Kliničkom odeljenju za nefrologiju i poremećaje metabolizma sa dijalizom “dr Vasilije Jovanović” u Kliničko-bolničkom centru “Zvezdara”. Svi bolesnici imali su tri hemodijalizne sesije nedeljno u trajanju od 4-5 sati. Uzorak venske krvi uziman je na redovnoj dijalizi i upućivan na genotipizaciju. Tokom istraživanja prekinuto je praćenje 21 bolesnika, te je krajnji broj bolesnika bio 294. Praćenje je za 21 bolesnika prekinuto jer je 7 bolesnika prešlo u drugi dijalizni centar, kod 10 bolesnika je urađena transplantacija bubrega, 3 bolesnika su prešla na drugu metodu zamene bubrežne funkcije (peritoneumska dijaliza), dok je jedan bolesnik ušao u remisiju osnovne bolesti i prekinuo lečenje dijalizama. Kod 201 bolesnika iz ove grupe je određivan genski polimorfizam za IL-10, IL-6 i TNF, dok je kod 200 bolesnika određivan genski polimorfizam za MMP-3, ACE i eNOS, pri čemu su svi ispitivani genski polimorfizmi određivani kod 85 ispitanika. Deo genetskih analiza (MMP3, ACE i eNOS) radjen je u laboratoriji odeljenja za Citogenetiku i prenatalnu dijagnostiku KBC “Zvezdara”, a drugi deo (IL-10, IL-6, TNF) u laboratoriji Instituta za imunologiju Kliničkog centra Srbije.

Retrospektivni deo studije obuhvatao je prikupljanje podataka o kardiovaskularnom morbiditetu iz istorija bolesti (preležani akutni infarct miokarda, prisustvo ishemijske bolesti srca, periferne vaskularne bolesti, hipertenzije, hipertrofije leve komore, poremećaja srčanog ritma) i ispitivanje njegove povezanosti sa genetskim polimorfizmom. Prospektivni deo studije podrazumevao je praćenje bolesnika u periodu od 5 godina i analizu mortaliteta shodno geskom polimorfizmu.

Podaci dobijeni iz istorija bolesti uključivali su:

- starost i pol bolesnika;
- uzrok terminalne bubrežne slabosti;
- dužinu lečenja hemodijalizama;
- prisustvo prethodno navedenih kardiovaskularnih oboljenja.

3.2. Metode

Za izolaciju DNK korišćena je puna krv sa antikoagulantom EDTA (5ml sveže krvi, čuvana na +4⁰C najduže 4 dana ili duže od toga na temperature od -20⁰C). DNK iz pune krvi izolovana je mikrometodom isoljavanja (GeneJET minikit, Fermentas Thermo Fisher Scientific Inc, St. Leon-Rot, Germany), koja se zasniva na lizi ćelija, enzimskoj i hemijskoj ekstrakciji sa svrhom uklanjanja ćelijskih proteina, RNK i drugih makromolekula, nakon čega sledi taloženje DNK u apsolutnom alkoholu.

Za genotipizaciju je korišćena metoda lančane reakcije polimerizacije (PCR). Osnovni princip PCR amplifikacije, tj umnožavanja željenog segmenta DNK molekula predstavlja imitaciju replikacije DNK. Za replikaciju DNK potrebna je matrica (jednolančana DNK, tj. denaturisana dupleks DNK) koja se kopira, prajmer tj, kratak oligonukleotid komplementaran krajevima sekvence koja se kopira, gradivni blokovi- nukleotidi i enzim koji katalizuje ugradnju nukleotida po principu komplementarnosti sa matricom. Ovaj enzim je DNK zavisna DNK polimeraza.

PCR reakcija se odvija u mikrotubi (zapremine 0,2ml) gde se podvrgava cikličnim promenama temperature, što ima za posledicu amplifikaciju tačno određenog gena ili dela gena. Jedan ciklus čine:

-denaturacija DNK matrice zagrevanjem na 94⁰C-96⁰C.

-hibridizacija prajmera sa matricom (*annealing*) pri temperaturi od 50-65⁰C i

-elongacija prajmera - sinteza novog lanca komplementarnog DNK regionu ograničenog prajmerima pomoću termostrabilne DNK polimeraze na temperaturi od 72⁰C.

Ponavljanje ovakvih ciklusa 25-45 puta rezultira eksponencijalnim umnožavanjem željenog segmenta DNK. Uspešnost PCR amplifikacije proverava se elektroforezom na agaroznom gelu, nakon čega se pozitivni uzorci koriste za dalju analizu restrikcionim endonukleazama.

Restrikcioni enzimi su prečišćeni iz bakterija i pripadaju grupi endonukleaza, a supstrat im je dvolančana DNK. Specifičnost se ogleda u tome što za razliku od drugih nukleaza prepoznaju kratke redoslede nukleotida definisanog redosleda (restrikciona mesta) i seku DNK u okviru njih.

Tretiranjem DNK restrikcionim enzimima dobijamo fragmente različite dužine. Dužina i broj fragmenata zavise od veličine genoma i od broja i rasporeda odgovarajućih restrikcionihi mesta u genomu.

Restrikcioni fragmenti se razdvajaju na osnovu dužine jer se različito ponašaju tokom elektroforeze. U električnom polju u blago alkalnom puferu, molekul DNK će se kretati kroz agarozni matriks od katode ka anodi, pri čemu brzina kretanja DNK molekula zavisi od njegove veličine, od veličine pora u ovom matriksu, od gustine agaroznog gela, primenjene električne struje i drugih parametara. Poređenjem brzine kretanja molekula DNK koji ispitujemo sa brzinom kretanja molekula DNK poznate veličine (DNK marker-leader), elektroforezom u agaroznom matriksu možemo proceniti veličinu dobijenog DNK fragmenta.

3.2.1. Genotipizacija polimorfizma gena za ACE

Područje od 287 pb koje odgovara delecijskom fragmentu (D) unutar introna 16 amplifikovano je PCR postupkom. Lančanom reakcijom umnoženi su odsecci DNK dužine 490 bp i 190 bp u postupku genotipizacije insercijsko-delecijskog polimorfizma ACE gena i 335 bp primenom seta prajmera koji prepoznaju inserciono specifične sekvence.

Reakcionu smešu čini: 2,5 μ l PCR pufera, 0,75 μ l MgCl₂, 0,5 μ l dNTP-a, 1 μ l prajmera I, 1 μ l prajmera II, 0,2 μ l DNK polimeraze, 5 μ l genomske DNK u ukupnoj zapremini od 25 μ l. Reakcija se odvijala u uređaju za lančanu reakciju polimeraze (GeneAmp PCR System 2700, AB Applied Biosystem). Umnožavanje odsečaka odvijalo se u 30 ciklusa uključujući denaturaciju na 94°C kroz 1 minut, vezivanje početnica na 58°C 1 minut i sintezu novog lanca DNK na 72°C u trajanju od 2 minuta. Fragmenti bez insercije (D alel) i sa insercijom (I alel) od 190bp i 490bp respektivno, detektovani su elektroforezom na 2% agaroznom gelu sa etidijum bromidom.

Da bi se povećala specifičnost DD genotipizacije PCR amplifikacija je vršena sa inserciono specifičnim setom prajmera u PCR uslovima: 1 min denaturacija na 94°C, praćenom 30 ciklusa

sa 30 s na 94°C, 45 s na 67°C (annealing) i 2 min na 72°C (extension). Samo prisustvo I alela generiše fragmente dužine 335-bp koji su identifikovani elektroforezom na 3% agaroznom gelu. Amplifikovani uzorak sa insercijom *Alu* sekvence odgovara veličini fragmenta od 490 bp (genotip II), a DNK fragment od 190 bp identifikuje deleciju sekvence na alelima (genotip DD). Pojava oba fragmenta ukazuje na heterozigotnu varijantu (genotip ID).

3.2.2. Genotipizacija polimorfizma za MMP3

Za dokazivanje -1612 5A/6A genskog polimorfizma korišćena je PCR-RFLP metoda. Promoterski region MMP3 gena koji sadrži 5A/6A polimorfizam je umnožen od 100ng genomske DNK uz pomoć oligonuklotidnih prajmera: napred, 5'-GAT TAC AGA CAT GGG TCAC-3', i unazad 5'-TTT CAA TCA GGA CAA GAC GAA GTT T-3'. Reakcionu smešu čini: 2,5µl PCR pufera, 0,75µl MgCl₂, 0,5 µl dNTP-a, 1 µl prajmera I, 1 µl prajmera II, 0,2 µl DNK polimeraze, 5 µl genomske DNK u ukupnoj zapremini od 25 µl. PCR uslovi bili su sledeći: inicijalno denaturacija tokom 2 minuta na 95°C, praćeno sa 35 ciklusa od po 30 sekundi na 95°C, 30 sekundi na 57°C, 30 sekundi na temperaturi od 72°C sa završnim produžetkom na 72°C tokom 10 min. Reakcija je sprovedena GeneAmp PCR System 2700, AB Applied Biosystem.

PCR produkt od 120 bp digestiran je brzim restrikcionim enzimom PdmI (ThermoFisher). Digestirani produkt je podvrgnut potom gel elektroforezi (sa 2% agarozna gelom) i vizuelizovan bojenjem sa etidium bromidom. Alel 5A sadrži sekvencu 5'-GAA(N)4TTC- 3' koju prepoznaje restrikcioni enzim PdmI i potom ga cepa na fragmente od 97 baznih parova i 23 bazna para. Ovakve sekvence koju bi ovaj enzim prepoznao nema u 6A alelu, te 6A/6A produkti ne podležu digestiji. Na gelu se dakle, nakon digestije restrikcionim enzimom izdvajaju tri različita produkta: 6A/6A genotip se demonstrira fragmentima od 120 bp, 5A/5A genotip daje fragmente veličine 97 bp i 23 bp, dok heterozigot daje sva tri fragmenta.

3.2.3. Genotipizacija polimorfizama gena za TNF, IL-6 , IL-10 i eNOS

Detekcija i analiza polimorfizama gena za TNF -308 G/A (*rs 1800629*), IL-6 -174 G/A (*rs 1800795*), IL-10 -1082 G/A (*rs1800896*) i 894T obavljana je pomoću real-time PCR metode sa

komercijalnim TaqMan matricama (Applied Biosystems Inc). PCR metoda izvedena je u reakcionim posudama i uređaju za lančanu reakciju, 96-well reaction plate, (MicroAmp Optical, ABI, Foster City, CA, USA), zapremine 10 μL , od čega je 5.25 μL činila reakciona smesa (5 μL 2X Maxima Probe qPCR Master Mix, Fermentas Thermo Fisher Scientific Inc, i 0.25 μL četrdeset puta koncentrovane mešavine oligonukleotida), a 4.75 μL činili su DNK uzorci (otprilike 20 ng) rastvoreni u demineralizovanoj vodi. Prajmeri su dobijeni od Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA, a matrice od Metabion, Martinsried, Germany. Posude su zapečaćene optičkim adhezivnim biofilmom (ABI), centrifugirane na velikom broju obrtaja, a potom stavljene u termocikler (Mastercycler ep realplex², Eppendorf, Hamburg, Germany). Uslovi u termocikleru bili su: 95°C tokom 4 minuta, praćeno sa 40 ciklusa tokom 15 sekundi na temperaturi od 95°C, zatim 1 minut na temperaturi 55°C, i 20 sekundi na 68°C. Čitanje rezultata rađeno je na 68°C.

3.3. Statistička obrada podataka

Statističke analize su obavljene pomoću SPSS sistema (statistical power for social science) softver verzija 20 (IBM Corporation, New York, USA). Hardy-Weinberg ekvilibrijum testiran je pomoću Pearsonovog χ^2 testa. Standardni ststistički testovi korišćeni su radi dobijanja mera varijabiliteta i mera centralne tendencije. Povezanost između genetskog polimorfizma i kardiovaskularnog morbiditeta testirana je univarijantnom i multivarijantnom logističkom regresijom pomoću χ^2 testa ili Fišerovog testa, zavisno gde je jedan od ova dva testa bio adekvatan za primenu. Relativni rizik (Odds ratio) je računat radi procene rizika za pojedinačne kardiovaskularne bolesti. Numeričke vrednosti (demografske karakteristike bolesnika) analizirane su pomoću ANOVA-e. Analiza petogodišnjeg kardiovaskularnog i ukupnog mortaliteta rađena je pomoću Cox analize i Kaplan Meierovog testa. Rezultati su prikazani u tabelama i grafikonima.

4.Rezultati

4.1. Genski polimorfizam za IL-10, IL-6 i TNF i kardiovaskularni morbiditet i mortalitet

Genotipizacija za IL-10, IL-6 i TNF urađena je kod 201 bolesnika, od čega je praćenje prekinuto za 7 bolesnika. U odnosu na polimorfizam gena za IL-10 najzastupljeniji su bili heterozigoti (126; 64,9%), GG homozigota je bilo 38 (19.6%), dok je najmanje bilo nosioca AA genotipa (15.5%). Takođe, najbrojniji su bili heterozigoti i u odnosu na IL-6 (199; 51%), GG homozigota je bilo 48 (24.7%), a CC homozigota 47 (24.2%). U odnosu na TNF polimorfizam najviše je bilo GG homozigota, 147 (75.8%), heterozigota 45 (23.2%), dok je AA homozigota bilo svega 2 (1%).

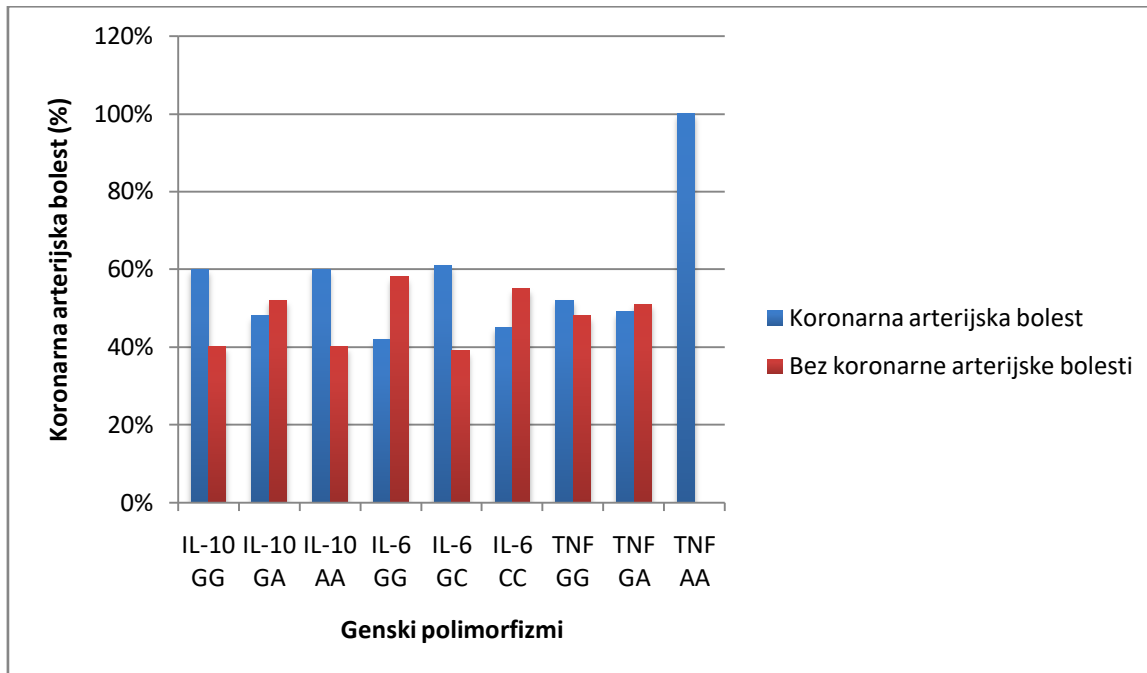
Opšte karakteristike bolesnika prikazane su u Tabeli 1., gde se može zapaziti da je u pitanji starija populacija i da je kod većine prisutan bar jedan komorbiditet.

Tabela 1. Opšte karakteristike bolesnika

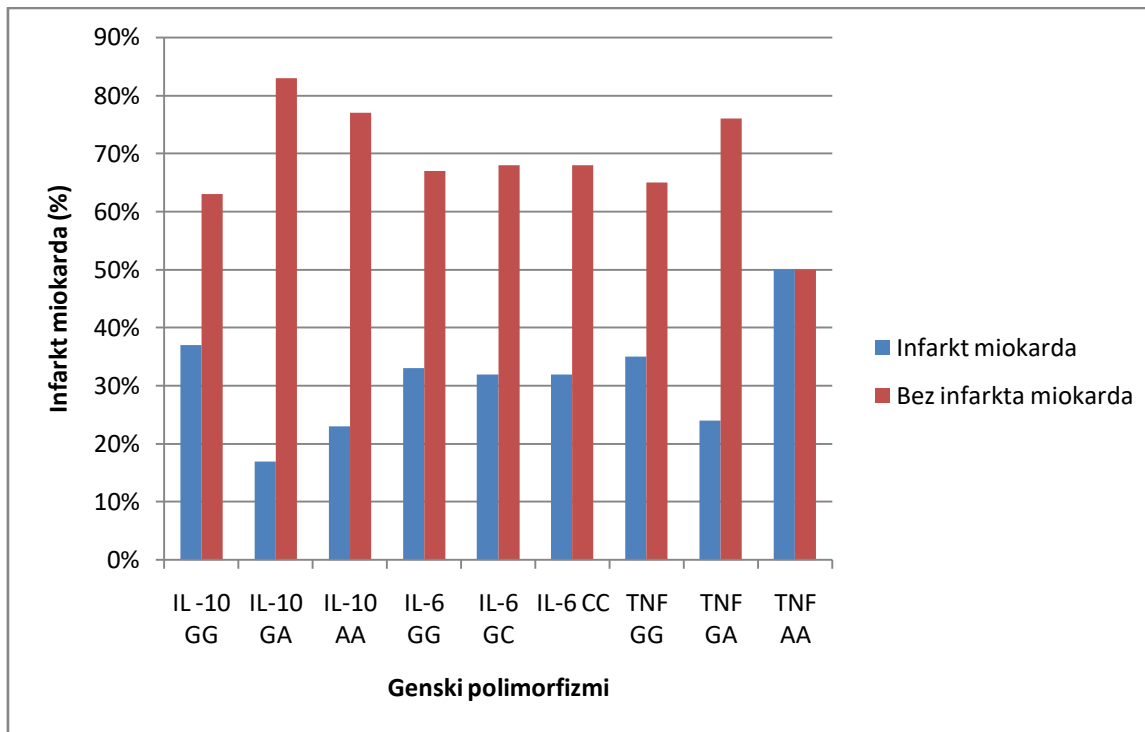
Godine starosti	62.8± 11.7
Pol	
Žene	77 (39.7%)
Muškarci	115 (59.3%)
Trajanje lečenja hemodijalizama u godinama	8.6±6.2
Uzrok bubrežne slabosti	
HTA	90 (46.4%)
DM	28 (14.4%)
GN	25 (12.9%)
PCBB	22 (11.3%)
Opstruktivna uropatija	21 (10.8%)
Endemska nefropatija	4 (2.1%)
Sistemske bolesti i vaskulitisi	2 (1%)
Drugo	2 (1%)
Komorbiditet	N (%)
KB	101 (52.1%)
CVI	40 (20.6%)
IM	63 (32.5%)
PVB	31 (16%)
HLK	58 (29.9%)
HLP	112 (57.7%)
HTA	182 (93.8%)
Srčane aritmije	45 (23.2%)

*DM- dijabetes melitus; GN- glomerulonefritis; PCBB- policistična bolest bubrega; KB- koronarna bolest; CVI- cerebrovaskularni insult; IM- infarkt miokarda; PVB- periferna vaskularna bolest; HLK- hipertrofija leve komore; HLP- hiperlipidemija; HTA- hipertenzija

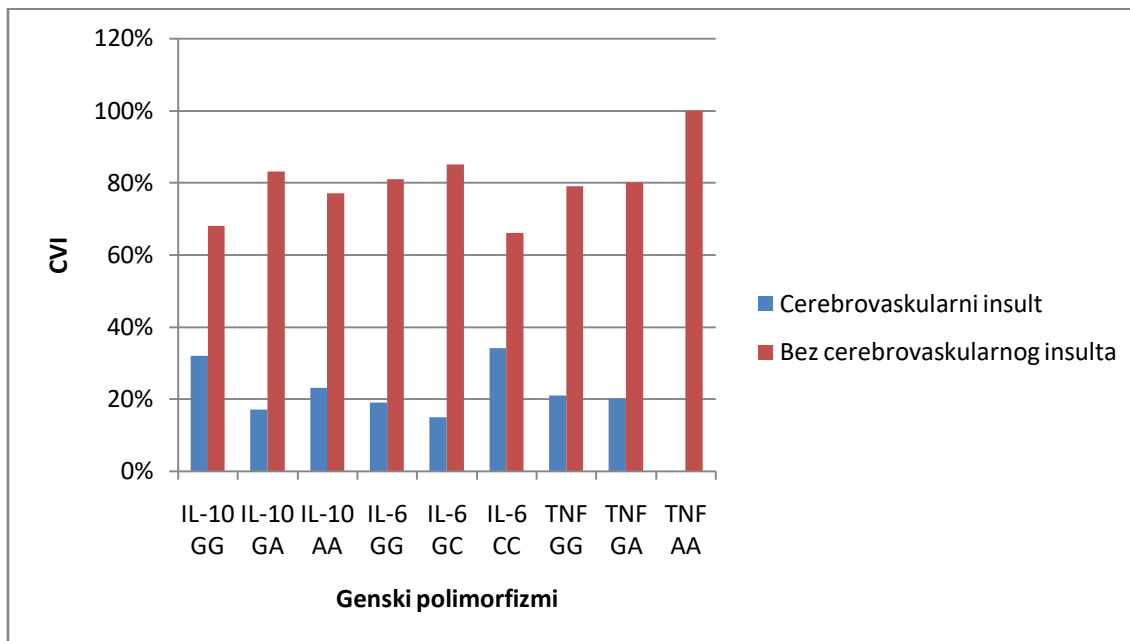
Rezultati su pokazali statistički značajnu povezanost genskog polimorfizma za IL-6 sa nastankom koronarne bolesti ($p=0.05$) i cerebrovaskularnog insulta ($p=0.03$), kao i povezanost genskog polimorfizma za IL-10 sa razvojem infarkta miokarda, takođe sa statističkom značajnošću ($p=0.04$)- Grafikoni 1-8.



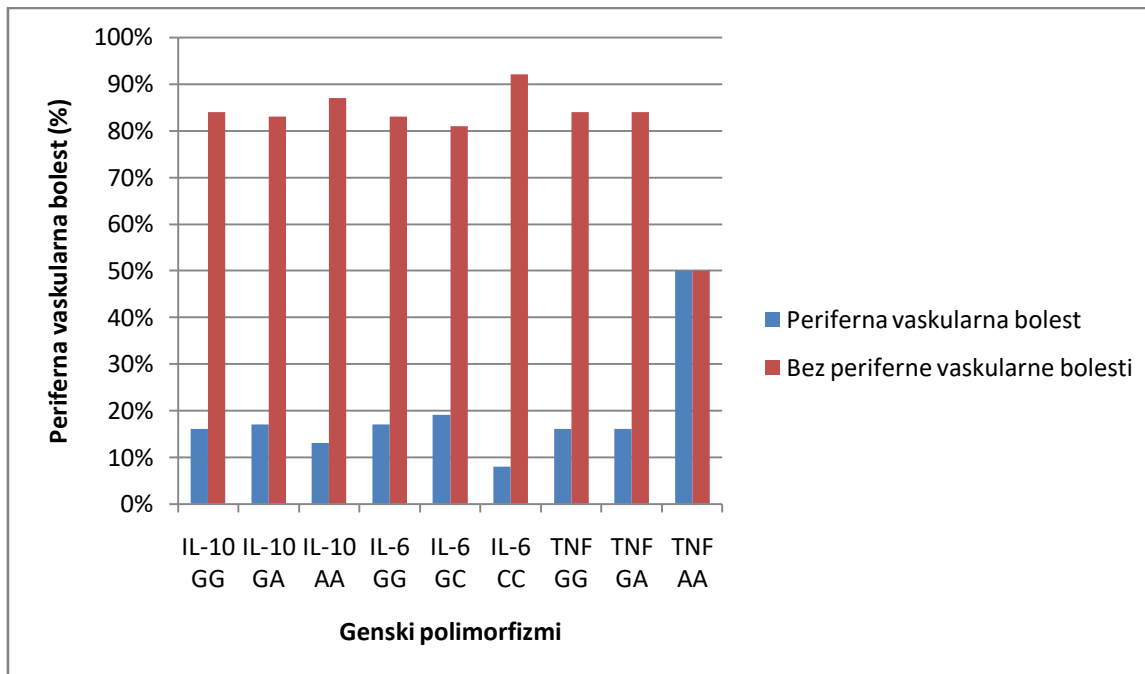
Grafikon 1. Povezanost genskih polimorfizama za IL-10, IL-6 I TNF sa koronarnom arterijskom bolešću



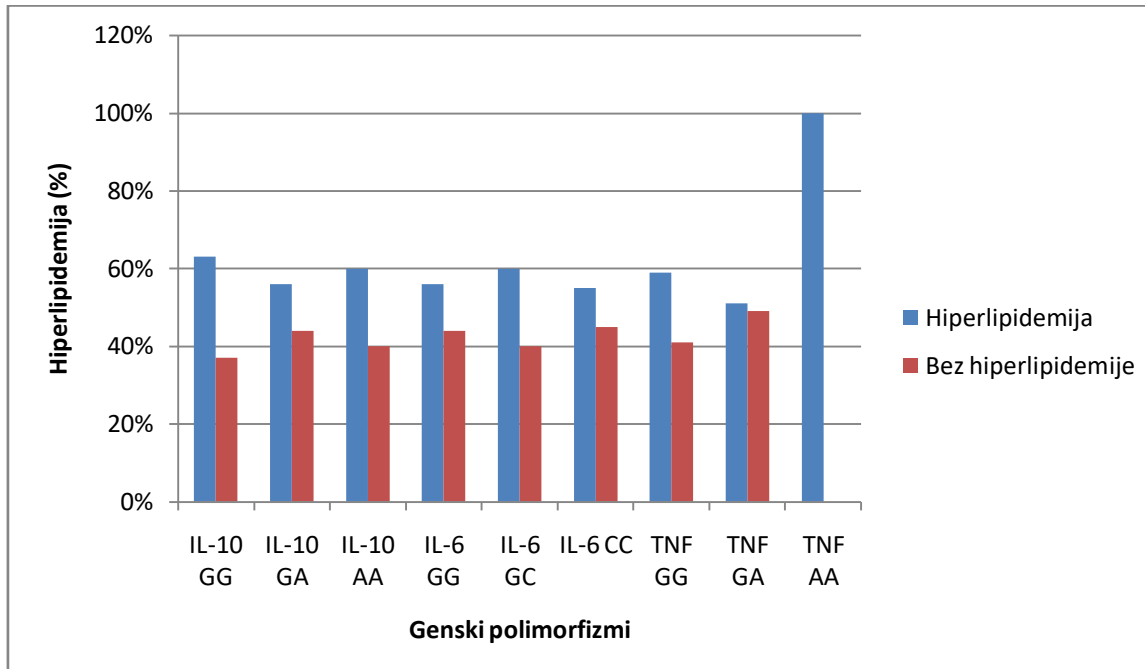
Grafikon 2. Povezanost genskih polimorfizama za IL-10, IL-6 i TNF sa infarktom miokada



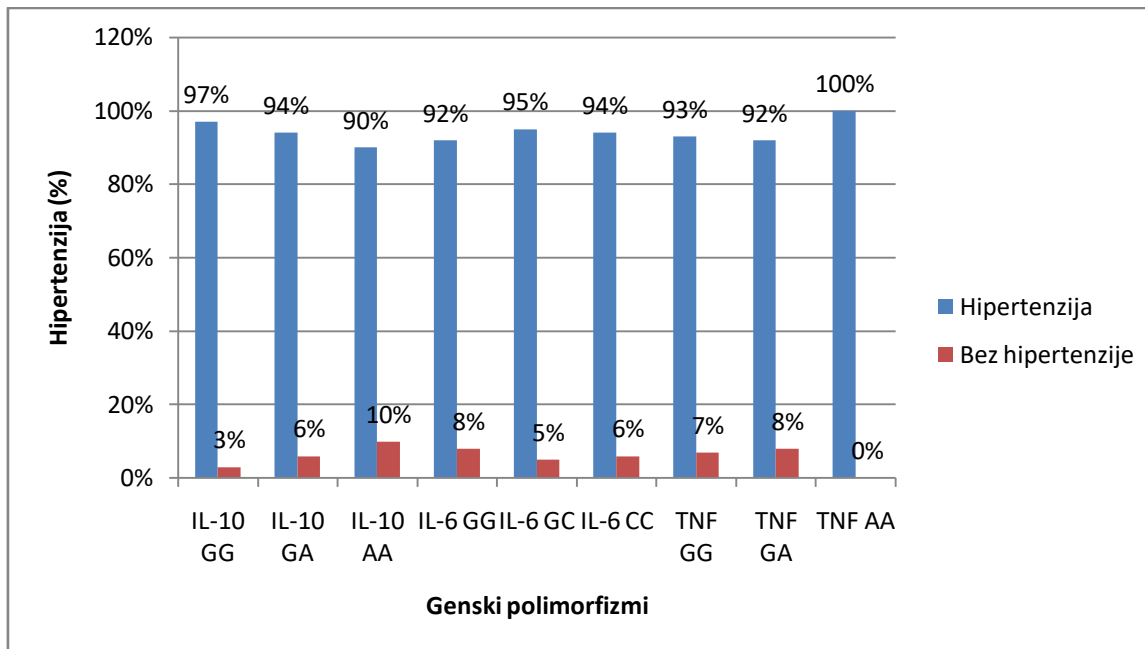
Grafikon 3. Povezanost genskih polimorfizama za IL-10, IL-6 i TNF sa cerebrovaskularnim insultom



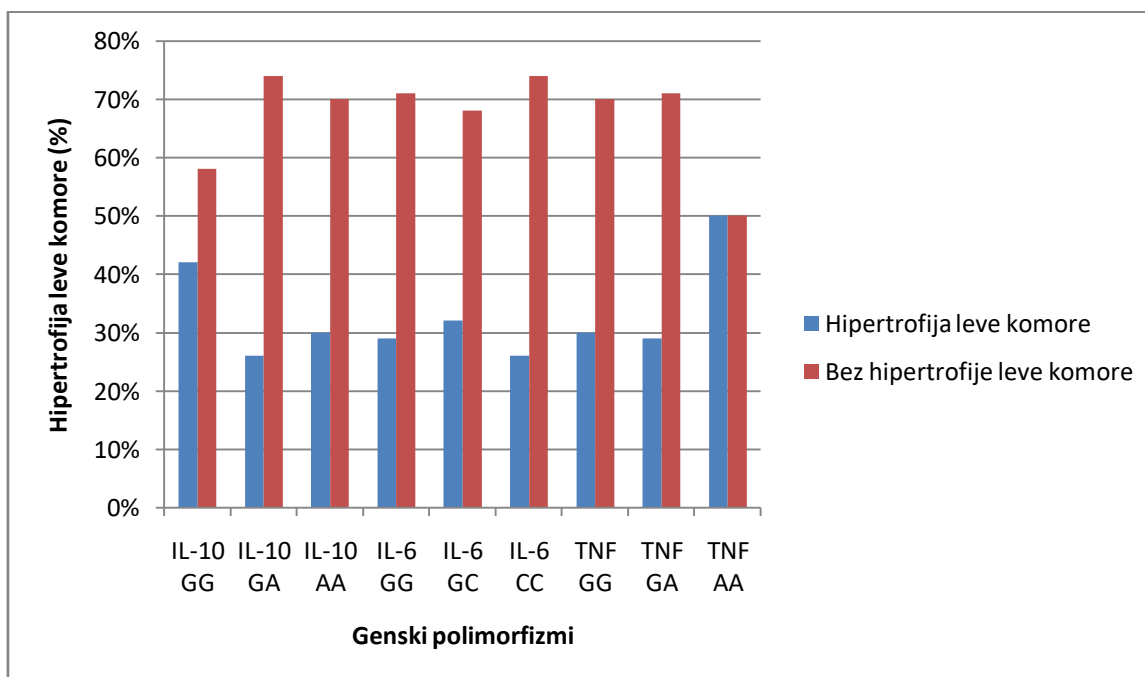
Grafikon 4. Povezanost genskih polimorfizama za IL-10, IL-6 I TNF sa perifernom vaskularnom bolešću



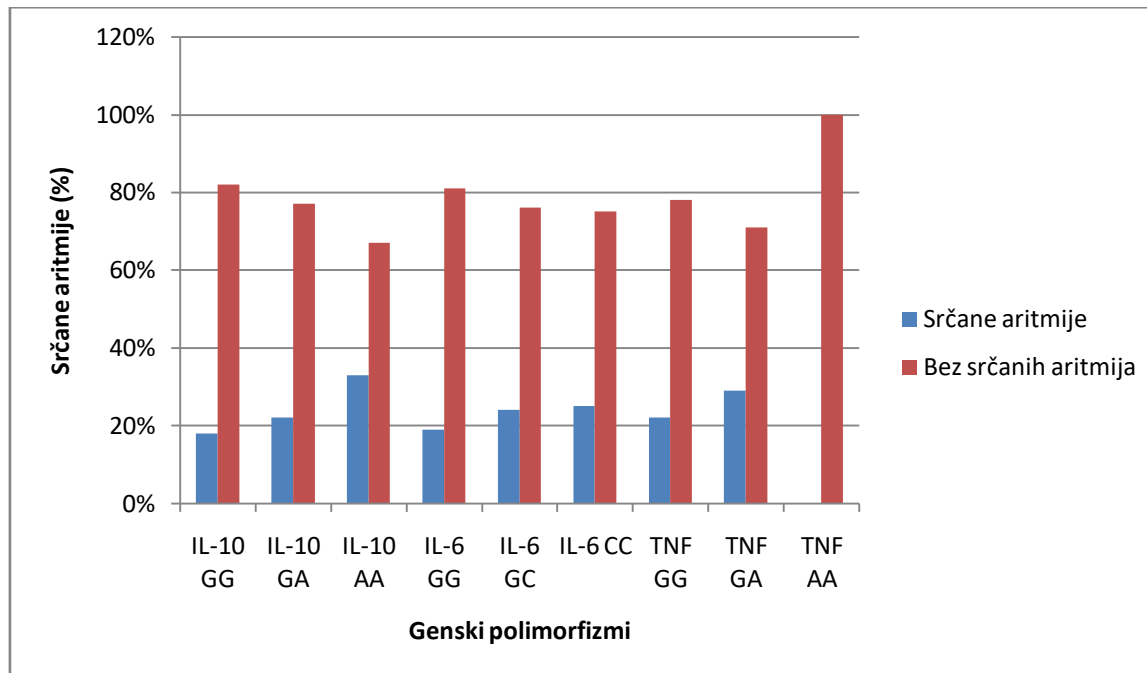
Grafikon 5. Povezanost genskih polimorfizama za IL-10, IL-6 i TNF sa hiperlipidemijom



Grafikon 6. Povezanost genskih polimorfizama za IL-10, IL-6 i TNF sa hipertenzijom



Grafikon 7. Povezanost genskih polimorfizama za IL-10, IL-6 i TNF sa hipertrofijom leve komore



Grafikon 8. Povezanost genskog polimorfizma za IL-10, IL-6 i TNF sa srčanim aritmijama

4.1.2. Relativni rizik za kardiovaskularne bolesti u odnosu na genske polimorfizme za IL-10, IL-6 i TNF

U odnosu na polimorfizam gena za IL-10, pokazano je da nosioci GG genotipa u ovoj grupi bolesnika imaju čak 5 puta manji rizik za nastanak koronarne arterijske bolesti sa statističkom značajnošću ($p= 0.05$). Ovaj rizik niži je u odnosu na AA homozigote, koji su predstavljeni kao referentna kategorija. Niži rizik u odnosu na AA genotip, GG homozigoti imaju i u pogledu nastanka infarkta miokarda, periferne arterijske bolesti i srčanih aritmija, međutim bez statističke značajnosti. Kontradiktorno, ovaj genotip nosi 3.5 puta viši rizik za nastanak hipertenzije i cerebrovaskularnog insulta u odnosu na referentnu kategoriju, međutim ovi rezultati su takođe bez statističke značajnosti. (Tabela 2.)

Tabela 2. Relativni rizik za nastanak kardiovaskularnih bolesti u odnosu na genski polimorfizam za IL-10

IL-10	GG			GA			AA*
	P	OR	95% CI	p	OR	95%CI	p
KB	0.05	0.18	0.03-1.07	0.6	0.69	0.17-2.83	0.12
IM	0.23	0.36	0.07-1.9	0.17	0.38	0.1-1.5	0.35
PVB	0.61	0.50	0.04-7.1	0.56	1.71	0.28-10.5	0.55
CVI	0.26	3.76	0.37-37.8	0.79	1.33	0.17-10.27	0.38
HLP	0.85	0.84	0.13-5.23	0.36	2.0	0.40-9.97	0.45
HTA	0.29	3.61	0.34-38.3	0.62	1.44	0.34-6.1	0.57
HLK	0.29	1.74	0.62-4.82	0.76	0.87	0.35-2.13	0.20
Aritmije	0.10	0.38	0.12-1.22	0.11	0.47	0.19-1.17	0.19

*referentna kategorija (OR=1)

*KB-koronarna arterijska bolest, IM-infarkt miokarda, PVB-periferna vaskularna bolest, CVI-cerebrovaskularni insult, HLP- hiperlipidemija, HTA- hipertenzija, HLK- hipertrofija leve komore

Kada je u pitanju polimorfizam gena za IL-6, statistički značajno niži rizik za pojavu cerebrovaskularnog insulta ($p= 0.007$) imaju heterozigoti u odnosu na CC homozigote, kao referentnu kategoriju. Ovaj rizik niži je čak 10 puta, što je u suprotnosti sa rezultatima za perifernu vaskularnu bolest, gde su heterozigoti i GG homozigoti pokazali skoro 4 puta viši rizik, ali bez statističke značajnosti. (Tabela 3.)

Tabela 3. Relativni rizik za kardiovaskularne bolesti u odnosu na genski polimorfizam za IL-6

IL-6	GG			GC			CC*
	p	OR	95% CI	p	OR	95%CI	P
KB	0.48	1.7	0.39-7.4	0.12	3.1	0.78-12.3	0.23
IM	0.93	0.93	0.2-4.3	0.99	1.0	0.25-4.05	0.99
PVB	0.41	2.76	0.25-30.9	0.26	3.83	0.37-39.9	0.53
CVI	0.29	0.39	0.07-2.27	0.007	0.096	0.017-0.53	0.21
HLP	0.54	0.58	0.1-3.28	0.296	0.43	0.09-2.1	0.57
HLK	0.64	1.24	0.49-3.14	0.43	1.37	0.62-3.02	0.74
HTA	0.83	0.84	0.17-4.14	0.72	1.31	0.29-5.81	0.82
Aritmije	0.31	0.56	0.22-1.62	0.83	0.91	0.41-2.06	0.55

*referentna kategorija (OR=1)

* KB-koronarna arterijska bolest, IM-infarkt miokarda, PVB-periferna vaskularna bolest, CVI-cerebrovaskularni insult, HLP- hiperlipidemija, HTA- hipertenzija, HLK- hipertrofija leve komore

Kada je u pitanju polimorfizam gena za TNF, zbog veoma malog procenta AA homozigota (1%), oni su posmatrani zajedno sa heterozigotima, a relativni rizik za nastanak kardiovaskularnih oboljenja računao se prema referentnoj kategoriji, tj GG homozigotima. Statistički značajno viši rizik kod nosioca A alela pokazan je u odnosu na pojavu hiperlipidemije, čak 6 puta ($p= 0.006$), viši rizik pokazan je i u odnosu na infarkt miokarda i cerebrovaskularni insult, ali bez statističke značajnosti. (Tabela 4.)

Tabela 4. Relativni rizik za kardiovaskularne bolesti u odnosu na genski polimorfizam za TNF

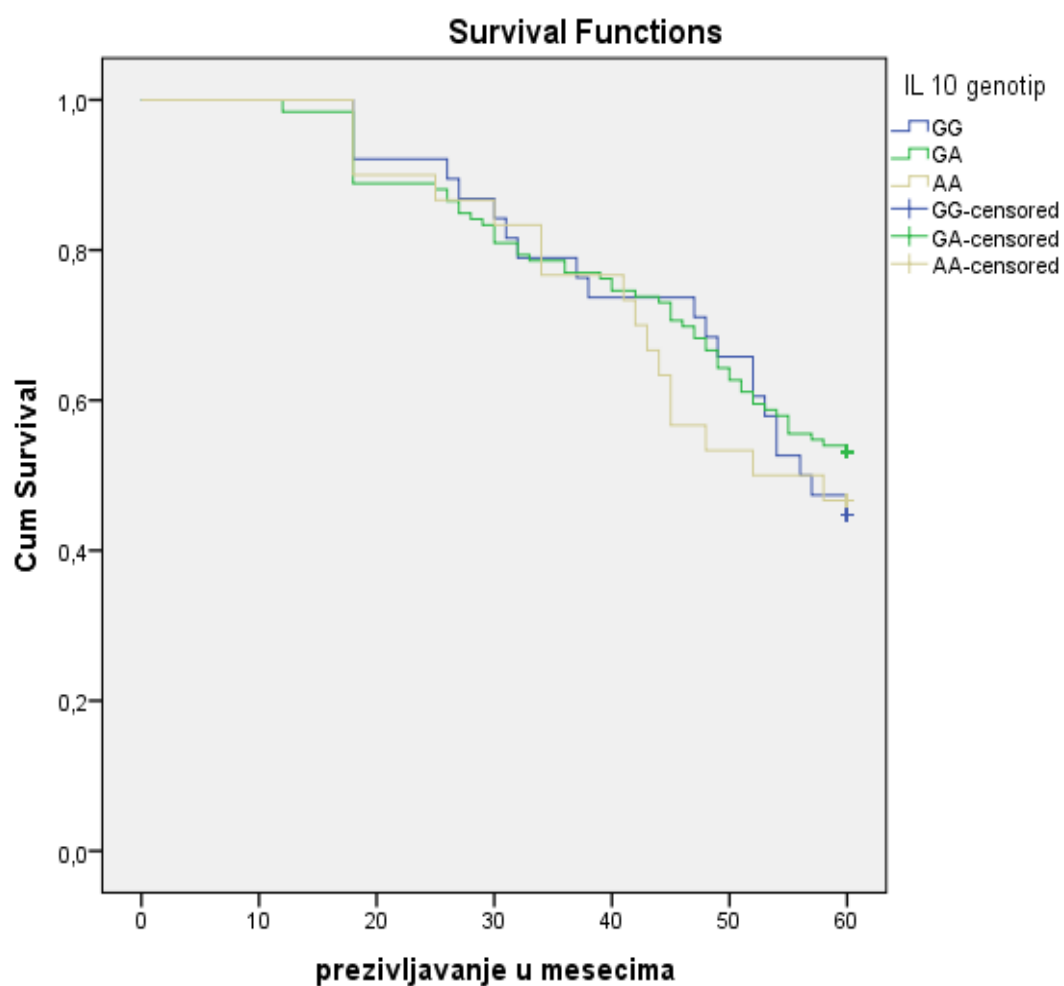
TNF	AA+GA		
	P	OR	95% CI
KB	0.98	1.0	0.36-2.9
IM	0.15	2.5	0.7-8.9
PVB	0.34	0.5	0.12-2.06
CVI	0.17	3.4	0.59-19.4
HLP	0.006	5.95	1.66-21.37
HLK	0.985	1.0	0.49-2.06
HTA	0.21	0.27	0.03-2.14
Aritmije	0.41	0.73	0.34-1.54

*referentna kategorija je GA+AA

* KB-koronarna arterijska bolest, IM-infarkt miokarda, PVB-periferna vaskularna bolest, CVI-cerebrovaskularni insult, HLP- hiperlipidemija, HTA- hipertenzija, HLK- hipertrofija leve komore

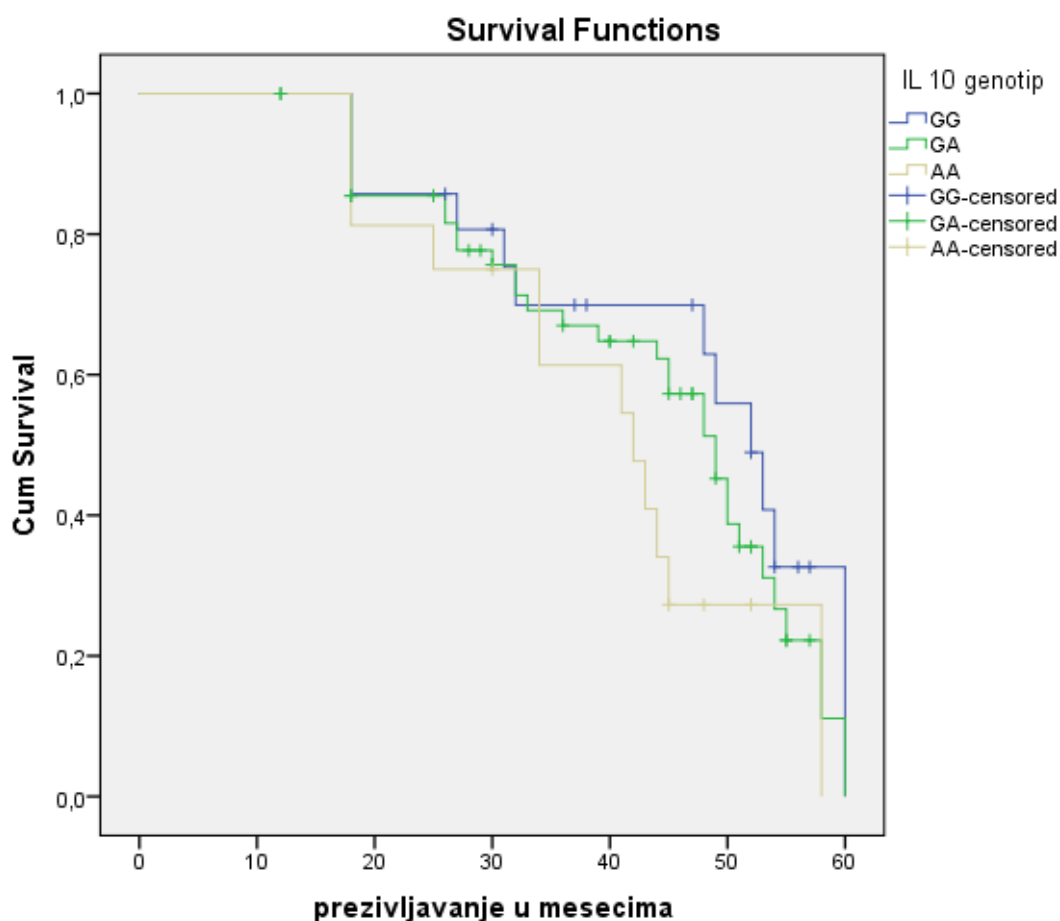
4.1.3. Ukupni i kardiovaskularni mortalitet u odnosu na genski polimorfizam za IL-6, IL-10 i TNF

Bolesnici kojima je rađena genotipizacija za IL-10, IL-6 i TNF praćeni su tokom ukupno 60 meseci od dana uzimanja analiza i registrovan je njihov ukupni i kardiovaskularni mortalitet u odnosu na određeni genotip.



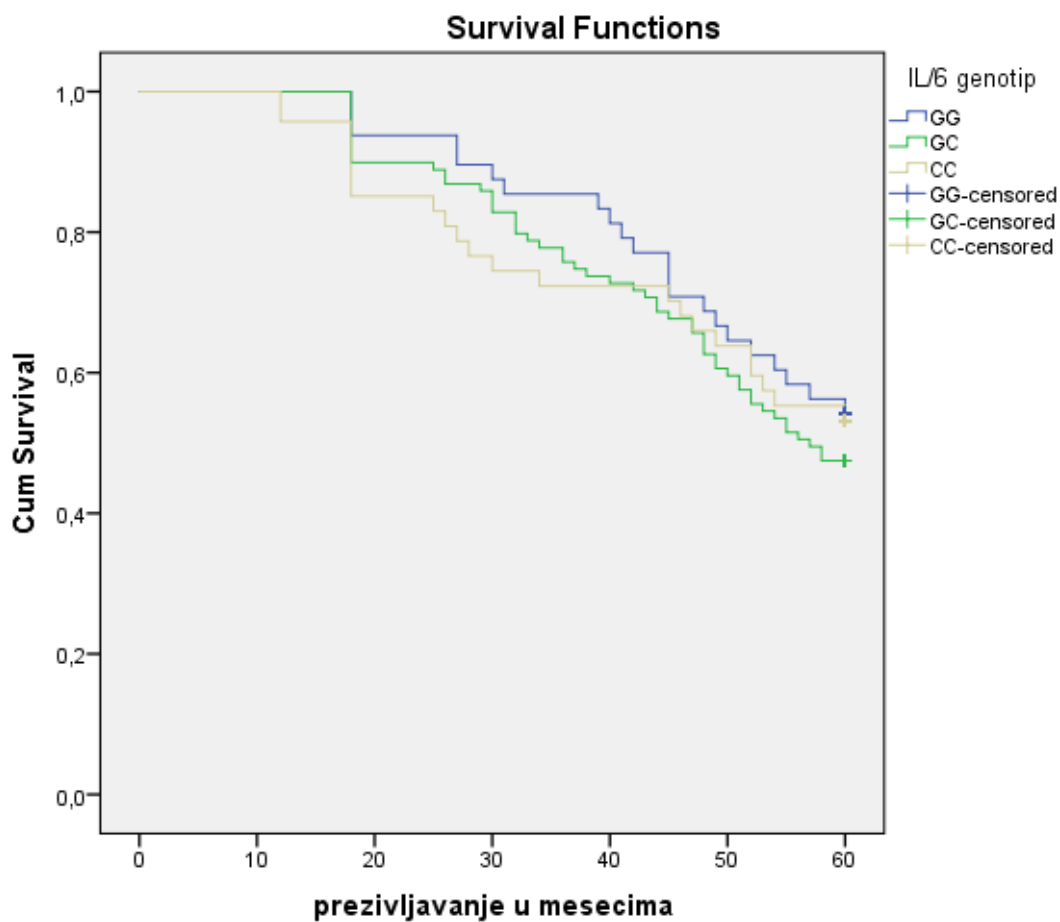
Grafikon 9. Ukupni mortalitet u odnosu na genski polimorfizam za IL-10

Na Grafikonu 9. prikazan je ukupni mortalitet u odnosu na genetski polimorfizam za IL-10, koji nije pokazao statistički značajnu razliku među genotipovima ($\chi^2=0.71$, $p=0.7$). Bolesnici sa GA genotipom imali su najveći procenat preživljavanja tokom praćenja od 60 meseci (53.4%), dok su GG homozigoti imali najlošije preživljavanje od 44.7%.



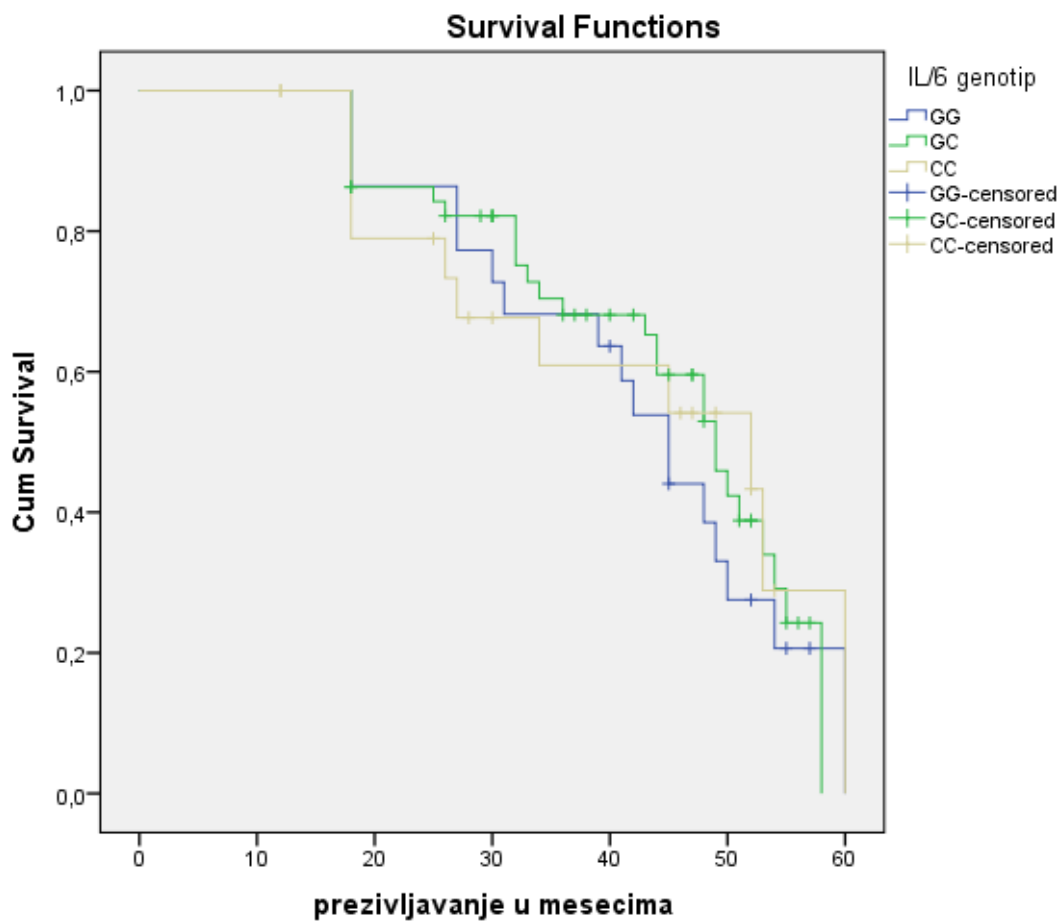
Grafikon 10. Kardiovaskularni mortalitet u odnosu na IL-10 genski polimorfizam

Mortalitet kardiovaskularnog porekla u odnosu na isti genski polimorfizam prikazan je na Grafikonu 10., takođe bez dokazane statističke značajnosti među bolesnicima sa različitim genotipom ($\chi^2=3.0$, $p=0.22$). Najbolju stopu preživljavanja pokazali su GG homozigoti (32.6%), a najlošiju AA homozigoti (0% posle 58 meseci).



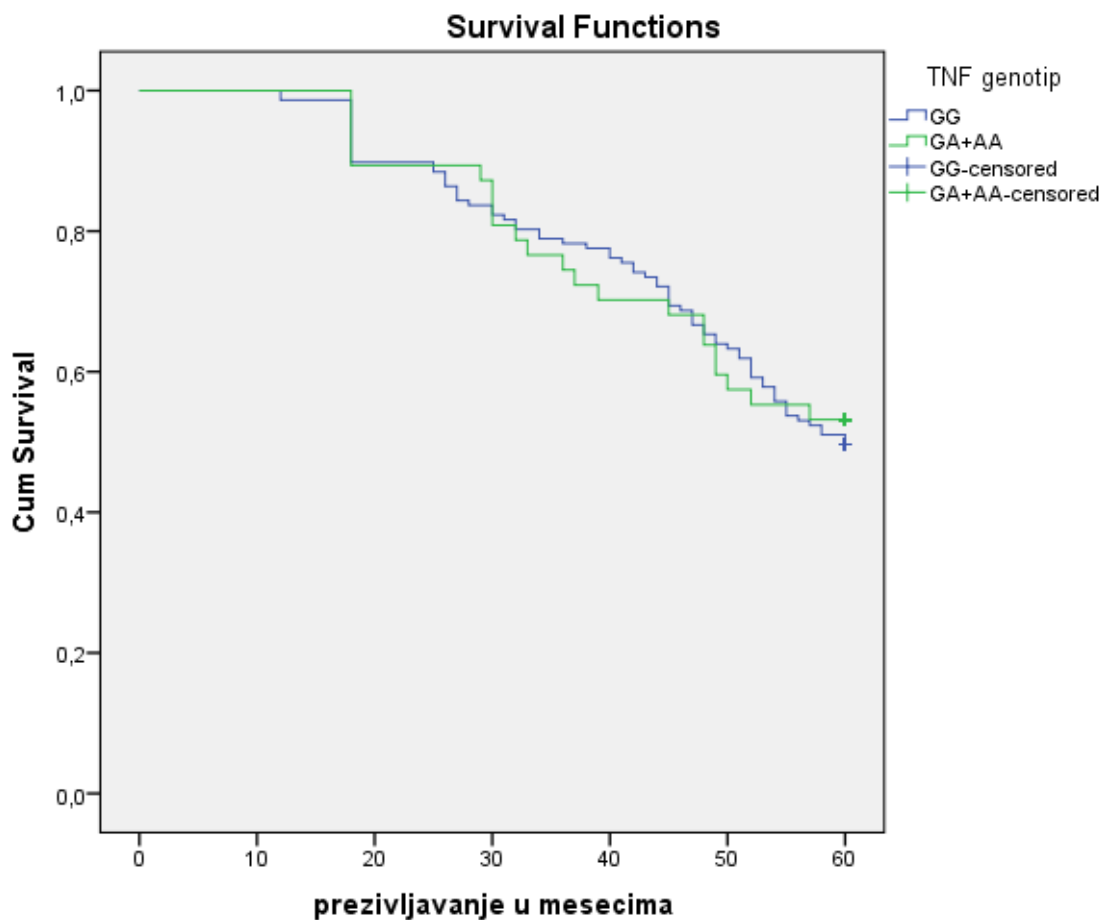
Grafikon 11. Ukupni mortalitet u odnosu na IL-6 genski polimorfizam

Ukupni mortalitet u odnosu na genski polimorfizam za IL-6 prikazan je na Grafikonu 11., gde se vidi da je najmanji mortalitet u grupi GG homozigota sa preživljavanjem od 54.2%, a najveći u grupi heterozigota sa preživljavanjem od 47.5%, međutim bez statističke značajnosti ($\chi^2=0.73$, $p=0.69$).



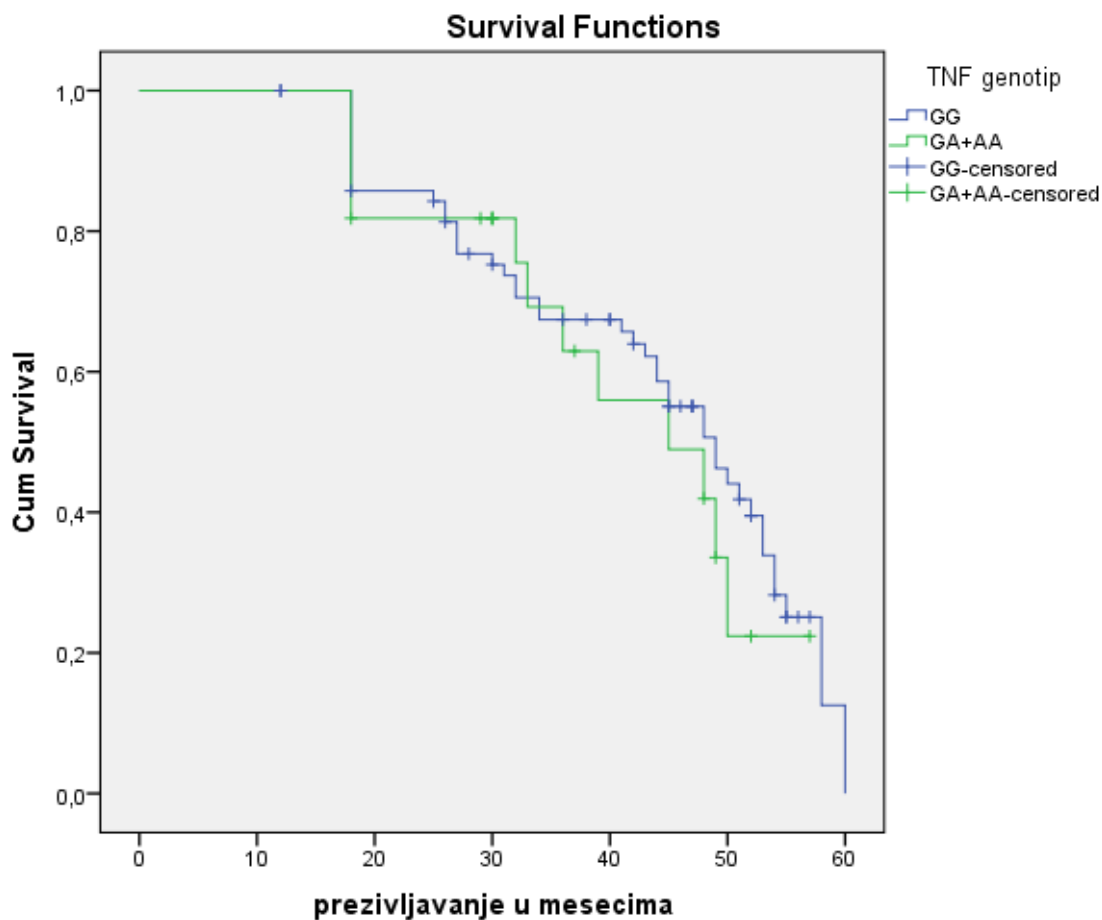
Grafikon 12. Kardiovaskularni mortalitet u odnosu na IL-6 genski polimorfizam

Kardiovaskularni mortalitet u odnosu na IL-6 genotip prikazan je na Grafikonu 12., gde su sva tri genotipa pokazala slično preživljavanje u odnosu na kardiovaskularne bolesti ($\chi^2=0.39$, $p=0.824$).



Grafikon 13. Ukupni mortalitet u odnosu na TNF genski polimorfizam

Odnos između ukupnog mortaliteta i TNF genskog polimorfizma prikazan je na Grafikonu 13., gde nema značajne razlike u preživljavanju između GG homozigota i nosioca A alela ($\chi^2=0.063$, $p=0.8$).



Grafikon 14. Kardiovaskularni mortalitet u odnosu na TNF genski polimorfizam

Kada je u pitanju kardiovaskularni mortalitet GG homozigoti imaju lošije preživljavanje (0%) u odnosu na nosioce alela A (22.4%), međutim bez statističke značajnosti ($\chi^2 = 0.358$, $p = 0.55$), što je prikazano na Grafikonu 14.

4.2. Povezanost genskog polimorfizma za MMP3, ACE i eNOS sa kardiovaskularnim bolestima kod bolesnika na hemodijalizi

Genotipizacija za MMP3, ACE i eNOS urađena je kod 200 bolesnika, od čega je tokom studije prekinuto praćenje za 16 bolesnika. Od ukupno 184 bolesnika u odnosu na polimorfizam gena za MMP3 najmanje je bilo 5A homozigota (12, tj 6.5%), 6A homozigota je bilo 43 (23.4%), dok su heterozigoti bili najbrojniji (129, tj 70.1%). Heterozigoti I/D su bili najbrojniji i u odnosu na genski polimorfizam za ACE (99, tj 53.8%), D/D homozigota bilo je 67 (36.4%), dok je I/I homozigota bilo svega 18 (9.8%). U odnosu na eNOS genski polimorfizam takođe je najviše registrovano heterozigota GT (109, tj 59.2%), TT homozigota 59 (32.1%), dok je GG homozigota bilo svega 16 (8.7%). Opšte karakteristike bolesnika prikazane su u Tabeli 5.

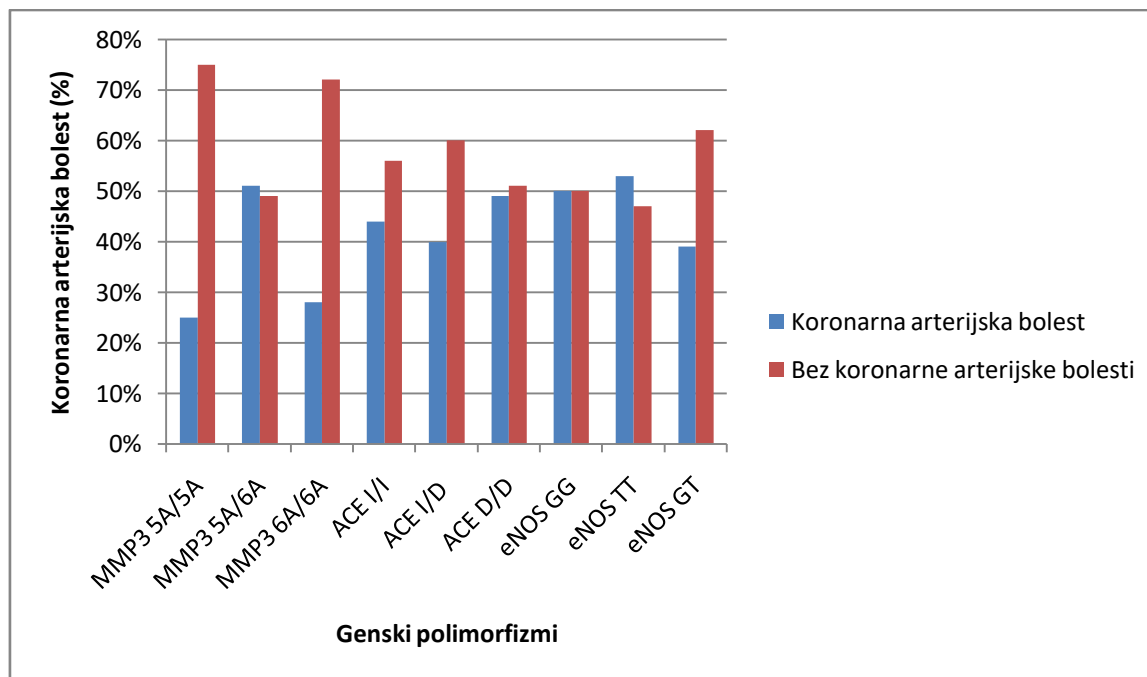
Tabela 5. Opšte karakteristike bolesnika

Godine starosti	63.7± 11.1
Pol	
Žene	81 (44%)
Muškarci	103 (56%)
Trajanje lečenja hemodijalizama u godinama	10.97± 6.18
Uzrok bubrežne slabosti	
HTA	96 (52.2%)
DM	24 (13%)
GN	21 (11.4%)
PCBB	20 (10.9%)
Opstruktivna uropatija	13 (7.1%)
Endemska nefropatija	5 (2.7%)
Sistemske bolesti i vaskulitisi	3 (1.6%)
Drugo	2 (1.1%)
Komorbidity	
KB	81 (44%)
CVI	39 (21.2%)
IM	81 (44%)
PVB	30 (16.3%)
HLK	66 (35.9%)
HLP	104 (56.5%)
HTA	171 (92.9%)
Srčane aritmije	55 (29.9%)

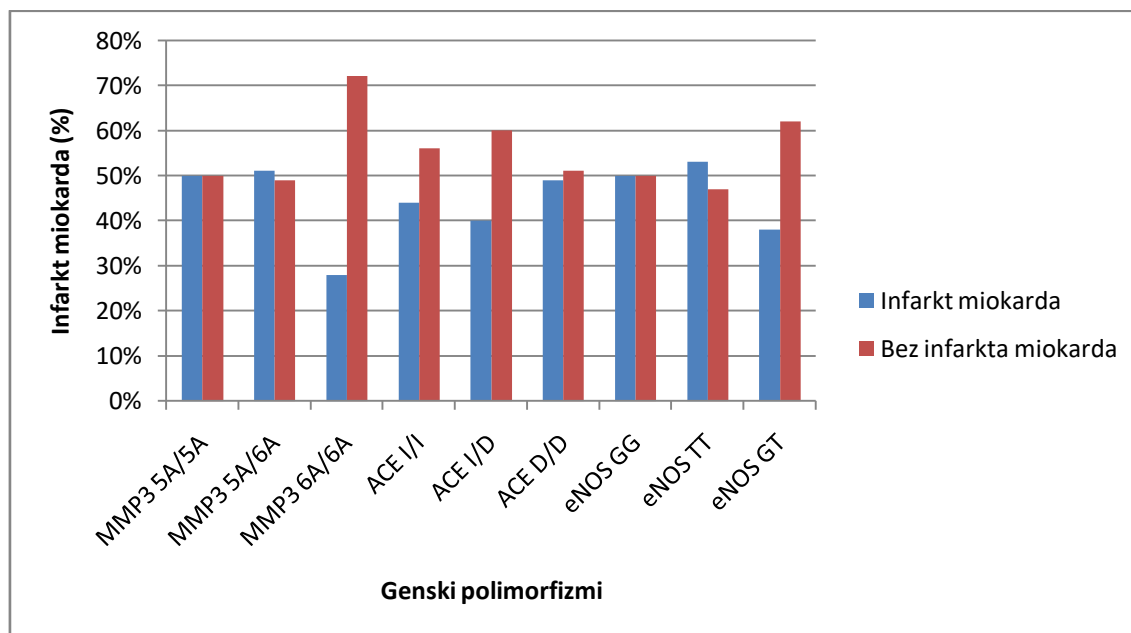
*DM- dijabetes melitus; GN- glomerulonefritis; PCBB- policistična bolest bubrega; KB- koronarna bolest; CVI- cerebrovaskularni insult; IM- infarkt miokarda; PVB- periferna vaskularna bolest; HLK- hipertrofija leve komore; HLP- hiperlipidemija; HTA- hipertenzija

Rezultati istraživanja pokazali su statistički značajnu povezanost MMP3 genskog polimorfizma sa nastankom koronarne arterijske bolesti i srčanih aritmija, dok genski polimorfizmi za ACE i eNOS nisu pokazali statistički značajne razlike između različitih genotipova po pitanju kardiovaskularnih bolesti (koronarna arterijska bolest, infarkt miokarda, cerebrovaskularni insult,

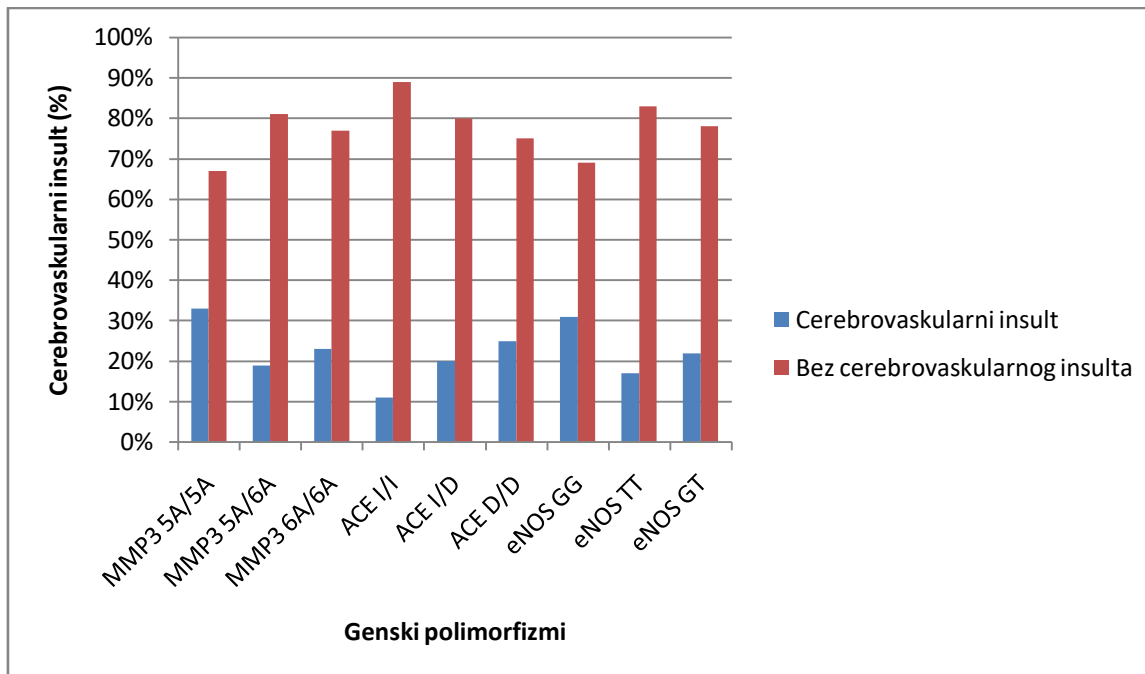
periferna vaskularna bolest, hiperlipidemija, hipertenzija, hipertrofija leve komore I srčane aritmije)- Grafikoni 15-22.



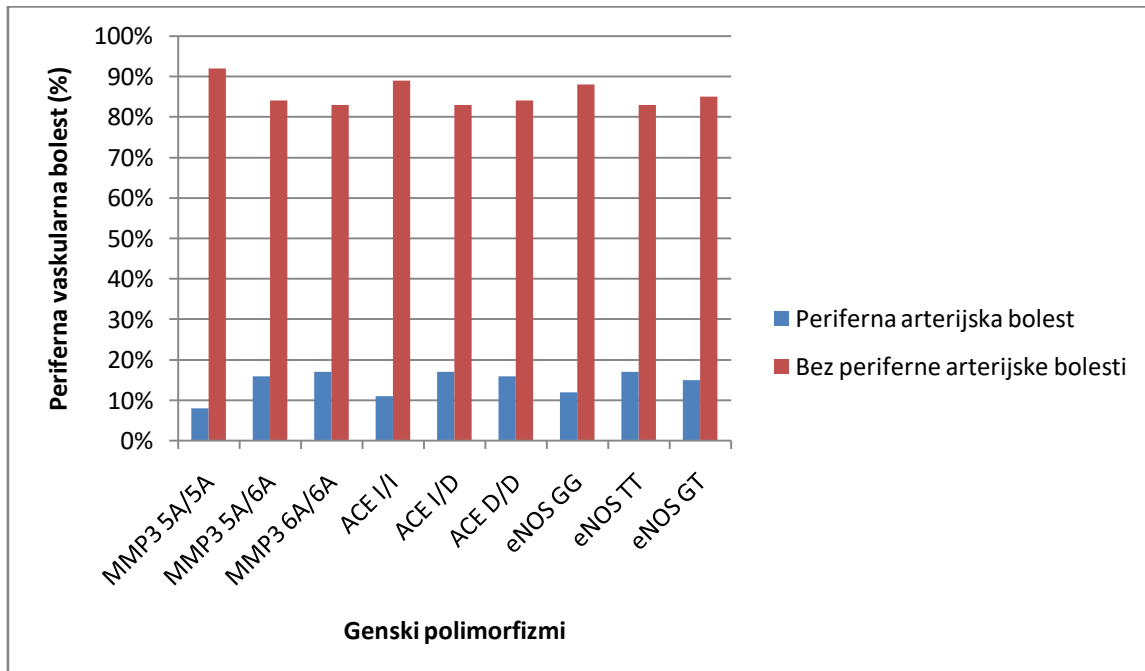
Grafikon 15. Povezanost genskih polimorfizama za MMP3, ACE i eNOS sa koronarnom arterijskom bolešću



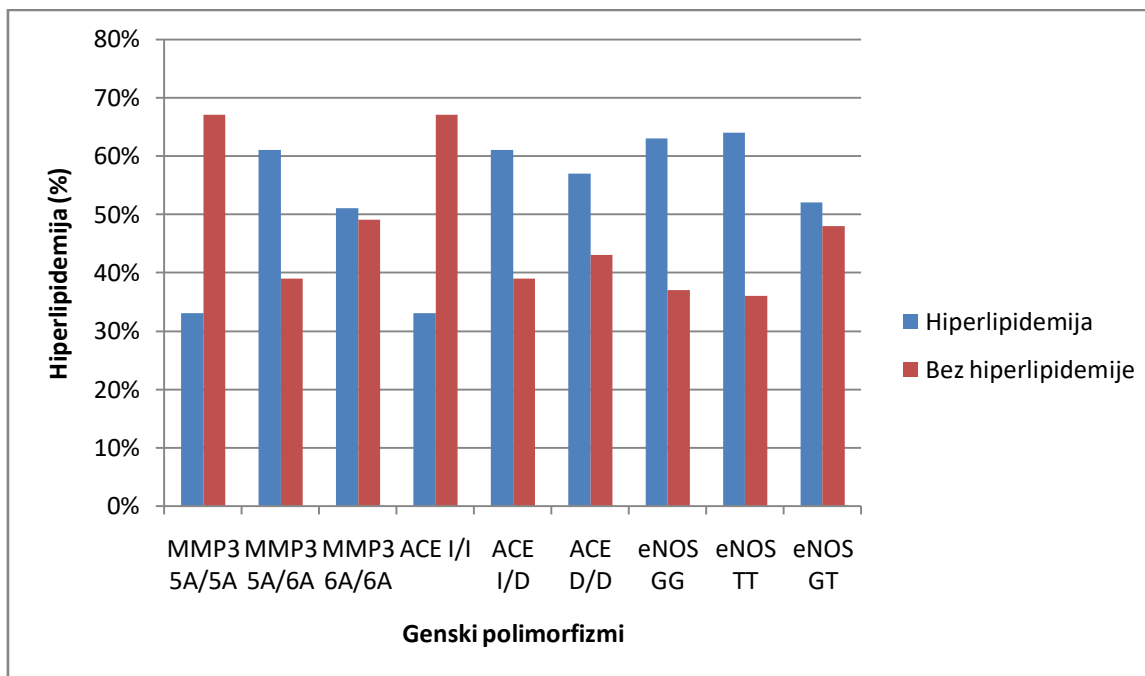
Grafikon 16. Povezanost genskog polimorfizma za MMP3, ACE i eNOS sa infarktomiokarda



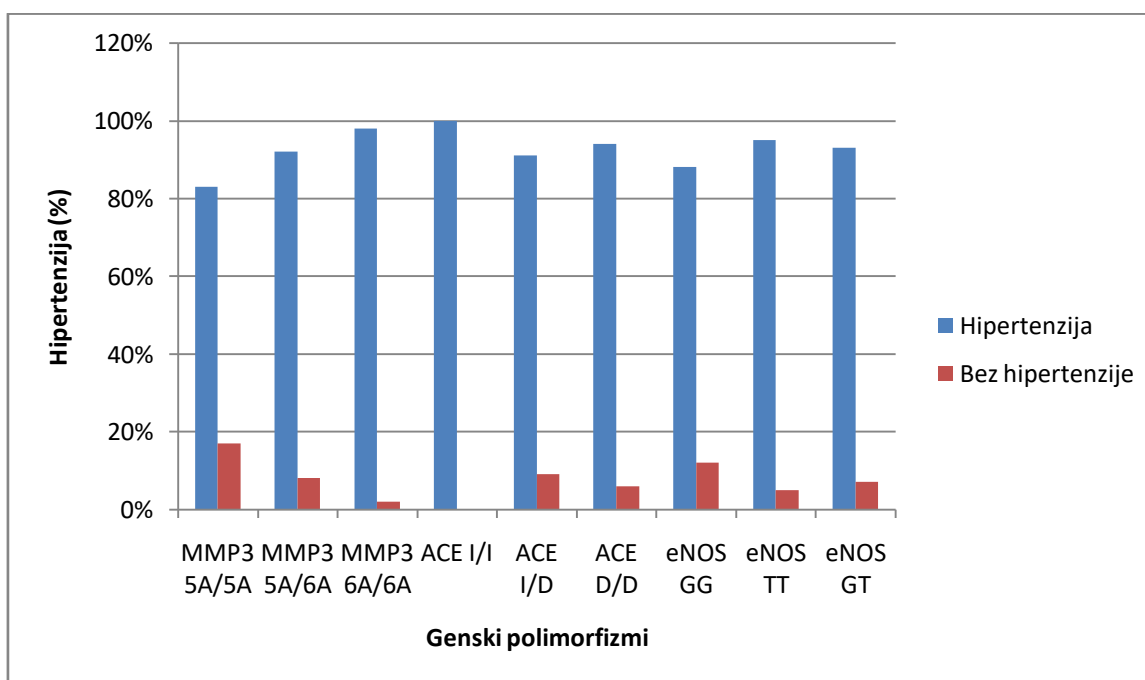
Grafikon 17. Povezanost genskih polimorfizama za MMP3, ACE i eNOS sa cerebrovaskularnim insultom



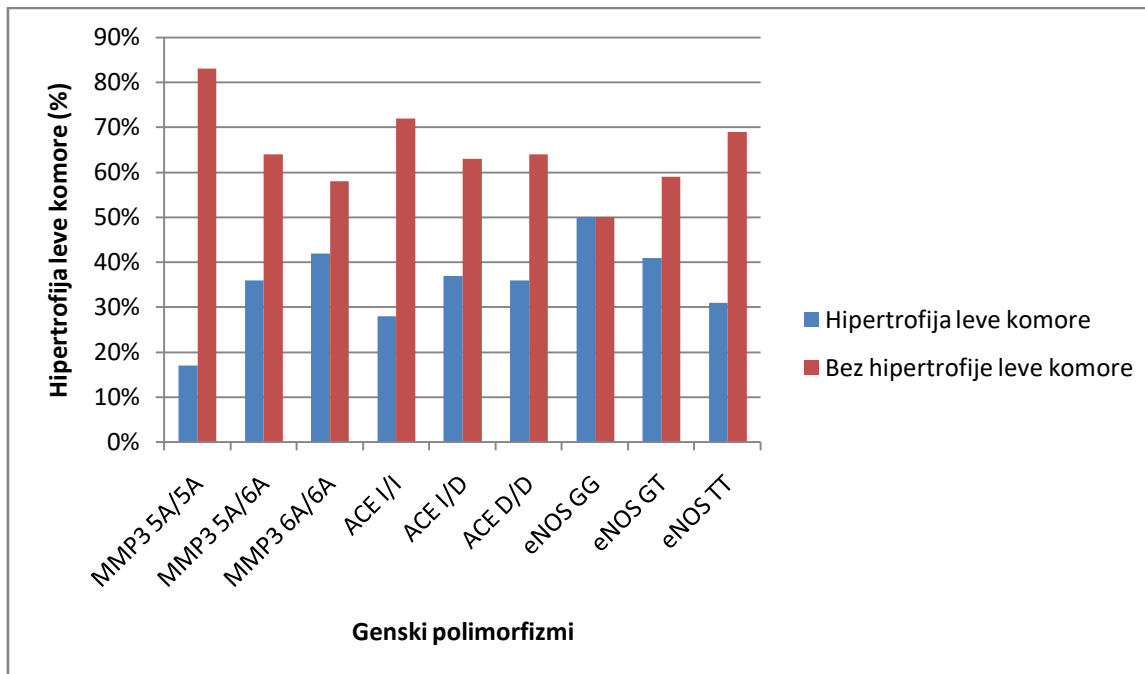
Grafikon 18. Povezanost genskih polimorfizama za MMP3, ACE i eNOS sa perifernom arterijskom bolešću



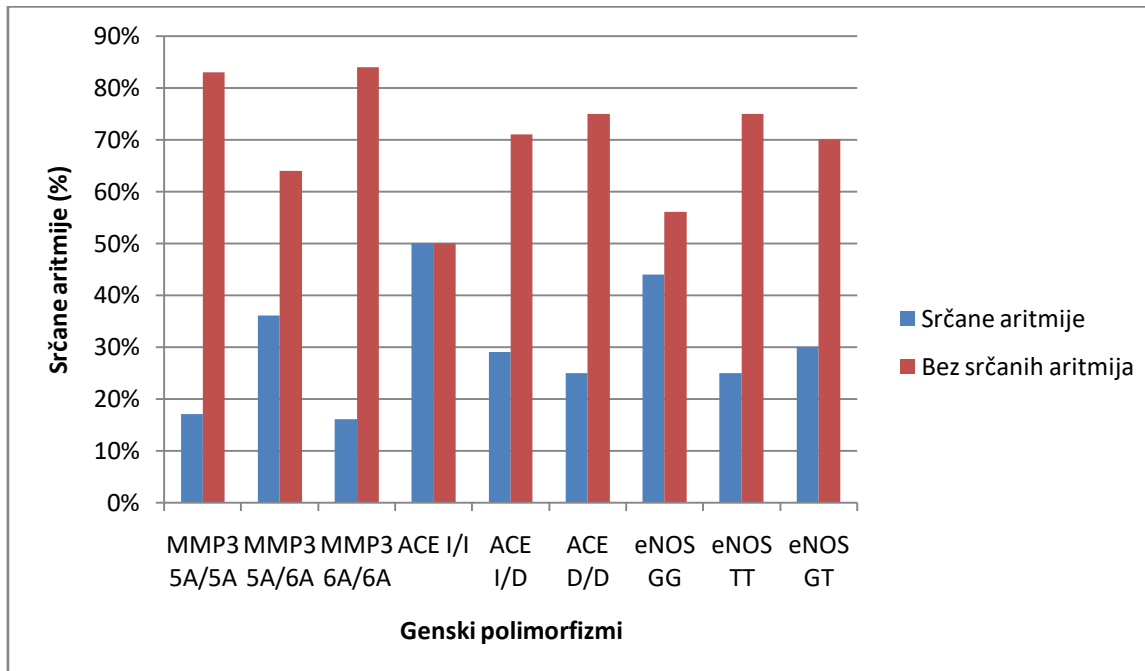
Grafikon 19. Povezanost genskih polimorfizama za MMP3, ACE i eNOS sa hiperlipidemijom



Grafikon 20. Povezanost genskih polimorfizama za MMP3, ACE i eNOS sa hipertenzijom



Grafikon 21. Povezanost genskih polimorfizama za MMP3, ACE i eNOS sa hipertrofijom leve komore



Grafikon 22. Povezanost genskih polimorfizama za MMP3, ACE i eNOS sa srčanim aritmijama

Heterozigoti za MMP3 gen u odnosu na 6A homozigote pokazali su 3 puta viši rizik za nastanak koronarne arterijske bolesti i srčanih aritmija sa statističkom značajnošću ($p= 0.004$ i $p= 0.02$). Nosioi 5A/5A genotipa imali su skoro duplo veći rizik za nastanak infarkta miokarda u odnosu na 6A homozigote, međutim bez statističke značajnosti (Tabela 6).

Tabela 6. Relativni rizik za kardiovaskularne bolesti u odnosu na genski polimorfizam za MMP3

MMP3	5A/5A			5A/6A			6A/6A*
	p	OR	95% CI	P	OR	95% CI	p
KB	0.91	1.1	0.24 - 4.93	0.004	3.1	1.45 - 6.81	0.007
IM	0.38	1.8	0.48 - 6.75	0.44	1.3	0.65 - 2.7	0.62
PVB	0.39	0.4	0.04 - 3.45	0.74	0.9	0.35 - 2.13	0.69
CVI	0.55	1.6	0.37 - 6.47	0.62	0.8	0.35 - 1.88	0.58
HLP	0.3	0.5	0.12 - 1.91	0.2	1.6	0.77 - 3.24	0.11
HLK	0.17	0.3	0.06 - 1.63	0.54	0.8	0.39 - 1.63	0.38
HTA	0.12	0.13	0.01 - 1.7	0.26	0.3	0.04 - 2.4	0.29
Aritmije	0.8	1.25	0.22 - 7.27	0.02	2.9	1.2 - 7.3	0.05

*referentna kategorija (OR=1)

* KB-koronarna arterijska bolest, IM-infarkt miokarda, PVB-periferna vaskularna bolest, CVI-cerebrovaskularni insult, HLP- hiperlipidemija, HTA- hipertenzija, HLK- hipertrofija leve komore

U odnosu na D/D genotip ACE polimorfizma, kao referentnu kategoriju, I/I homozigoti su pokazali statistički značajno ($p=0.05$) veći rizik za razvoj srčanih aritmija, dok je ista grupa bolesnika imala niži rizik za nastanak cerebrovaskularnog insulta, hiperlipidemije, hipertrofije leve komore i periferne vaskularne bolesti (Tabela 7.)

U odnosu na polimorfizam gena za eNOS, TT homozigoti pokazali su dva puta veći rizik za nastanak koronarne bolesti u odnosu na heterozigote (Tabela 8).

Tabela 7. Relativni rizik za kardiovaskularne bolesti u odnosu na ACE genski polimorfizam

ACE	I/I			I/D			D/D*
	p	OR	95% CI	P	OR	95%CI	p
KB	0.69	0.8	0.27 – 2.4	0.15	0.62	0.32 – 1.2	0.36
IM	0.87	1.1	0.38 – 3.2	0.86	0.94	0.5 – 1.8	0.95
PVB	0.55	0.61	0.12 – 3.07	0.96	1.0	0.44 – 2.39	0.81
CVI	0.25	0.39	0.08 – 1.92	0.59	0.81	0.38 – 1.73	0.5
HLP	0.08	0.37	0.12 – 1.11	0.63	1.18	0.61 – 2.27	0.1
HLK	0.61	0.74	0.23 – 2.37	0.69	1.15	0.59 – 2.24	0.72
Aritmije	0.05	2.95	0.96 – 9.05	0.55	1.25	0.6 – 2.6	0.16

*referentna kategorija (OR=1)

* KB-koronarna arterijska bolest, IM-infarkt miokarda, PVB-periferna vaskularna bolest, CVI-cerebrovaskularni insult, HLP- hiperlipidemija, HTA- hipertenzija, HLK- hipertrofija leve komore

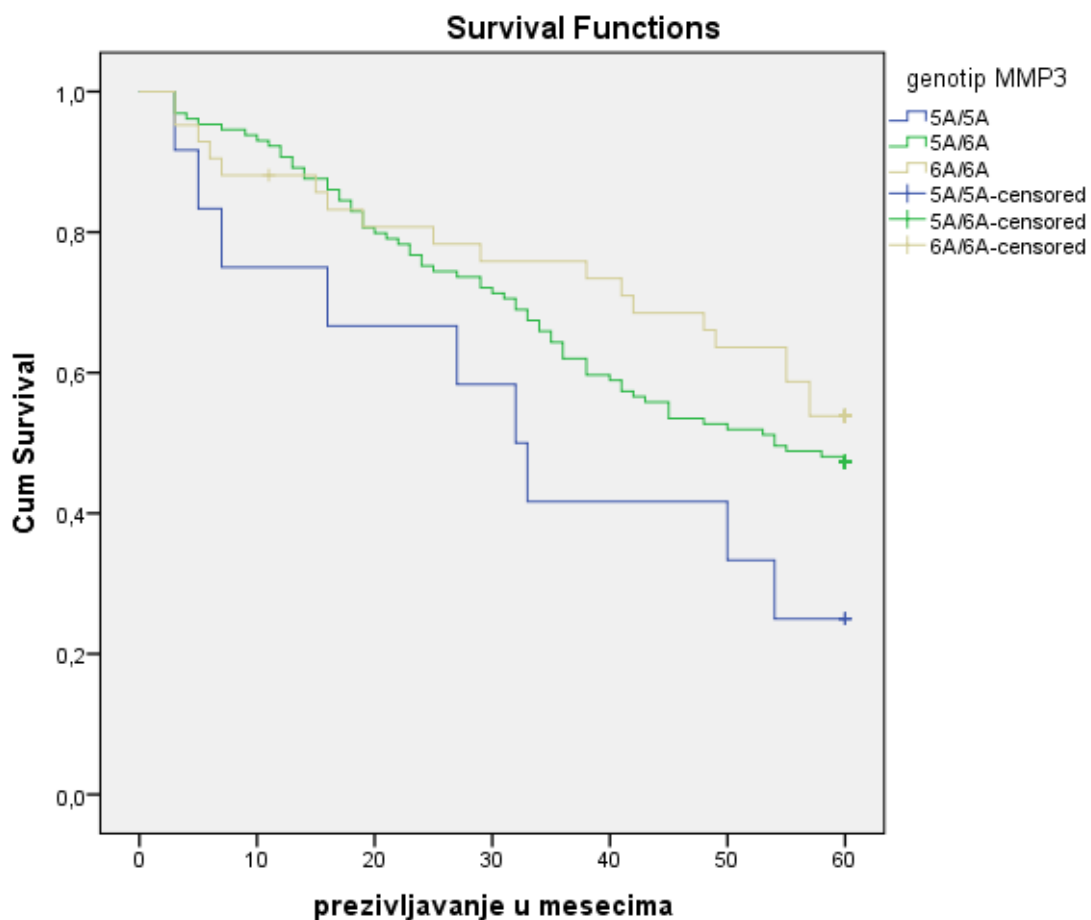
Tabela 8. Relativni rizik za kardiovaskularne bolesti u odnosu na genski polimorfizam za eNOS

eNOS	GG			TT			GT*
	p	OR	95% CI	P	OR	95%CI	p
KB	0.47	1.5	0.49 – 4.6	0.05	1.96	0.99 – 3.9	0.15
IM	0.42	1.6	0.53- 4.6	0.21	1.5	0.79 – 2.9	0.4
PVB	0.66	0.7	0.14 – 3.45	0.77	1.1	0.49 – 2.66	0.84
CVI	0.48	1.5	0.47 – 5.03	0.42	0.7	0.31 – 1.63	0.47
HLP	0.55	1.4	0.46 – 4.36	0.27	1.5	0.74 – 2.9	0.51
HLK	0.2	2.0	0.69 – 6.0	0.36	1.4	0.7 – 2.7	0.36
HTA	0.33	0.4	0.07- 2.44	0.64	1.39	0.34 – 5.64	0.48
Aritmije	0.17	2.2	0.72 – 6.9	0.75	0.89	0.42 – 1.86	0.31

referentna kategorija (OR=1) KB-koronarna arterijska bolest, IM-infarkt miokarda, PVB-periferna vaskularna bolest, CVI-cerebrovaskularni insult, HLP- hiperlipidemija, HTA- hipertenzija, HLK- hipertrofija leve komore

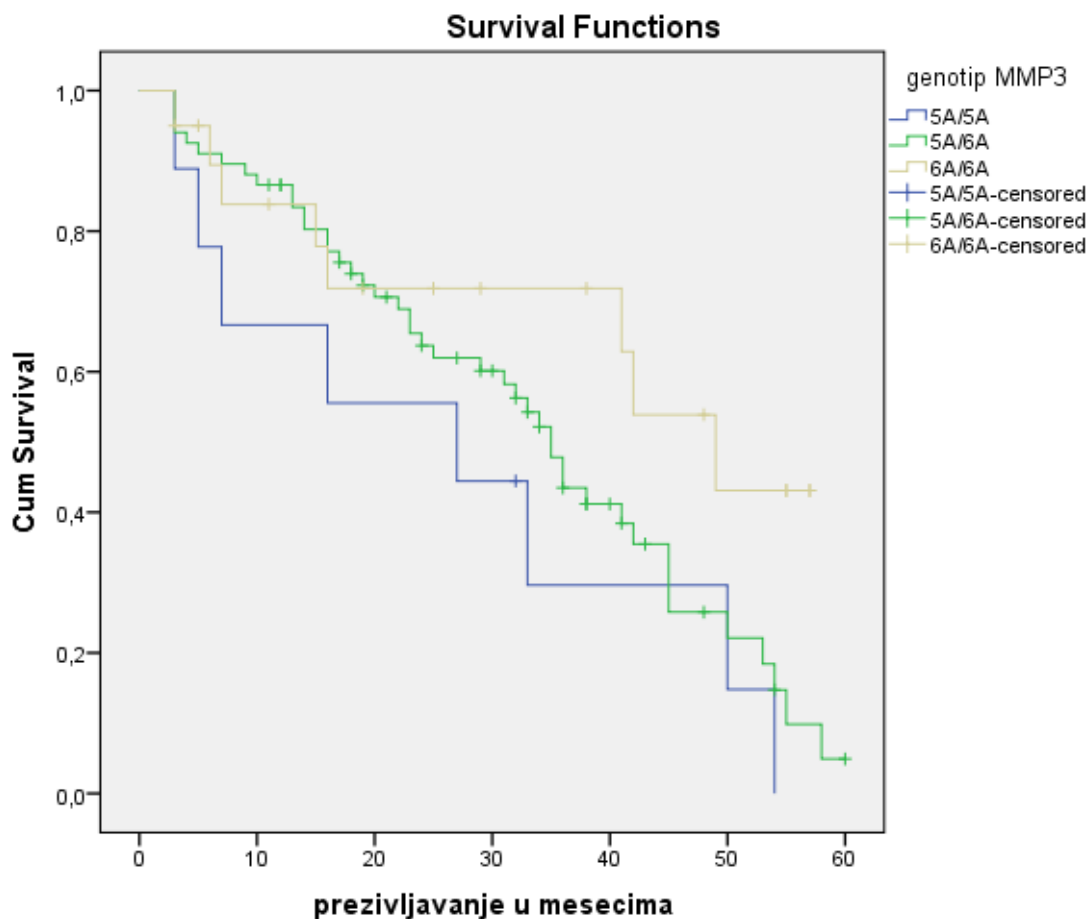
4.3. Povezanost ukupnog i kardiovaskularnog mortaliteta sa genskim polimorfizmom za ACE, MMP3 i eNOS

Bolesnici kojima je odredivan genotip za MMP3, ACE i eNOS praćeni su 60 meseci i njihovo preživljavanje tokom ovog vremena posmatrano je u odnosu na pojedinačne genske polimorfizme.



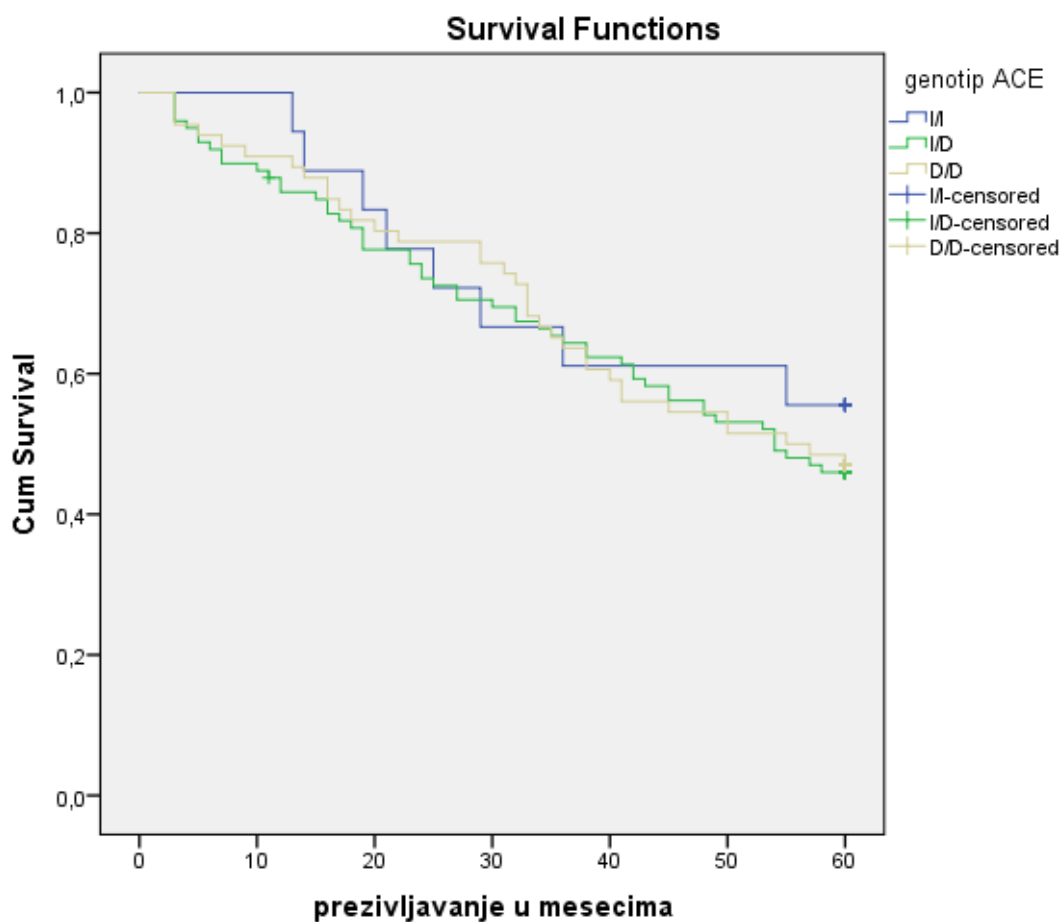
Grafikon 23. Ukupni mortalitet u odnosu na MMP3 genski polimorfizam

Na Grafikonu 23. prikazan je ukupni mortalitet u odnosu na genski polimorfizam za MMP3, gde su 6A homozigoti pokazali najbolje preživljavanje sa prosečno 46,2 meseca, a 5A homozigoti najlošije sa 33,9 meseci preživljavanja. Ipak, ove razlike nisu statistički značajne ($\chi^2=4,28$, $p=0.12$).



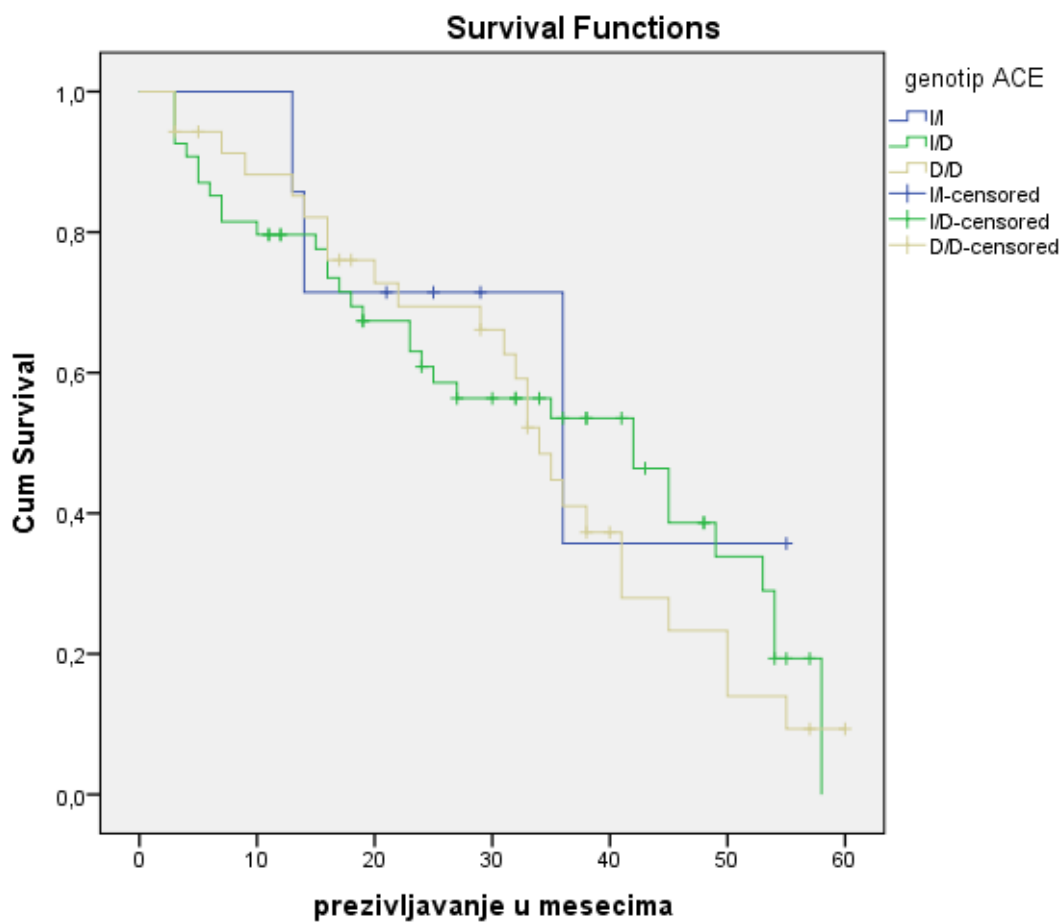
Grafikon 24. Kardiovaskularni mortalitet u odnosu na MMP3 genski polimorfizam

Kada je u pitanju kardiovaskularni mortalitet on je statistički nije značajno različit među različitim genotipovima za MMP3 ($\chi^2=4,9$, $p=0.08$). Najniži kardiovaskularni mortalitet imali su takođe 6A homozigoti sa prosečnim preživljavanjem od 40 meseci, a najviši 5A homozigoti sa prosečnim preživljavanjem 26,8 meseci.



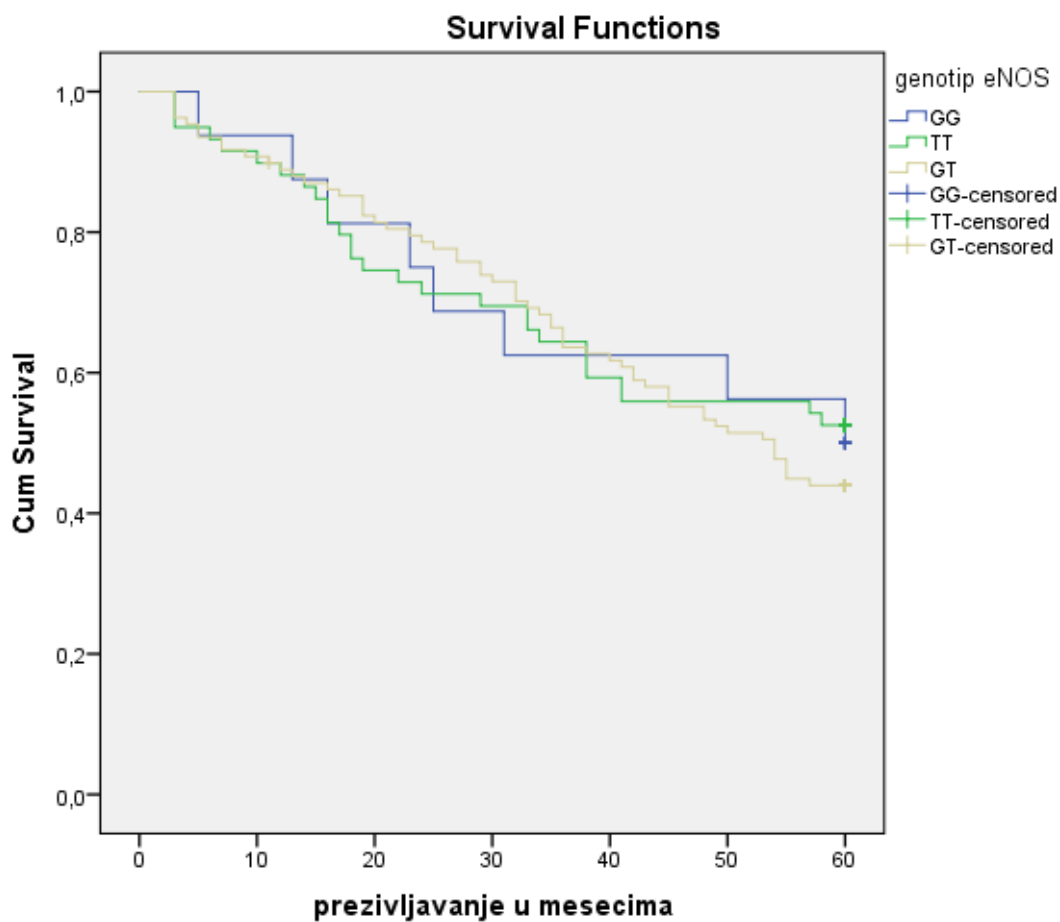
Grafikon 25. Ukupni mortalitet u odnosu na ACE genski polimorfizam

Na Grafikonu 25. prikazan je ukupni mortalitet u odnosu na ACE genotip, sa najboljim preživljavanjem među I/I homozigotima (45 meseci), a najnižim među heterozigotima (42,6 meseci), međutim bez statističke značajnosti ($\chi^2=0.4$, $p=0.8$).



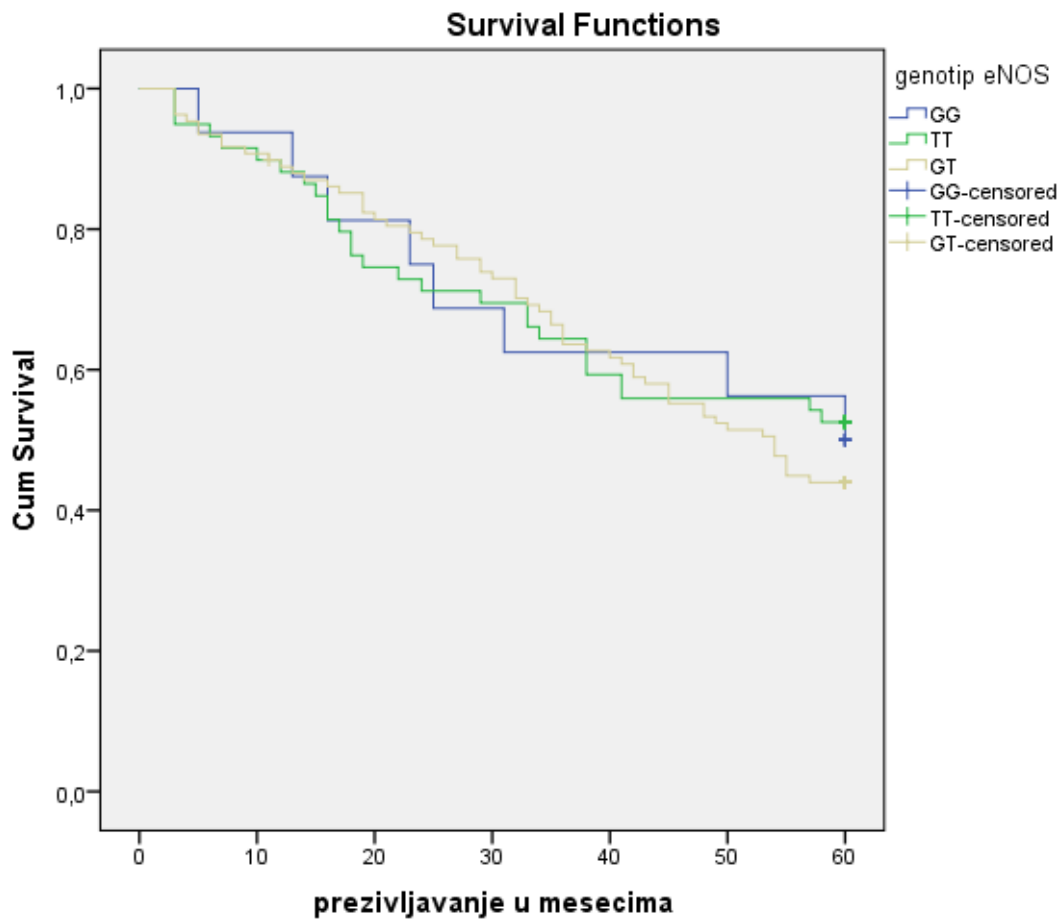
Grafikon 26. Kardiovaskularni mortalitet u odnosu na ACE genski polimorfizam

Takođe, razlike u kardiovaskularnom mortalitetu u odnosu na ACE genotip nisu pokazale statističku značajnost ($\chi^2=0,79$, $p=0,67$). Ipak, mortalitet je najniži u grupi I/I homozigota (20.8%), a najviši kod D/D homozigota.



Grafikon 27. Ukupni mortalitet u odnosu na eNOS genski polimorfizam

Ukupni mortalitet među različitim genotipovima za eNOS prikazan na Grafikonu 27., nije statistički značajno različit ($\chi^2=0,5$, $p=0,78$). Najduže preživljavanje imali su GG homozigoti sa prosečnim preživljavanjem 43,9 meseci, a najkraće TT homozigoti (42,8 meseci).



Grafikon 28. Kardiovaskularni mortalitet u odnosu na genski polimorfizam za eNOS

Grafikon 28. prikazuje kardiovaskularni mortalitet u odnosu na eNOS genski polimorfizam, gde se vidi da najduže preživljavnje imaju heterozigoti, a najniže GG homozigoti, mada bez statističke značajnosti ($\chi^2=3,3$, $p=0,19$).

4.4. Uticaj ispitivanih genskih polimorfizama kao i kombinacija različitih genotipova na kardiovaskularne događaje i kardiovaskularni mortalitet kod bolesnika na hroničnoj hemodijalizi

Urađena je analiza kompleksnih interakcija između svih kombinacija genotipova u obe grupe genskih polimorfizama pojedinačno, kao i između ove dve grupe - gena endotelne disfunkcije i gena inflamatornog odgovora. Povezanost kombinacija različitih genotipova sa kardiovaskularnim događajima ispitivani su logističkom regresijom, a svaka varijabla je dodatno prilagođena na starost, pol i dužinu hemodijaliznog staža, dok je za analizu povezanosti sa kardiovaskularnim mortalitetom korišćena Cox analiza uz prilagođavanje na starost, pol, dužinu hemodijaliznog staža i kardiovaskularne događaje. Rezultati su prikazani u Tabelama 9. i 10. gde se vidi da nijedan od genetskih polimorfizama niti različite kombinacije ovih genotipova nemaju statistički značajan uticaj na nastanak kardiovaskularnih događaja, a kada je u pitanju kardiovaskularni mortalitet izdvaja se jedino genetski polimorfizam za eNOS koji statistički značajno povećava rizik za ovakav ishod u slučaju prisustva T alela u genotipu (OR 1,2; p=0,05).

Takođe, ispitivane su i kombinacije najnepovoljnijih i najpovoljnijih kombinacija genetskih polimorfizama kod pacijenata na hemodijalizi, gde se takođe nije izdvojila kombinacija koja bi imala statistički značajan uticaj na pojavu kardiovaskularnih događaja i na kardiovaskularni mortalitet u našoj grupi bolesnika.

Tabela 9. Uticaj pojedinačnih genskih polimorfizama kao i njihovih kombinacija na kardiovaskularne događaje

	P	OR	95% CI
IL-10	0,87	1,1	0,32-3,79
IL-6	0,3	0,38	0,58-2,42
TNF	0,33	0,85	0,65-1,2
IL-10+IL-6+TNF	0,28	3,69	0,99-1,15
MMP3	0,97	1,02	0,26-3,96
ACE	0,67	0,74	0,19-2,97
eNOS	0,58	0,94	0,76-1,17
MMP3+ACE+eNOS	0,56	0,99	0,93-1,04
IL-10+IL-6+TNF+ MMP3+ACE+eNOS	0,51	1,8	0,3-10,8

*IL-10- interleukin 10, IL-6- interleukin 6, TNF- faktor nekroze tumora, MMP3- matriksna metaloproteinaza 3, ACE- angiotenzin konvertujući enzim, eNOS- endotelna azot oksid sintetaza

Tabela 10. Uticaj pojedinačnih genskih polimorfizama kao i njihovih kombinacija na kardiovaskularni mortalitet

	P	OR	95% CI
IL-10	0,2	1,87	0,72-4,87
IL-6	0,6	0,75	0,25-2,24
TNF	0,59	1,06	0,87-1,28
IL-10+IL-6+TNF	0,71	0,77	0,19-3,02
MMP3	0,12	2,4	0,8-7,1
ACE	0,33	1,55	0,65-3,7
eNOS	0,05	1,15	1,0-1,3
MMP3+ACE+eNOS	0,22	1,02	0,99-1,1
IL-10+IL-6+TNF+ MMP3+ACE+eNOS	0,25	1,92	0,6-5,7

*IL-10- interleukin 10, IL-6- interleukin 6, TNF- faktor nekroze tumora, MMP3- matriksna metaloproteinaza 3, ACE- angiotenzin konvertujući enzim, eNOS- endotelna azot oksid sintetaza

5. Diskusija

Rezultati prikazani u ovom radu pokazuju da je u grupi ispitanika najzastupljeniji 5A/6A genotip gena za matriksnu metaloproteinazu 3, kao i I/D genotip ACE gena, što je u skladu sa literaturnim podacima koji ne ukazuju na razlike u distribuciji gena za MMP3 i ACE između opšte populacije i hemodijaliznih bolesnika. Pokazana je statistički značajna povezanost između genskog polimorfizma za MMP3 i nastanka koronarne arterijske bolesti i srčanih aritmija kod pacijenata na hemodijalizi. Nosioци 5A/6A genotipa za MMP3 imaju 3 puta veći rizik za nastanak koronarne bolesti i srčanih aritmija u odnosu na 6A homozigote, što je takođe praćeno statističkom značajnošću. Osobe sa 5A alelom ovog gena imaju 1,8 puta veći rizik za razvoj infarkta miokarda u odnosu na 6A homozigote, ali bez statističke značajnosti. Ova saznanja u saglasnosti su sa prethodnim istraživanjima, pogotovo onima iz Istočne Azije (Ye, 2006; Terashima i sar., 1999; Ye i sar., 1995; Beyzade i sar., 2003; Davies, 1996). Prethodne studije koje su se bavile ispitivanjem povezanosti polimorfizma MMP3 gena i koronarne bolesti, kao i akutnog infarkta miokarda pokazale su kontroverzne rezultate. Međutim opšti rezultati meta analiza koje su obuhvatile najveći broj ovih studija ne govori u prilog postojanja ovakve povezanosti. Uzrok ovoj kontroverznosti mogla bi biti velika heterogenost uzoraka pojedinih studija, obzirom da su obuhvaćene evropske studije, ali i studije rađene u Istočnoj Aziji. Ova etnička heterogenost odslikava upadljivu razliku u frekvenci zastupljenosti 5A i 6A alela između populacije belaca i drugih etničkih grupa. Prema dosadašnjim istraživanjima zapaža se trend pozitivne selekcije u smislu rasta zastupljenosti 5A alela u do 50% Evropljana, u odnosu na ostale delove sveta, kao na primer Istočnu Aziju, gde je 5A alel prisutan u samo 15% stanovnika. Procenom rizika za nastanak koronarne bolesti i infarkta miokarda većina studija iz Istočne Azije i pojedine evropske studije pokazale su da prisustvo 5A alela povećava rizik za nastanak akutnog infarkta (Ye, 2006; Terashima i sar., 1999; Beyzade i sar., 2003; Davies, 1996; Humphries i sar., 2002; Mintz i sar., 1996).

Rezultati ovog rada pokazuju da je relativni rizik za razvoj cerebrovaskularnog insulta 1,6 puta veći kod 5A/5A homozigota u odnosu na 6A/6A homozigote, međutim bez statističke značajnosti. Dobijeni rezultati su takođe u skladu sa dosadašnjim saznanjima, koja ukazuju na to da bolesnici sa 5A/5A genotipom imaju veći rizik za razvoj akutnih događaja (Humphries i sar.,

2002; Mintz i sar., 1996; Flex i sar., 2004; Gnasso i sar., 2000; Rauramaa i sar., 2000). Sva navedena saznanja saglasna su sa pretpostavkom da 5A alel ima veću aktivnost u ekspresiji gena u odnosu na 6A alel, te da povišeni nivoi ovog enzima dovode do destabilizacije plaka i posledičnih akutnih događaja. To je posledica vezivanja represornog proteina NF- κ B za promotor 6A alela, te su nivoi mRNK za MMP3 i samog proteina viši u serumu osoba koje u svom genotipu sadrže 5A alel (Ye i sar., 1999).

U suprotnosti sa prethodno navedenim rezultatima, 5A alel MMP3 gena pokazao je protektivno delovanje u odnosu na 6A alel, kada su u pitanju periferna vaskularna bolest, hiperlipidemija i hipertrofija leve komore, međutim statistička značajnost nije dokazana.

Kardiovaskularni i ukupni mortalitet je značajno viši u grupi bolesnika sa 5A/5A genotipom, što je u skladu sa prethodno navedenim saznanjima da je ovaj alel češće dovođen u vezu sa akutnim kardiovaskularnim događajima koji često mogu rezultirati smrtnim ishodom (Locatelli i sar., 2001; Foley i Parfrey, 1998; Ye, 2006; Cheung i sar., 2000).

Rezultati ovog rada nisu dokazali povezanost ACE gena sa pojavom koronarne arterijske bolesti niti njegov uticaj na nastanak akutnog infarkta miokarda. Pozitivna korelacija između ACE polimorfizma, tj prisustva D alela i pojave koronarne arterijske bolesti, kao i akutnog infarkta miokarda prvi put je objavljena 1992. godine, međutim kasniji rezultati bili su kontroverzni (Oei i sar., 2005). Dok je u jednoj multicentričnoj studiji DD genotip bio značajno češće prisutan kod muškaraca sa infarktom miokarda nego kod zdravih kontrola, naročito osoba sa niskim rizikom za kardiovaskularne bolesti, u velikoj studiji Agerholm-Larsena i sar. (Agerholm-Larsen i sar., 2000) ovakva povezanost nije pronađena. Tri godine kasnije, ista grupa istraživača publikovala je meta-analizu u koju je pored 21 studije bila uključena i njihova studija (Koch i sar., 2010). Od obuhvaćenih studija pet je bilo velikih (preko 600 ispitanika), a ostale su bile male. Rezultat je pokazao pozitivnu povezanost D alela sa infarktom miokarda. Autori su zaključili da bi ova razlika mogla ukazati na značajnost I/D polimorfizma u pojedinim subgrupama, dok polimorfizam ovog gena nema klinički značaj u opštoj populaciji.

Prikazani rezultati pokazuju da I/I homozigoti imaju statistički značajno veći rizik za nastanak srčanih aritmija, i to čak tri puta više u odnosu na D/D homozigote ($p=0.05$). Potpuno suprotno osobe sa I/I genotipom imaju čak 5 puta niži rizik za nastanak cerebrovaskularnog insulta, a

skoro duplo manji rizik za perifernu vaskularnu bolest, hipertrofiju leve komore i hiperlipidemiju u odnosu na nosioce D/D genotipa. Ovakvi nalazi su u saglasnosti sa dosadašnjim istraživanjima gde je dokazana povezanost D alela ovog gena sa visokim rizikom za cerebrovaskularne događaje. Dve meta analize ukazale su na značajnu povezanost ACE genskog polimorfizma sa cerebrovaskularnim događajima (Sharma, 1998; Zee i sar., 1999). Pojedine studije pokazale su povezanost D alela isključivo sa lakunarnim infarktima mozga, dok su druga istraživanja dokazala asocijaciju ovog alela i sa karotidnim stenozama kao i sa nastankom cerebrovaskularnog insulta (Zee i sar., 1999). Dokazi o povezanosti D alela sa nastankom cerebrovaskularnog insulta mogli bi doprineti razumevanju visoke prevalencije ove komplikacije kod bolesnika u terminalnoj fazi bubrežne insuficijencije. Međutim postoje mnogi faktori koji bi mogli doprineti ovakvim rezultatima, a ne mogu se kontrolisati zbog poremećenih homeostatskih mehanizama u terminalnoj fazi otkaza bubrega. Takođe, mnogi lokalni i spoljašnji faktori, kao što je pušenje, mogli su maskirati ovu povezanost u nekim od prethodnih istraživanja.

Rezultate koji govore u prilog duplo većeg rizika za razvoj hipertrofije leve komore kod DD homozigota mogli bismo objasniti efektima lokalnog RAAS sistema na vaskularnu funkciju i strukturu, hipertrofičnim efektima u čijoj osnovi je hiperprodukcija ekstracelularnog matriksa (Ross, 1999; Nishiyama i sar., 2002).

Iako je poznato da nosioci D alela imaju viši nivo angiotenzin konvertujućeg enzima u krvi, što bi moglo imati uticaja na vrednosti krvnog pritiska, povezanost ovog alela i hipertenzije nije utvrđena. Eksperimentima na životinjama dokazano je da ni tri puta veći nivoi ACE u krvi u odnosu na bazalnu vrednost ne utiču na povećanje krvnog pritiska. Razlog nepostojanja asocijacije između ACE genotipa i hipertenzije mogli bi ležati u mnogostrukim potencijalnim uzrocima ove bolesti, koji su prisutni kod pacijenata na hroničnoj hemodijalizi. Kod hemodijaliznih pacijenata povišen krvni pritisak može biti posledica neregulisane volemije i neadekvatne ekskrecije soli. Nosioci D alela imaju manje izraženu senzitivnost na so od nosioca I alela, zbog čega je moguće da njihove vrednosti krvnog pritiska pokazuju manji odgovor na otklanjanje viška soli ultrafiltracijom na hemodijalizi (Giner i sar., 2000). Takođe korišćenje različitih antihipertenziva moglo je u prethodnim istraživanjima prikriti moguću povezanost hipertenzije sa određenim genotipom. Rezultati mnogih pređašnjih istraživanja u cilju povezivanja ovog polimorfizma sa povišenim krvnim pritiskom su kontroverzni. Prva meta-

analiza na ovu temu publikovana 1997. godine od strane Staessena i saradnika (Staessen i sar., 1997) uključila je 23 studije sa ukupno 6923 ispitanika i pokazala je da je rizik za razvoj hipertenzije za 10% veći kod nosilaca DD alela u odnosu na II genotip. Međutim, ovaj nalaz nije bio statistički značajan. Zbog izrazite heterogenosti grupe urađena je senzitivnija analiza u subgrupama određenim na osnovu pola, etničke pripadnosti, starosti i metodi genotipizacije. Ovoga puta, statistički značajna povezanost između prisustva D alela i povišenog krvnog pritiska pronađena je isključivo u grupi žena i u grupi pripadnika Azijske populacije. Druga meta-analiza Agerholm-Larsena i saradnika (Agerholm-Larsen i sar., 2000) objavljena 2000. godine bila je ograničena isključivo na populaciju belaca i obuhvatila je 19 studija sa zanemarljivo malim preklapanjem sa prethodnom meta-analizom. Rezultati ove studije pokazali su da genotip nema uticaja na pojavu povišenog krvnog pritiska. U 2005-oj godini u revijalnom članku Agarwala i sar. (Agarwal i sar., 2005) objavljena je lista 26 novih studija od kojih je 12 pokazalo pozitivne, a 14 negativne rezultate.

Eksperimentima na životinjama dokazano je da ni tri puta veći nivoi ACE u krvi u odnosu na bazalnu vrednost ne utiču na povećanje krvnog pritiska. Razlog nepostojanja udruženosti između ACE genotipa i hipertenzije mogli bi ležati u mnogostrukim potencijalnim uzrocima ove bolesti, koji su prisutni kod pacijenata na hroničnoj hemodijalizi (neregulisana hipervolemija, neadekvatna ekskrecija soli). Nosioци D alela imaju manje izraženu senzitivnost na so od nosioца I alela, zbog čega je moguće da njihove vrednosti krvnog pritiska pokazuju manji odgovor na otklanjanje viška soli ultrafiltracijom na hemodijalizi (Giner i sar., 2000). Takođe korišćenje različitih antihipertenziva moglo je u prethodnim istraživanjima prikriti moguću povezanost hipertenzije sa određenim genotipom. Autori zaključuju da bi se ovako raznoliki rezultati mogli objasniti zajedničkim uticajem različitog nivoa ACE u plazmi, uzrokovanog polimorfizmom ACE gena i uticaja spoljašnje sredine ili nekih dodatnih genetskih faktora.

Najveći broj hemodijaliznih pacijenata je hronično izložen kompleksnim stimulacijama RAAS sistema, što je indukovano dijalizom, a njegova aktivacija dalje izaziva značajne efekte na različite ciljne organe. Zato pacijenti sa genotipom koji je povezan sa maksimalnom ekspresijom RAAS sistema pokazuju veću sklonost ka oštećenju različitih organa ili čak i povećanu smrtnost, pogotovo u prisustvu dodatnih predisponirajućih faktora.

U skladu sa tim, najviši kardiovaskularni mortalitet u grupi naših bolesnika, tokom praćenja od 60 meseci, iako bez statističke značajnosti, pokazali su upravo D/D homozigoti.

U odnosu na genski polimorfizam za eNOS rezultati ovog istraživanja nisu pokazali statistički značajnu povezanost sa kardiovaskularnim oboljenjima, međutim pronađen je dva puta veći rizik za nastanak koronarne bolesti kod TT homozigota u odnosu na heterozigote, dva puta veći rizik za hipertrofiju leve komore i 1,5 puta veći rizik za infarkt miokarda i cerebrovaskularni insult kod GG homozigota u odnosu na heterozigote. Svi ovi rizici međutim, nisu pokazali statističku značajnost. Slično rezultatima našeg istraživanja, u studiji Szaba i saradnika (Szabo i sar., 2009) pokazano je da TT homozigoti imaju smanjenu produkciju NO i češću pojavu endotelne disfunkcije, što rezultuje povišenim rizikom za razvoj ateroskleroze, a takođe je pokazano i da su osobe sa TT genotipom imale 4 puta veći rizik za nastanak infarkta miokarda i povišen rizik za cerebrovaskularni insult. Naber i saradnici (Naber i sar., 2001) dokazali su da TT homozigoti kojima je rađena rutinska koronarografija zbog nejasnog bola u grudima, imaju značajno veću vaskularnu rezistenciju u odnosu na nosioce druga dva genotipa. U istraživanju Suzukija i saradnika (Suzuki i sar., 2002) utvrđen je značajno veći stepen in stent restenoza kod osoba sa T alelom. Dosadašnje studije pokazale su da nosioci mutiranog alela (T) sa više od tri faktora rizika za kardiovaskularne bolesti, imaju veću endotelnu disfunkciju od onih koji imaju manje faktora rizika. Takođe, kod zdravih osoba u intenzivnom fizičkom naporu, pokazana je manja enzimaska aktivnost ukoliko su osobe bile nosioci T alela. U studiji Philipa i saradnika (Philip i sar., 1999) pokazana je značajna povezanost ovog polimorfizma sa povišenim krvnim pritiskom, gde su GT i TT genotipovi imali viši krvni pritisak u odnosu na GG homozigote.

Takođe, rezultati našeg ispitivanja pokazuju da upravo TT homozigoti imaju najnižu stopu i ukupnog i kardiovaskularnog preživljavanja tokom praćenja od 60 meseci. Analizom uticaja genskih polimorfizama na kardiovaskularni mortalitet u našoj grupi ispitanika kao jedini statistički značajan izdvojio se gen za eNOS.

Naši rezultati ukazuju na statistički značajnu povezanost infarkta miokrada sa polimorfizmom gena za IL-10, gde se genotip GG izdvojio kao protektivni, jer su ovi homozigoti pokazali 3 puta niži rizik za nastanak akutnog infarkta miokarda u odnosu na AA homozigote. Takođe, GG homozigoti imali su statistički značajno manji rizik za nastanak koronarne bolesti, koji je čak 5 puta niži u odnosu na AA homozigote. Protektivno dejstvo ovaj genotip pokazao je i u odnosu na perifernu vaskularnu bolest sa 2 puta nižim rizikom u odnosu na AA genotip, međutim bez statističke značajnosti. Kontradiktorno rizik za cerebrovaskularni insult i hipertenziju u grupi nosioca ovog genotipa bio je 3.5 puta viši u odnosu na AA homozigote, a za nastanak hipertrofije leve komore 1.5 puta viši, međutim bez statističkih značajnosti. Iako bi IL-10 trebalo da ima ateroprotektivna dejstva, kliničke studije pokazale su kontroverzne rezultate. Dve studije su pronašle niže nivoe ovog citokina u plazmi kod bolesnika sa nestabilnom anginom, međutim druga istraživanja nisu potvrdila ovakve rezultate (Heferschen i sar., 2003; Waehre i sar., 2002; Smith i sar., 2001). U nekoliko studija, koje su se bavile ispitivanjem genskog polimorfizma za IL-10 dokazano je da je kod bolesnika na hemodijalizi GG genotip povezan sa niskom produkcijom ovog interleukina i sa visokim rizikom za kardiovaskularni mortalitet (Grindt i sar., 2002), što bi moglo objasniti povišen rizik za nastanak cerebrovaskularnog insulta, hipertenzije i hipertrofije leve komore kod GG homozigota u našoj grupi bolesnika. U odnosu na opštu populaciju, do sada se nije uspelo u pokušajima da se pronađe tačan obrazac delovanja ovog genskog polimorfizma na kardiovaskularni rizik (Koch i sar., 2001). Kontradiktorne rezultate smo dobili i u našem istraživanju analizom kardiovaskularnog i ukupnog mortaliteta, gde su nosioci A alela (AA homozigoti i heterozigoti GA) imali najniže preživljavanje kada je u pitanju kardiovaskularni mortalitet, a najviše kada se posmatrao ukupni mortalitet na petogodišnjem nivou.

Kada je u pitanju TNF gen, nosioci A alela pokazali su statistički značajno viši rizik za nastanak hiperlipidemije, čak 6 puta, dok je pokazan i 2.5 puta veći rizik za nastanak infarkta miokarda i 3.4 puta veći rizik za razvoj cerebrovaskularnog insulta, međutim ova dva saznanja nisu pokazala statističku značajnost. Dosadašnja istraživanja su pokazala da je A alel povezan sa većom produkcijom TNF-a i povećanim rizikom za pojavu kardiovaskularnih komplikacija kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću (Balakrishnan i sar., 2004). Studija Stenvinkel i saradnika (Stenvinkel i sar., 1999) ukazala je na povezanost nivoa TNF u plazmi i veličine ateromatoznih plakova na karotidnim arterijama kod bolesnika koji se leče dijalizama, što bi

moglo objasniti naše rezultate koji ukazuju na 3.4 puta povećan rizik za nastanak cerebrovaskularnog insulta kod nosilaca A alela za ovaj gen. Nekoliko skorijih studija ukazalo je na jaku korelaciju između ovog citokina i endotelne disfunkcije kod bolesnika sa koronarnom bolešću (Fichtscherer i sar., 2000), dok je studija Kimmela i saradnika (Kimmel i sar., 1998) pokazala da se porast nivoa TNF u krvi može smatrati prediktorom smrtnog ishoda kod dijaliznih bolesnika. Slično je pokazano i u našem istraživanju, analizom kardiovaskularnog mortaliteta, gde su upravo nosioci A alela (AA homozigoti i heterozigoti GA) imali najniže preživljavanje, mada statistička značajnost nije dokazana.

Takođe, brojne studije ukazale su na povezanost A alela ovog gena sa razvojem metaboličkog sindroma, koronarne arterijske bolesti, hipertrofije leve komore i srčane insuficijencije (Chávez-Sánchez i sar., 2010; Rao i sar., 2007). Značaj bubrega u metabolizmu TNF je dodatno akcentovan otkrićima u istraživanju Hessiona i saradnika (Hession i sar., 1987), koje je pokazalo da bi Tamm- Horsfall glikoprotein mogao imati udela u regulaciji aktivnosti ovog citokina, mada će biti potrebna dodatna istraživanja koja bi odredila tačan značaj bubrega u klirensu faktora nekroze tumora.

U našoj grupi bolesnika u odnosu na genski polimorfizam za IL-6 pokazano je da heterozigoti imaju čak 10 puta niži rizik za nastanak cerebrovaskularnog insulta u odnosu na CC homozigote, sa statističkom značajnošću. Suprotno, nosioci GC genotipa imali su 3 puta veći rizik za koronarnu bolest, a 3,8 puta viši rizik za nastanak periferne arterijske bolesti, međutim ovaj rezultat nije pokazao statističku značajnost. Homozigoti za GG alel u odnosu na CC homozigote imali su 2 puta manji rizik za nastanak srčanih aritmija, takođe bez statističke značajnosti. Veći broj studija dokazao je da nosioci G alela produkuju veću količinu ovog citokina, međutim ukupni rezultati iz ove oblasti istraživanja su još uvek kontroverzni (Burzotta i sar., 2001; Gaudino i sar., 2003). Jedna relativno skorija studija koja je ispitivala bolesnike sa završnim stadijumom bubrežne bolesti ukazala je na značajno više nivoe IL-6 u plazmi i veći broj komorbiditeta kod GG homozigota (Balakrishnan i sar., 2004), dok je druga pokazala da heterozigoti i CC homozigoti imaju povišen dijastolni pritisak i hipertrofiju leve komore (Losito i sar., 2003). Slično je pokazano i ispitivanjem naše grupe bolesnika, gde najveći kardiovaskularni mortalitet imaju upravo GG homozigoti, dok najviši ukupni mortalitet imaju heterozigoti. Grupa autora iz Pakistana dokazala je povezanost CC genotipa sa nastankom koronarne arterijske bolesti (Satti i sar., 2013), i mnoge druge studije su pokazale povezanost ovog genetskog polimorfizma i

cerebrovaskularnog insulta, periferne vaskularne bolesti, hipertrofije leve komore i kardiovaskularnog mortaliteta (Liu i sar., 2006). Studija Badiou i saradnika (Badiou i sar., 2008) pokazala je da su povišeni nivoi IL-6 najvažniji prediktivni faktor za kardiovaskularni i ukupni mortalitet kod bolesnika na hemodijalizi. Takođe, Danesh i saradnici (Danesh i sar., 2008) su utvrdili da su dugoročno povišeni nivoi IL-6 u plazmi jednako povezani sa nastankom koronarne bolesti kao i dobro poznati tradicionalni faktori rizika za ovu bolest. Sve češće dovođenje ateroskleroze i kardiovaskularnih događaja u vezu sa *Chlamidia pneumoniae* infekcijom, od skora je upotpunjeno saznanjem da ova infekcija indukuje produkciju IL-6 u samom endotelu krvnih sudova (Niessner i sar., 2003; Zoccali i sar., 2003). Ova hipoteza je potvrđena kliničkim studijama koje su pronašle vezu između perzistentne *Chlamidia* infekcije, karotidne ateroskleroze i povišenih nivoa IL-6 u plazmi bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću (Kato i sar., 2004; Stenvinkel i sar., 2002). Takođe, pokazano je da pored genetskih faktora, sama dijaliza, kako hemodijaliza tako i peritonealna, dovode do povećane sekrecije IL-6 (Takahashi i sar., 2000), te je tako i u studiji Caglara i saradnika (Caglar i sar., 2002) pokazan porast cirkulišućeg IL-6 nakon hemodijalizne sesije. Kako su geni za citokine eksprimirani i u adipocitima, procenjeno je da masno tkivo doprinosi sa čak 20% sistemske koncentracije IL-6 (Mohamed-Ali i sar., 1997), te bi tako visceralno masno tkivo moglo biti dodatni razlog za visoke nivoe ovog citokina kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću (Axelsson i sar., 2004).

Uticaj genetskog polimorfizma na kardiovaskularni morbiditet i mortalitet nije dovoljno istraživano na našem podneblju. Poznato je da rezultati ovakvih istraživanja zavise i od geografskog podneblja, rase i ostalih individualnih karakteristika samog bolesnika, te bi stoga ova studija mogla biti podstrek za dalja, detaljnija i veća istraživanja u našoj zemlji ili regionu.

Ono što je sigurno jeste da određeni geni u kombinaciji sa spoljašnjim faktorima ili u specifičnom genskom miljeu mogu kompleksnim međusobnim interakcijama dovesti do razvoja pojedinih oboljenja. Stoga, za definitivni zaključak biće potrebno još mnogo dodatnih ispitivanja.

6. Zaključak

- Heterozigoti za MMP3 gen imaju statistički značajno viši rizik za nastanak koronarne arterijske bolesti i srčanih aritmija u odnosu na 6A homozigote, dok prisustvo 5A alela duplo povećava rizik za razvoj infarkta miokarda, ali bez statističke značajnosti;
- MMP3 genski polimorfizam statistički je značajno povezan sa nastankom koronarne arterijske bolesti i srčanih aritmija kod pacijenata na hroničnoj hemodijalizi;
- U odnosu na MMP3 genski polimorfizam najviši ukupni mortalitet imali su 5A homozigoti, a kardiovaskularni mortalitet je statistički značajno viši takođe u grupi nosilaca 5A alela;
- Alel D gena za ACE značajno povećava rizik za nastanak cerebrovaskularnih događaja, hipertrofije leve komore, hiperlipidemije i periferne vaskularne bolesti;
- I/I homozigoti za ACE gen pokazali su statistički značajno viši rizik za nastanak srčanih aritmija;
- U odnosu na ukupni mortalitet najkraće preživljavanje imali su I/I homozigoti, dok je najviši kardiovaskularni mortalitet zabeležen u grupi D/D homozigota za ACE gen;
- TT homozigoti za eNOS gen pokazali su duplo viši rizik za nastanak koronarne bolesti u odnosu na heterozigote, međutim bez statističke značajnosti;
- U odnosu na eNOS ukupni mortalitet bio je najviši u grupi heterozigota, a kardiovaskularni mortalitet najviši kod TT homozigota, ali bez statističke značajnosti;
- Gen za eNOS je pokazao statistički značajno viši rizik za kardiovaskularni mortalitet kod bolesnika na hroničnoj hemodijalizi;
- Genski polimorfizam za IL-6 statistički je značajno povezan sa nastankom koronarne arterijske bolesti i cerebrovaskularnog insulta;
- Heterozigoti za IL-6 gen imaju statistički značajno niži rizik za razvoj cerebrovaskularnog insulta u odnosu na CC homozigote, ali su pokazali veći rizik za nastanak periferne vaskularne bolesti, međutim bez statističke značajnosti;

- Ukupni mortalitet najviši je među heterozigotima za IL-6 gen mada bez statističke značajnosti, dok u kardiovaskularnom mortalitetu nema razlike u preživljavanju među pojedinim genotipovima;
- Genski polimorfizam za IL-10 statistički je značajno povezan sa nastankom infarkta miokarda u grupi bolesnika na hemodijalizi;
- GG homozigoti za IL-10 pokazali su statistički značajno niži rizik za nastanak koronarne arterijske bolesti, dok su za pojavu infarkta miokarda, periferne vaskularne bolesti i srčanih aritmija takođe pokazali niži rizik međutim bez statističke značajnosti, a viši rizik kod ovog genotipa pokazan je u odnosu na razvoj hipertenzije i cerebrovaskularnog insulta;
- U odnosu na IL-10 ukupni mortalitet najviši je među GG homozigotima, dok je najviši kardiovaskularni mortalitet dokazan u grupi AA homozigota, ali bez statističke značajnosti;
- Nosioci A alela za TNF gen imali su statistički značajno viši rizik za nastanak hiperlipidemije, a viši rizik su pokazali i za pojavu infarkta miokarda i cerebrovaskularnog insulta, međutim bez značajnosti;
- U odnosu na TNF genski polimorfizam kardiovaskularni mortalitet je bio najviši među GG homozigotima bez statističke značajnosti, dok u ukupnom mortalitetu nije bilo značajnijih razlika između pojedinih genotipova;
- Nijedna od mogućih kombinacija ispitivanih genskih polimorfizama nije pokazala uticaj na nastanak kardiovaskularnih događaja niti mortaliteta u ispitivanoj grupi bolesnika na hroničnoj hemodijalizi.

7. Literatura

Agarwal A, Williams GH, Fisher ND (2005). Genetics of human hypertension. *Trends Endocrinol Metab* 16:127–133.

Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Steffensen R, Sorensen TI, Jensen G, Tybjaerg-Hansen A (1997). ACE gene polymorphism: ischemic heart disease and longevity in 10,150 individuals. A case-referent and retrospective cohort study based on the Copenhagen City Heart Study. *Circulation* 95:2358–2367.

Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A (2000). ACE gene polymorphism in cardiovascular disease: meta-analyses of small and large studies in whites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 484–492.

Aker S, Bantis C, Reis P, Kuhr N, Schwandt C, Grabensee B, et al. (2009). Influence of interleukin-6 G-174C gene polymorphism on coronary artery disease, cardiovascular complications and mortality in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 24: 2847–2851.

Alhenc-Gelas F, Richard J, Courbon D, Warnet JM, Corvol P (1991). Distribution of plasma angiotensin I-converting enzyme levels in healthy men: relationship to environmental and hormonal parameters. *J Lab Clin Med* 117:33–39.

Axelsson J, Qureshi AR, Suliman ME, Honda H, Pecoits-Filho R, Heimbürger O, et al. (2004). Truncal fat mass as a contributor to inflammation in end-stage renal disease. *Am J Clin Nutr* 80:1222–1229.

[Badiou S](#), [Cristol JP](#), [Jaussent I](#), [Terrier N](#), [Morena M](#), [Maurice F](#), et al. (2008). Fine-tuning of the prediction of mortality in hemodialysis patients by use of cytokine proteomic determination. [Clin J Am Soc Nephrol](#) 3(2):423-430.

Balakrishnan VS, Guo D, Rao M, Jaber BL, Tighiouart H, Freeman RL, et al. (2004). Cytokine gene polymorphisms in hemodialysis patients: association with comorbidity, functionality, and serum albumin. *Kidney Int* 65: 1449–60.

Beyzade S, Zhang S, Wong Y, Day INM, Eriksson P, Ye S (2003). Influences of matrix metalloproteinase-3 gene variation on extent of coronary atherosclerosis and risk of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 41(12): 2130–2137.

Brunet P, Capo C, Dellacasagrande J, Thirion X, Mege JL, Berland Y (1998). IL-10 synthesis and secretion by peripheral blood mononuclear cells in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transpl* 13:1745–1751.

Buraczynska M, Mierzicki P, Buraczynska K, Dragan M, Ksiazek A (2007). Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism correlates with cardiovascular disease in patients with end-stage renal disease. *Mol Diagn Ther* 11(4):257-263.

Burzotta F, Iacoviello L, Di Castelnuovo A, Gliuca F, Luciani N, Zamparelli R, et al. (2001). Relation of the -174 G/C polymorphism of interleukin-6 to interleukin-6 plasma levels and to length of hospitalization after surgical coronary revascularization. *Am J Cardiol* 88: 1125–1128.

Caglar K, Peng Y, Pupim LB, Flakoll PJ, Levenhagen D, Hakim RM, et al. (2002). Inflammatory signals associated with hemodialysis. *Kidney Int* 62:1408–1416.

Chade AR, Lerman A, Lerman LO (2005). Kidney in early atherosclerosis. *Hypertension* 45(6): 1042-9.

Chávez-Sánchez L, Chávez-Rueda K, Legorreta-Haquet MV, Zenteno E, Ledesma-Soto Y, Montoya-Díaz E, et al. (2010). The activation of CD14, TLR4, and TLR2 by mmLDL induces IL-1 beta, IL-6, and IL-10 secretion in human monocytes and macrophages. *Lipids Health Dis* 9:117–125.

Cheng SW, Ting AC, Wong J (1997). Fasting total plasma homocysteine and atherosclerotic peripheral vascular disease. *Ann Vasc Surg* 11:217–223.

Cheng SW, Ting AC, Wong J (1997). Lipoprotein (a) and its relationship to risk factors and severity of atherosclerotic peripheral vascular disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 14: 17–23.

Cheung AK, Sarnak MJ, Yan G, Dwyer JT, Heyka JR, Rocco MV, et al. (2000). Atherosclerotic cardio-vascular disease risks in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 58:353–362.

Cheung AK, Sarnak MJ, Yan G, Dwyer JT, Heyka RJ, Rocco MV, et al. (2000). Atherosclerotic cardio-vascular disease risks in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 58:353–362.

Danesh J, Kaptoge S, Mann AG, Sarwar N, Wood A, Angleman SB, et al. (2008). Long-term interleukin-6 levels and subsequent risk of coronary heart disease: two new prospective studies and a systematic review. *PLoS Med* 5: e78.

Davies M.J (1996). Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture. *Circulation* 94: 2013–2020.

Descamps-Latscha B, Herbelin A, Nguyen AT, Roux-Lombard P, Zingraff J, Moynot A, et al. (1995). Balance between IL-1b, TNF-a, and their specific inhibitors in chronic renal failure and maintenance dialysis. *J Immunol* 154:882–892.

[Dias RG](#), [Gowdak MM](#), [Pereira AC](#) (2011). Genetics and cardiovascular system: influence of human genetic variants on vascular function. [Genes Nutr](#) 6(1):55-62.

El-Dorry HA, Pickett CB, MacGregor JS, Soffer RL (1982). Tissue-specific expression of mRNAs for dipeptidyl carboxypeptidase isoenzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:4295– 4297.

Erdos EG, Skidgel RA (1987). The angiotensin I-converting enzyme. *Lab Invest* 56:345–348.

Ferreiro CR, Chagas AC, Carvalho MH, Dantas AP, Scavone C, Souza LC, et al. (2004). [Expression of inducible nitric oxide synthase is increased in patients with heart failure due to ischemic disease.](#) *Braz J Med Biol Res* 37(9):1313-1320.

Fichtscherer S, Rosenberger G, Walter DH, Breuer S, Dimmeler S, Zeiher AM. (2000). Elevated Creactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary heart disease. *Circulation* 102:1000–1006.

Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Judkin JS, Humphries S, et al. (1998). The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 102: 1369.

Flex A, Gaetani E, Papaleo P, Straface G, Proia AS, Pecorini G, et al. (2004). Proinflammatory genetic profiles in subjects with history of ischemic stroke. *Stroke* 35: 2270– 2275.

Foley RN, Parfrey PS (1998). Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 32(suppl 3): S112–S119.

Förstermann U (2006). Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal. *Biol Chem* 387:1512-1533.

Gaudino M, Andreotti F, Zamparelli R, Di Castelnuovo A, Nasso G, Burzotta F, et al. (2003). The -174G/C interleukin-6 polymorphism influences postoperative interleukin-6 levels and postoperative atrial fibrillation. Is atrial fibrillation an inflammatory complication? *Circulation* 108 (Suppl.1): 195–199.

Giner V., Poch E., Bragulat E, Oriola J, González D, Coca A, et al. (2000). Renin angiotensin system genetic polymorphism and salt sensitivity in essential hypertension. *Hypertension* 35:512-517.

Girndt M, Kohler H, Schiedhelm-Weick E, Schlaak JF, Meyer zum Büschenfelde KH, Fleischer B (1995). Production of interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and interleukin-10 in vitro correlates with the clinical immune defect in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 47:559–565.

Girndt M, Kaul H, Sester U, Ulrich C, Sester M, Georg T (2002). Anti-inflammatory interleukin-10 genotype protects dialysis patients from cardiovascular events. *Kidney Int* 62: 949–955.

Gnasso A, Motti C, Irace C, Carallo C, Liberatoscioli L, Bernardini S, et al. (2000). Genetic variation in human stromelysin gene promoter and common carotid geometry in healthy male subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1600–1605.

Hefeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, Fichtlscherer S, Boersma E, Simoons ML, et al. (2003). Serum level of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 107:2109–2114.

Hession C, Decker JM, Sherblom AP, Kumar S, Yue CC, Mattaliano RJ, et al. (1987). Uromodulin (Tamm- Horsfall glycoprotein): A renal ligand for lymphokines. *Science* 237:1479–1484.

Hingorani AD (2001). [Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis: John French Lecture 2000](#). *Atherosclerosis* 15;154(3):521-527.

Huang XR, Chen WY, Truong LD, Lan HY (2003). Chymase is upregulated in diabetic nephropathy: Implications for an alternative pathway of angiotensin II-mediated diabetic renal and vascular disease. *J Am Soc Nephrol* 14: 1738–1747.

Humphries S, Bauters C, Meirhaeghe A, Luong L, Bertrand M, Amouyel P (2002). The 5A6A polymorphism in the promoter of the stromelysin– 1 (MMP3) gene as a risk factor for restenosis. *Eur Heart J* 22:721– 725.

Jaspard E, Wei L, Alhenc-Gelas F (1993). Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. *J Biol Chem* 268:9496 –9503.

Jones CB, Sane DC, Herrington DM (2003). Matrix metalloproteinases: a review on their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc Res* 59:812–823.

Kato A, Takita T, Maruyama, Hishida A (2004). Chlamydial infection and progression of carotid atherosclerosis in patients on regular haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 19:2539–2546.

[Kim OJ](#), [Kim UK](#), [Oh SH](#), [Cho YW](#), [Oh KI](#), [Oh D](#), et al. (2010). Association of endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and haplotypes with ischemic stroke in Korean individuals with or without diabetes mellitus. [Mol Med Rep](#) 3(3):509-513.

Kimmel PL, Phillips TM, Simmens SJ, Peterson RA, Weihs KL, Alleyne S, et al. (1998). Immunologic function and survival in hemodialysis patients. *Kidney Int* 54:236–244.

Koch W, Kastrati A, Bottiger C, Mehilli J, von Beckerath N, Schömig A (2001). Interleukin-10 and tumor necrosis factor gene polymorphisms and risk of coronary artery disease and myocardial infarction. *Atherosclerosis* 159:137–144.

Koch W, De waha A, Hoppmann P, Schömig A, Kastrati A (2010). Haplotypes and 5A/6A polymorphism of the matrix metalloproteinase-3 gene in coronary disease: case-control study and a meta-analysis. *Atherosclerosis* 208(1):171-6.

Liu Y, Berthier-Schaad Y, Fallin MD, Fink NE, Tracy RP, Klag MJ, et al. (2006). IL-6 haplotypes, inflammation, and risk for cardiovascular disease in a multiethnic dialysis cohort. *J Am Soc Nephrol* 17:863–870.

Locatelli F, Marcelli D, Conte F, D’Amico M, Del Vecchio L, Limido A, et al. (2001). Survival and development of cardiovascular disease by modality of treatment in patients with end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 12: 2411–2417.

Longenecker JC, Coresh J, Powe NR, Levey AS, Fink NE, Martin A, et al. (2002). Traditional cardiovascular disease risk factors in dialysis patients compared with the general population: the CHOICE study. *J Am Soc Nephrol* 13: 1918–1927.

Losito A, Kalidas K, Santoni S, Jeffery S (2003). Association of interleukin-6 -174G/C promoter polymorphism with hypertension and left ventricular hypertrophy in dialysis patients. *Kidney Int* 64: 616–622.

Mintz GS, Popma JJ, Pichard AD, Kent KM, Satler LF, Wong C, et al. (1996). Arterial remodeling after coronary angioplasty: a serial intravascular ultrasound study. *Circulation* 94:35– 43.

Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, Suzuki M, Shiina M (2012). IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci* 122:143–159.

Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, et al. (1997). Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumour necrosis factor- α , in vivo. *J Clin Endocrin Metab* 82:4196–4200.

Morita Y, Yamamura M, Kashihara N, Makino H (1997). Increased production of interleukin-10 and inflammatory cytokines in blood monocytes of hemodialysis patients. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 98:19–33.

Naber CK, Baumgart D, Altmann C, Siffert W, Erbel R, Heusch G (2001). eNOS 894T allele and coronary blood flow at rest and during adenosine-induced hyperemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281:H1908-H1912.

Nagase H, Woessner Jr JF (1999). Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274:21491–21494.

Nanayakkara PW, Gaillard CA (2010). Vascular disease and chronic renal failure: new insights. *Neth J Med* 68 (1): 5-14.

Newby AC (2005). Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev* 85:1–31.

Niessner A, Kaun C, Zorn G, Speidl W, Türel Z, Christiansen G, et al. (2003). Polymorphic membrane protein (PMP) 20 and PMP21 of *Chlamydia pneumoniae* induce proinflammatory mediators in human endothelial cells in vitro by activation of the nuclear factor- κ B pathway. *J Infect Dis* 188:108–113.

Nishiyama A, Seth DM, Navar LG (2002). Renal interstitial fluid I and angiotensin II concentrations during local angiotensin converting enzyme inhibition. *J Am Soc Nephrol* 13: 2207–2212.

[Nordfors L](#), [Lindholm B](#), [Stenvinkel P](#) (2005). End-stage renal disease-not an equal opportunity disease: the role of genetic polymorphisms. *J Intern Med* 258(1):1-12.

Oei HH, Sayed-Tabatabaei FA, Hofman A, Oudkerk M, Van Duijn CM, Witteman JC (2005). The association between angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and coronary calcification. The Rotterdam Coronary Calcification Study. *Atherosclerosis* 182:169–173.

Pernod G, Bosson JL, Golshayan D, Barro C, Forneris G, Martina G, et al. (2006). Diamant Alpin Collaborative Dialysis Study Group. [Phenotypic and genotypic risk factors for cardiovascular events in an incident dialysis cohort](#). *Kidney Int* 69(8):1424-1430.

Philip I, Plantefevre G, Vuillaumier-Barrot S, Vicaut E, Le Marie C, Henrion D, et al. (1999). G894T polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with an enhanced vascular responsiveness to phenylephrine. *Circulation* 99:3096-3098.

Quinones S, Saus J, Otani Y, Harris Jr ED, Kurkinen M (1989). Transcriptional regulation of human stromelysin. *J Biol Chem* 264:8339–8344.

Quinones S, Buttice G, Kurkinen M (1994). Promoter elements in the transcriptional activation of the human stromelysin-1 gene by the inflammatory cytokine, interleukin 1. *Biochem J* 302(Pt 2): 471-747.

[Rao M](#), [Wong C](#), [Kanetsky P](#), [Girndt M](#), [Stenvinkel P](#), [Reilly M](#), et al. (2007). Cytokine gene polymorphism and progression of renal and cardiovascular diseases. [Kidney Int](#) 72(5):549-556.

Rauramaa R, Vaisanen SB, Luong LA, Schmidt-Trucksass A, Penttila IM, Bouchard C, et al. (2000). Stromelysin-1 and interleukin-6 gene promoter polymorphisms are

determinants of asymptomatic carotid artery atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 2657–2662.

Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F (1990). An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 86:1343–1346.

Ritz E, Bommer J (2009). Cardiovascular problems on hemodialysis: current deficits and potential improvement. *Clin J Am Soc Nephrol Suppl* 1: S71-8.

Roden DM, Brown NJ (2001). Prescription genotyping. *Circulation* 103:1608-1610.

Ross R (1999). [Atherosclerosis--an inflammatory disease](#). *N Engl J Med* 14;340(2):115-126.

Rüster C, Wolf G (2006). Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol* 17(11):2985-2991.

[Satti HS](#), [Hussain S](#), [Javed Q](#) (2013). Association of Interleukin-6 Gene Promoter Polymorphism with Coronary Artery Disease in Pakistani Families. [Scientific World Journal](#) Article ID 538365, 6 pages.

Sayed-Tabatabaei FA, Oostra BA, Isaacs A, Van Duijn CM, Witteman JC (2006). [ACE polymorphisms](#). *Circ Res* 12;98(9):1123-1133.

Sharma P (1998). Meta-analysis of the ACE gene in ischaemic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 64:227–230.

Smith DA, Irving SD, Sheldon J, Cole D, Kaski JC (2001). Serum levels of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 are decreased in patients with unstable angina. *Circulation* 104:746–749.

Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Hubert C, Allegrini J, John M, Tregear G, et al. (1988). Two putative active centers in human angiotensin I converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:9386-9390.

Staessen JA, Wang JG, Ginocchio G, Petrov V, Saavedra AP, Soubrier F, et al. (1997). The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and cardiovascular-renal risk. *J Hypertens* 15:1579–1592.

Stenvinkel P, Heimbürger O, Paulsen F, Diczfalussy U, Wang T, Berglund L, et al. (1999). Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int* 55:1899–1911.

Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, et al. (2005). IL-10, IL-6 and TNF- α : Central factors in the altered cytokine network of uremia- The good, the bad, and the ugly. *Kidney Int* ISSN 0085-2538, 67(4):1216-1233.

Stenvinkel P, Heimbürger O, Jogestrand T. (2002). Elevated interleukin-6 predicts progressive carotid atherosclerosis in dialysis patients: Association to Chlamydia pneumoniae seropositivity. *Am J Kidney Dis* 39:274–282.

Sternlicht MD, Werb Z (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:463– 516.

Suzuki T, Okumura K, Sone T, Kosokabe T, Tsuboi H, Kondo J, et al. (2002). The Glu298Asp polymorphism in endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary in-stent restenosis. *Int J Cardiol* 86:71-76.

Szabo GV, Kunstar A, Acsady Gy (2009). Methyltetrahydrofolate reductase and nitric oxide synthase polymorphism in patients with atherosclerosis and diabetes. *Pathol Oncol Res* 15:631–637.

[Szabó GV](#) (2013). The role and importance of gene polymorphisms in the development of atherosclerosis. *Interv med Appl Sci* 5(1):46-51.

Takahashi T, Kubota M, Nakamura T, Ebihara I, Koide H (2000). Interleukin-6 gene expression in peripheral mononuclear cells from patients undergoing hemodialysis or continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Ren Fail* 22:345–354.

Terashima M, Akita H, Kanazawa K, Inoue N, Yamada S, Ito K, et al. (1999). Stromelysin promoter 5A/6A polymorphism is associated with acute myocardial infarction. *Circulation* 99:2717– 2719.

Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, et al. (2002). Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-convertingenzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem* 277:14838 –14843.

Waehre T, Halvorsen B, Damas JK, Yndestad A, Brosstad F, Gullestad L, et al. (2002). Inflammatory imbalance between IL-10 and TNF-alpha in unstable angina; potential plaque stabilizing effects of IL-10. *Eur J Clin Invest* 32:803–810.

Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW (1997). Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:3195–3199.

Yasushi M, Lerman A (2014). Endothelial dysfunction and coronary artery disease: assessment, prognosis and treatment. *Coron Artery Dis* 25(8): 713–724.

[Ye S](#) (2006). Influence of matrix metalloproteinase genotype on cardiovascular disease susceptibility and outcome. [Cardiovasc Res](#) 15;69(3):636-645.

Ye S, Watts GF, Mandalia S, Humphries SE, Henney AM (1995). Genetic variation in the human stromelysin promoter is associated with progression of coronary atherosclerosis. *Br. Heart J* 73:209–215.

Zee RY, Ridker PM, Stampfer MJ, Hennekens CH, Lindpaintner K (1999). Prospective evaluation of the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and the risk of stroke. *Circulation* 99:340–343.

Zoccali C, Mallamci F, Triperi G, Parlongo S, Cutrupi S, Benedetti FA, et al. (2003). Chlamydia pneumonia overall and cardiovascular mortality in end-stage renal disease (ESRD). *Kidney Int* 64:579–584.

Biografija autora

Jelena Tošić rođena je 19.02.1985. godine u Beogradu, gde je završila Osnovnu školu i Petu beogradsku gimnaziju sa Vukovim diplomama. Medicinski Fakultet u Beogradu upisala je školske 2003/2004 god., a završila u julu mesecu 2009. godine sa prosečnom ocenom 9.60 (devet, šezdeset).

Od septembra 2009. do jula 2010. godine volontirala je na IKVB "Dedinje" na odeljenju kardiologije u postoperativnom bloku. Od jula 2010. godine zaposlena je na Kliničkom odeljenju za nefrologiju i poremećaje metabolizma sa dijalizom "Prof. dr Vasilije Jovanović", KBC Zvezdara, Beograd.

Februara 2012. godine na Medicinskom Fakultetu Univerziteta u Beogradu, odbranila je završni rad u okviru Specijalističkih akademskih studija iz oblasti Kardiologije, pod nazivom "Povezanost polimorfizma gena za angiotenzin konvertujući enzim i matriksnu metaloproteinazu 3 sa kardiovaskularnim morbiditetom i mortalitetom pacijenata na hemodijalizi", čiji mentor je bila Prof. dr Nada Dimković.

Specijalistički ispit iz Interne Medicine položila je u oktobru 2017. godine na Medicinskom Fakultetu Univerziteta u Beogradu sa odličnom ocenom.

Doktorske studije iz oblasti Nefrologije upisala je školske 2012/2013 godine.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana Jelena Tošić Dragović

broj upisa NF 02/12

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

“Uticaj genskog polimorfizma za angiotenzin konvertujući enzim, matriksnu metaloproteinazu 3, endotelnu azot oksid sintetazu, interleukine 6 i 10 i faktor nekroze tumora na kardiovaskularni morbiditet i mortalitet bolesnika na hemodijalizi”

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 20.7.2018.

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Jelena Tošić Dragović

Broj upisa: NF 02/12

Studijski program: Nefrologija

Naslov rada: "Uticaj genskog polimorfizma za angiotenzin konvertujući enzim, matriksnu metaloproteinazu 3, endotelnu azot oksid sintetazu, interleukine 6 i 10 i faktor nekroze tumora na kardiovaskularni morbiditet i mortalitet bolesnika na hemodijalizi"

Mentor: Prof. Dr Nada Dimković

Potpisani, Jelena Tošić Dragović

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 20.7.2018.

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Uticaj genskog polimorfizma za angiotenzin konvertujući enzim, matriksnu metaloproteinazu 3, endotelnu azot oksid sintetazu, interleukine 6 i 10 i faktor nekroze tumora na kardiovaskularni morbiditet i mortalitet bolesnika na hemodijalizi

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 20.7.2018.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana Jelena Tošić Dragović

broj upisa NF 02/12

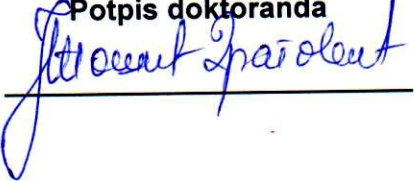
Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

“Uticaj genskog polimorfizma za angiotenzin konvertujući enzim, matriksnu metaloproteinazu 3, endotelnu azot oksid sintetazu, interleukine 6 i 10 i faktor nekroze tumora na kardiovaskularni morbiditet i mortalitet bolesnika na hemodijalizi”

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 20.7.2018.

Potpis doktoranda


Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Jelena Tošić Dragović

Broj upisa: NF 02/12

Studijski program: Nefrologija

Naslov rada: "Uticaj genskog polimorfizma za angiotenzin konvertujući enzim, matriksnu metaloproteinazu 3, endotelnu azot oksid sintetazu, interleukine 6 i 10 i faktor nekroze tumora na kardiovaskularni morbiditet i mortalitet bolesnika na hemodijalizi"

Mentor: Prof. Dr Nada Dimković

Potpisani, Jelena Tošić Dragović

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 20.7.2018.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Uticaj genskog polimorfizma za angiotenzin konvertujući enzim, matriksnu metaloproteinazu 3, endotelnu azot oksid sintetazu, interleukine 6 i 10 i faktor nekroze tumora na kardiovaskularni morbiditet i mortalitet bolesnika na hemodijalizi

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

U Beogradu, 20.7.2018.

Potpis doktoranda

Jelena Zarić