



**UNIVERZITET U NIŠU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Valentina Nikolić**

**UTICAJ GENSKE VARIJABILNOSTI ADRENERGIČKIH  
RECEPTORA I CITOHROMA P450 OKSIDAZE NA  
FARMAKOKINETIKU I TERAPIJSKU EFIKASNOST BETA  
BLOKATORA KOD PACIJENATA SA SRČANOM  
INSUFICIJENCIJOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Vanredni prof. dr Tatjana Jevtović-Stoimenov

Niš, 2013.

<b>I Autor</b>	
Ime i prezime	Valentina Nikolić
Datum i mesto rođenja	01.02.1970. godine, Leskovac
Sadašnje zaposlenje	Asistent za UNO Farmakologija na Medicinskom fakultetu u Nišu
<b>II Doktorska disertacija</b>	
Naslov	Uticaj genske varijabilnosti adrenergičkih receptora i citohroma P450 oksidaze na farmakokinetiku i terapijsku efikasnost beta blokatora kod pacijenata sa srčanom insuficijencijom
Broj stranica	177
Broj šema/slika	29
Broj grafikona	13
Broj tabela	54
Broj bibliografskih podataka	564
Ustanova i mesto gde je rad izrađen	Klinika za kardiologiju Instituta „Niška Banja“, Klinika za kardiovaskularne bolesti Klinički centar; Laboratorija za funkcionalnu genomiku i proteomiku Naučnoistraživačkog Centra za Biomedicinu Medicinskog fakulteta u Nišu.
Naučna oblast	Medicina, farmakologija
Mentor	Vanredni profesor. dr Tatjana Jevtović-Stoimenov
<b>III Ocena i odbrana</b>	
Datum prijave teme	08.06.2010. godine
Datum odobrenja teme doktorske disertacije	07.12.2010.godine
Broj odluke	04-766/10
Komisija za ocenu podobnosti teme i kandidata	Prof. dr Srđan Pešić, predsednik Prof. dr Stevan Ilić, član Doc. dr Tatjana Jevtović-Stoimenov, član i mentor
Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije	Prof. dr Srđan Pešić, predsednik Doc. dr Tatjana Jevtović-Stoimenov, član i mentor Prof. dr Stevan Ilić, član Prof. dr Zorica Jović, član Prof. dr Slobodan Janković, član sa MF u Kragujevcu
Datum odbrane doktorske disertacije	23.08.2013.g.

#### IV Naučni doprinos disertacije

1. **Nikolic VN**, Jankovic SM, Velickovic-Radovanović R, Apostolović S, Stanojevic D, Zivanovic S, Stefanovic N, Pesic S, Jevtovic-Stoimenov T, Djuric J, Markovic V, Milovanovic JR. Population pharmacokinetics of carvedilol in patients with congestive heart failure. **J Pharm Sci.** 2013 102:2851-2858. (M21)
2. **Nikolic VN**, Jevtovic-Stoimenov T, Stokanovic D, Milovanovic M, Velickovic-Radovanović R, Pesic S, Stoilkovic M, Pesic G, Ilic S, Deljanin-Ilic M, Marinkovic D, Stefanovic N, Jankovic SM. An inverse correlation between TNF alpha serum levels and heart rate variability in patients with heart failure. **J Cardiology** 2013; 62:37-43. (M22)
3. **Nikolic VN**, Jevtovic-Stoimenov T, Velickovic-Radovanović R, Ilic S, Deljanin-Ilic M, Marinkovic D, Apostolović S, Stanojevic D, Zivanovic S, Stefanovic N, Pesic S, Ruzic Zecevic D, Milovanovic JR, Jankovic SM. Population pharmacokinetics of bisoprolol in patients with chronic heart failure. **Eur J Clin Pharmacol** 2013; 69: 859-865. (M22)

## Skraćenice

A	adenozin
ACEi	inhibitori angiotenzin konvertirajućeg enzima
ALT	alanin transaminaza
AK	aminokiselina
AMINO	aminofilin
ARA	antagonist receptora angiotenzina II
AST	aspartat aminotransferaza
AUC (PIK)	površina ispod krive (eng. area under the curve)
CaMII	Ca <sup>2+</sup> - kalmodulin zavisna protein kinaza II
CL cr	klirens kreatinina
DM	diabetes mellitus
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
EFLK	ejekciona frakcija leve komore
EDD	endijastolni dijametar
ESD	endsistolni dijametar
FK	farmakokinetika
FD	farmakodinamika
FDA	Food and drug administration Agencija za hranu i lekove
Hb	hemoglobin
HLA	humani leukocitni antigen
HMP	hitna medicinska pomoć
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
KP	krvni pritisak
LK	leva komora
LPK	leva pretkomora
MAP kinaze	mitogenom aktivirane kinaze
MCP	monocitini hemotaktični protein
MHC	glavni histokompatibilni kompleks
MMP	matriks metaloproteinaza
MPE	srednja greška predviđanja
MSPE	srednja statistička greška
NA	noradrenalin
NF-kB	nuklearni faktor kappa B
NONMEM	nelinearno modelovanje kombinovanih efekata
PCR	lančana reakcija polimeraze
PCR-RFLP	lančana reakcija polimeraze merenjem dužine restrikcionih fragmenata
P-gp	P- glikoprotein
PFK	populaciona farmakokinetička analiza
PRED	predviđene vrednosti oncentracije
PPI	inhibitor protonske pumpe
r	Piersov koeficijent korelacije
r <sup>2</sup>	koeficijent determinacije
RMSE	rezidualna srednja greška predviđanja
RNA	ribonukleinska kiselina
SF	srčana frekvenca
SNP	polimorfizam jednog nukleotida

SPDK	srednji pritisak u desnoj komori
TACE	TNF- $\alpha$ konvertujući enzim
TIMP	tkivni inhibitori metaloproteinaza
TLR	receptiri slični Toll-u
TNFR1	receptor za faktor tumorske nekroze alfa 1
TNFR2	receptor za faktor tumorske nekroze alfa 2
TNF- $\alpha$	faktor nekroze tumora- $\alpha$
TRADD	TNF receptoru pridružen domen smrti
TT	telesna težina

# SADRŽAJ

1	UVOD .....	7
2	PREGLED LITERATURE .....	9
2.1	Neurohumoralni model srčane insuficijencije .....	9
2.1.1	Hiperreaktivnost adrenergičkog sistema u srčanoj insuficijenciji .....	9
2.1.2	Adrenergički receptori i njihov značaj u SI .....	17
2.1.3	Blokatori adrenergičkih receptora .....	24
2.1.4	Polimorfizam beta receptora .....	29
2.1.5	Polimorfizam CYP2D6 .....	32
2.2	Kardioinflamatorni model srčane insuficijencije .....	37
2.2.1	Mehanizmi aktivacije imunog sistema u srčanoj insuficijenciji .....	38
2.2.2	Faktor nekroze tumora .....	44
3	HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA .....	57
4	CILJ RADA .....	58
5	ISPITANICI I METODE .....	59
5.1	Ispitanici .....	59
5.2	Metode .....	60
5.2.1	Ispitivanje genskih polimorfizama PCR-RFLP metodom .....	60
5.2.2	Određivanje koncentracije beta blokatora HPLC metodom .....	66
5.3	Statistička obrada podataka .....	67
5.4	Populaciona farmakokinetika .....	67
5.4.1	Populaciona farmakokinetička analiza bisoprolola i karvediola .....	70
6	REZULTATI .....	73
6.1	Rezultati ispitivanja polimorfizma -308 G /A gena za TNF- $\alpha$ .....	75
6.1.1	Polimorfizam -308 G/A gena za TNF- $\alpha$ : udruženost sa pojavom srčane insuficijencije .....	75
6.1.2	Polimorfizam -308 G/A gena za TNF- $\alpha$ : distribucija genotipova i alela prema kliničkim karakteristikama .....	77
6.1.3	Polimorfizam -308 G/A gena za TNF- $\alpha$ : uticaj na klinički tok bolesti .....	79
6.2	Rezultati ispitivanja Gly <sup>389</sup> Arg polimorfizma gena za $\beta_1$ receptor .....	81
6.2.1	Gly <sup>389</sup> Arg polimorfizam gena za $\beta_1$ receptor: udruženost sa pojavom srčane insuficijencije .....	81
6.2.2	Gly <sup>389</sup> Arg polimorfizam gena za $\beta_1$ receptor: distribucija genotipova i alela prema kliničkim karakteristikama .....	83
6.2.3	Gly <sup>389</sup> Arg polimorfizam gena za $\beta_1$ receptor: uticaj na klinički tok bolesti .....	85
6.3	Rezultati ispitivanja Ser <sup>49</sup> Gly polimorfizma gena za $\beta_1$ receptor .....	87
6.3.1	Ser <sup>49</sup> Gly polimorfizam gena za $\beta_1$ receptor: udruženost sa pojavom srčane insuficijencije .....	87

6.3.2	Ser <sup>49</sup> Gly polimorfizam gena za $\beta_1$ receptor: distribucija genotipova i alela prema kliničkim karakteristikama.....	88
6.3.3	Ser <sup>49</sup> Gly polimorfizam gena za $\beta_1$ receptor: uticaj na klinički tok bolesti .....	91
6.4	Rezultati ispitivanja Arg <sup>16</sup> Gly polimorfizma gena za $\beta_2$ receptor.....	92
6.4.1	Arg <sup>16</sup> Gly polimorfizam gena za $\beta_2$ receptor: udruženost sa pojavom srčane insuficijencije .....	92
6.4.2	Arg <sup>16</sup> Gly polimorfizam gena za $\beta_2$ receptor: distribucija genotipova i alela prema kliničkim karakteristikama.....	94
6.4.3	Arg <sup>16</sup> Gly polimorfizam gena za $\beta_2$ receptor: uticaj na klinički tok bolesti .....	97
6.5	Rezultati ispitivanja CYP2D6*4 polimorfizma .....	98
6.6	Korelacija između parametara varijabilnosti srčane frekvence (HRV) i nivoa TNF- $\alpha$ .....	102
6.6.1	Distribucija alela i genotipa TNF- $\alpha$ .....	102
6.7	Rezultati populacione farmakokinetske analize bisoprolola.....	106
6.8	Rezultati populacione farmakokinetske analize karvedilola.....	111
7	DISKUSIJA.....	118
7.1	Značaj polimorfizma $\beta_1$ receptora u srčanoj insuficijenciji .....	118
7.2	Značaj polimorfizma $\beta_2$ receptora u srčanoj insuficijenciji.....	128
7.3	Populaciona farmakokinetska analiza .....	135
7.3.1	Populaciona farmakokinetska analiza bisoprolola.....	136
7.3.2	Populaciona farmakokinetska analiza karvedilola.....	137
7.4	Značaj polimorfizma CYP2D6 u srčanoj insuficijenciji.....	140
7.5	Značaj polimorfizma TNF- $\alpha$ u srčanoj insuficijenciji.....	141
8	ZAKLJUČCI.....	148
9	LITERATURA.....	149

## 1 UVOD

Srčana insuficijencija (SI) je kompleksan klinički sindrom koji nastaje kao rezultat niza oboljenja a karakteriše se neurohumoralnom aktivacijom simpatičkog nervnog sistema, renin-angiotenzin-aldosteron sistema i sistema citokina kao odgovor na smanjenje udarnog volumena. Ekscesivna aktivacija ovih sistema rezultira hemodinamskim promenama kao što su sistemska vazokonstrikcija i povećanje retencije soli i vode, kao i remodeliranje miokarda koje je kasnije odgovorno za progresivnu prirodu bolesti.

Osamdesetih godina XX veka je jasno potvrđen značaj neurohumoralne aktivacije u SI, dok je efikasnost beta blokatora, primarno kontraindikovanih u SI, rezultatima brojnih studija dokazana sredinom devedesetih.

Beta blokatori su kompetitivni antagonisti na  $\beta$  adrenergičkom receptoru i redukuju nivo aktivacije simpatičkog nervnog sistema. Na osnovu rezultata studija u kojima su karvedilol, metoprolol i bisoprolol ispoljili veću efikasnost u odnosu na placebo u redukciji mortaliteta i morbiditeta kod pacijenata koji su na standardnoj terapiji koja uključuje ACE inhibitore, beta blokatori su dobili svoje mesto u terapiji srčane insuficijencije.

Međutim, nisu svi beta blokatori korisni u terapiji SI. Takođe, postoji varijabilnost u farmakološkom odgovoru na primenu beta blokatora kod pacijenata sa SI. Terapija beta blokatorima zahteva pažljivi monitoring i sporu titraciju da bi se neželjeni efekti ove grupe lekova minimizirali. Uprkos pažljivoj titraciji kod 25% pacijenata dolazi do obustave leka zbog neželjenih efekata. Dodatno, mortalitet i morbiditet povezan sa SI je i dalje visok. S toga, identifikacija uzroka varijabilnosti u odgovoru na beta blokadu može poboljšati terapijsku primenu ovih lekova. Genski uslovljene razlike mogu doprinosti različitom farmakološkom odgovoru. Farmakogenetika proučava kako se genski uslovljene razlike u farmakološkim dejstvima lekova mogu iskoristiti za identifikaciju pacijenata koji će imati koristi od beta blokade, odnosno kod kojih će neželjena dejstva ovih lekova usloviti njihovu obustavu.

Brojne studije su potvrdile polimorfizam  $\beta_1$  receptora. Postoje najmanje dva funkcionalno značajna polimorfizma: na poziciji 49 ekstracelularnog amino kraja serin je zamenjen glicinom (Ser49Gly). Gly49 varijanta receptora podleže mnogo brže nishodnoj regulaciji nego Ser49. Na intracelularnom kraju receptora koji je važan za vezivanje za G-protein, na poziciji 389 arginin (Arg) je zamenjen glicinom (Gly); ta varijanta  $\beta_1$

receptora ima nešto višu bazalnu i 3 do 4 puta veću izoprenalinom-stimulisanu aktivnost adenilatciklaze (AC).

Postoje najmanje tri funkcionalno značajna polimorfizma  $\beta_2$  receptora: Arg16Gly, Gln27Glu i Thr164Ile. Varijante  $\beta_2$  receptora pokazuju različitu senzitivnost na agonistom-indukovanu nishodnu regulaciju.

Pored interindividualnih varijacija postoje i interetničke, što istraživanje čini uvek aktuelnim, posebno za naše okruženje.

U brojnim studijama je ispitivana moguća veza između polimorfizma i kardiovaskularnih bolesti. Međutim, dobijeni rezultati nisu konzistentni. Sada se sa sigurnošću može reći da polimorfizam gena za beta adrenergičke receptore nema ključnu ulogu u nastanku bolesti (eng. disease-causing genes). Uz to, ovaj polimorfizam može uticati na terapijski odgovor nekih lekova. Potrebno je utvrditi kako polimorfizam gena za  $\beta$  receptore utiče na terapijski odgovor jer to vodi individualno prilagođenoj farmakoterapiji.

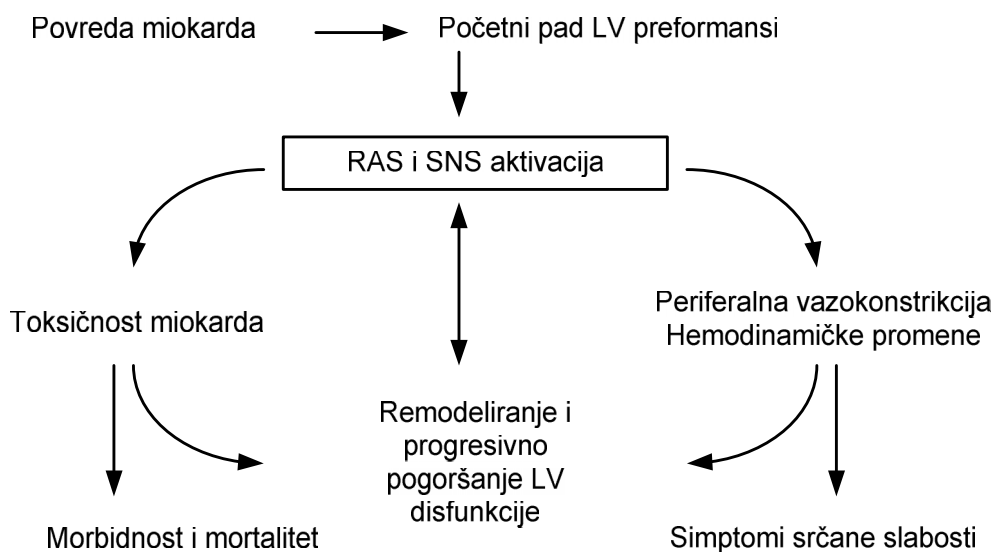


## 2 PREGLED LITERATURE

### 2.1 Neurohumoralni model srčane insuficijencije

#### 2.1.1 Hiperreaktivnost adrenergičkog sistema u srčanoj insuficijenciji

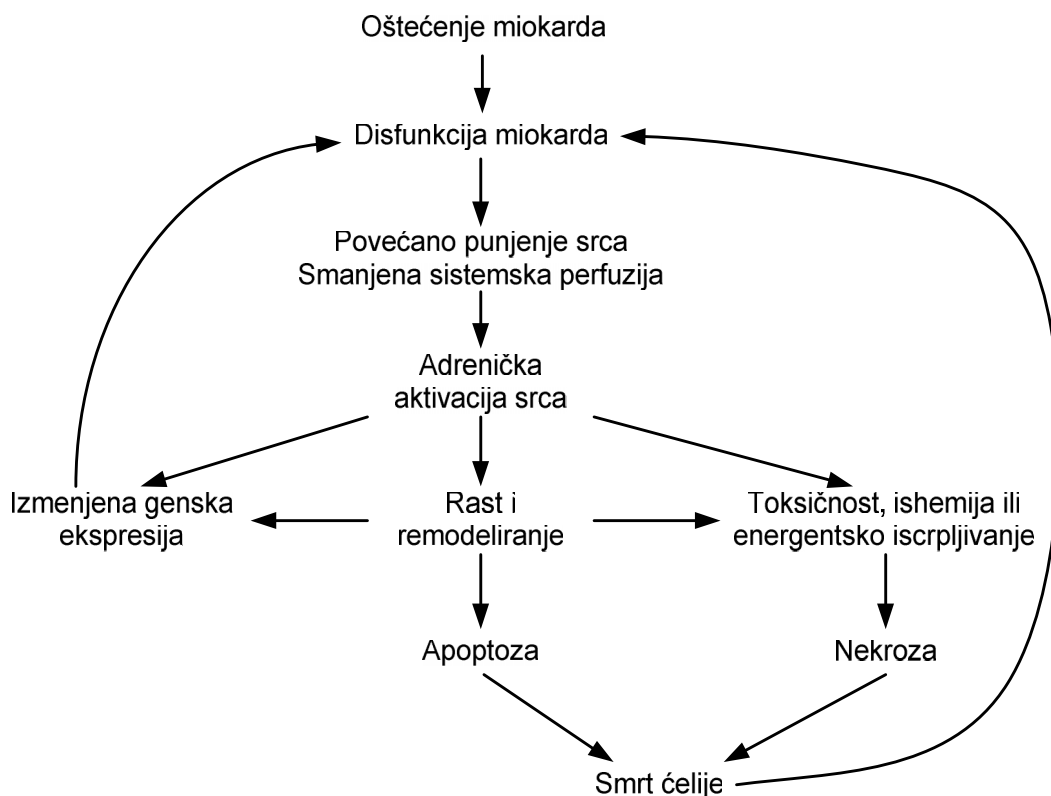
Iako je SI prepoznata kao čest kardiovaskularni sindrom sa visokom stopom mortaliteta o kojem se često pisalo, ne postoji jasna definicija, uprkos činjenici da se neadekvatna funkcija srca kao pumpe izdvaja kao veoma značajni deo te definicije. U toku razvoja miokardne disfunkcije dolazi do aktivacije kompenzatornih mehanizama u nastojanju da se očuva hemodinamska ravnoteža koji vremenom postaju vrlo važno obeležje srčane slabosti, odgovorni za progresivnu prirodu bolesti. „Adrenergička hipoteza“, definisana u ranim osamdesetim (1, 2), delimično preformulisana početkom devedesetih godina prošlog veka (3, 4) ne samo da ne gubi na značaju već se u brojnim studijama sa različitim pristupom i dalje testira (Slika 1).



Slika 1. "Adrenergička hipoteza" srčane insuficijencije  
Adaptirano i priređeno po ref.17

Prva saznanja o povećanoj adrenergičkoj aktivnosti dobijena su na osnovu nalaza povećane koncentracije noradrenalina u plazmi pacijenata sa SI, koje nastaje kao rezultat povećane centralne adrenergičke aktivnosti, dobijena su sredinom šesdesetih godina prošlog veka (5). Iako su rezultati brojnih istraživanja koja su usledila, potvrdila uticaj adrenergičke aktivnosti (6, 7), na plazma koncentraciju noradrenalina utiče i brzina preuzimanja od strane neurona i metabolički klirens noradrenalina (8), kao i da se

proučavanjem kinetike noradrenalina u srcu i bubregu, može više saznati o adrenergičkoj aktivnosti u SI nego samo merenjem plazma koncentracije noradrenalina (7).



Slika 2. Ključna uloga kardijalne adrenergičke aktivacije u nastanku neželjenih bioloških efekata koje vode progresivnoj miokardnoj disfunkciji (Adaptirano i priređeno po ref.27)

Stepen adrenergičke hiperaktivnosti nije kod svih pacijenata isti (7, 9). Ova varijabilnost nije povezana sa etiologijom srčane slabosti (10) i ne utiče na efikasnost terapije beta blokatorima (11). Imajući u vidu da je kardiotoksičnost noradrenalina dozno-zavisna, može se pretpostaviti da su pacijenti sa najvišim stepenom adrenergičke stimulacije pod najvećim rizikom za progresiju bolesti. To je više lokalizovana, a manje generalizovana aktivacija simpatikusa, i u prilog tome govore rezultati nekih studija u kojima je potvrđena selektivna aktivacija u srcu u odnosu na druge organe (7), kao i da je ona regionalno regulisana (12). Osim toga, simpatička aktivacija u srcu je prva neurohormonalna manifestacija koja se može uočiti kada asimptomatska progredira u simptomatsku srčanu slabost (13, 14). Kada se imaju u vidu ova saznanja, može se pretpostaviti da će srce biti primarno mesto ispoljavanja patofizioloških karakteristika srčane slabosti, odnosno da upravo visoka adrenergička aktivnost u srcu najviše doprinosi progresiji srčane slabosti (15).

### 2.1.1.1 Kliničke manifestacije adrenergičke aktivnosti u SI

U ranoj fazi srčane slabosti, adrenergička aktivacija predstavlja kompenzatorni mehanizam na slabljenje miokardne funkcije. Kao odgovor na signale poput nedovoljnog arterijskog punjenja, hipoperfuzije tkiva i centralne venske kongestije, aktiviraju se kompenzatorni mehanizmi da podrže insuficijentni miokard, koji uključuju: (1) ubrzanje srčanog rada, (2) povećanje kontraktilnosti, (3) povećanje prethodnog opterećenja srca- „preload“, (4) povećanje broja kontraktilnih elemenata-hipertrofija miokarda (4). Ove promene su rezultat aktivacije adrenergičkog i renin-angiotenzin-aldosteron sistema (RAAS), dva udružena neurohumoralna/autokrino-parakrina sistema. Pojačanje i ubrzanje srčanog rada je najvećim delom rezultat pojačane kardijalne adrenergičke aktivnosti i aktivacije  $\beta_1$  receptora. Pored toga, kateholamini poboljšavaju i dijastolnu funkciju jer posredstvom  $\beta$  receptora redukuju senzitivnost miofilamenata na  $Ca^{2+}$  i povećavaju sekvestraciju kalcijuma u sarkoplazmatski retikulum (SR) (16). Povećanje venskog priliva u srce i, Frank-Starlingovim mehanizmom, udarnog volumena, rezultat je aktivnosti adrenergičkog sistema i RAAS. Angiotenzin II je glavni medijator sekrecije aldosterona odgovornog za retenciju soli i vode u bubregu. U neosmotskoj stimulaciji lučenja vazopresina iz neurohipofize posreduju oba neurohumoralna sistema koja, pored toga, u pokušaju da održe centralni krvni pritisak i perfuziju vitalnih organa, izazivaju vazokonstrikciju arteriola.

Tabela 1. Neželjeni efekti adrenergičke aktivacije u SI

- Periferna arteriolarna i venska vazokonstrikcija ( $\uparrow$ afterload,  $\uparrow$  preload)
- Povećan srčani rad i potrošnja kiseonika
- Aktivacija RAAS
- Stimulacija endotelina
- Retencija soli i vode u bubrezima
- Hipertrofija i remodelovanje LK
- Tahikardija i druge aritmije
- Direktna kardiotoksičnost (nekroza, apoptoza)

Nažalost, korisne efekte stimulacije adrenergičkog sistema vrlo brzo nadvladaju neželjeni efekti koji pogoršavaju kliničku sliku i doprinose progresiji srčane slabosti. Naime, na kratkoročno korisne efekte redistribucije krvi u vitalne organe i povećanog priliva krvi u srce, nadovezuju se brojni štetni efekti stimulacije ovih neurohumoralnih

sistema poput povećane potrošnje kiseonika i metaboličkih izmena u miokardu. Dalje, vazokonstriktorno dejstvo noradrenalina i angiotenzina II je pojačano aktivnošću endotelina-1, koji dalje doprinosi povećanju perifernog vaskularnog otpora u SI (17). Zbog toga aktivaciju adrenergičkog i RAA sistema prati koaktivacija kontraregulatornih mehanizama - kao što su atrijalni natriuretički peptid i vazodilatatorni prostaglandini - koji nastoje da minimiziraju vazokonstrikciju u kojoj posreduju  $\alpha$ -adrenergički receptori i angiotenzin II (4).

### **2.1.1.2 Neželjeni efekti adrenergičke aktivacije u SI**

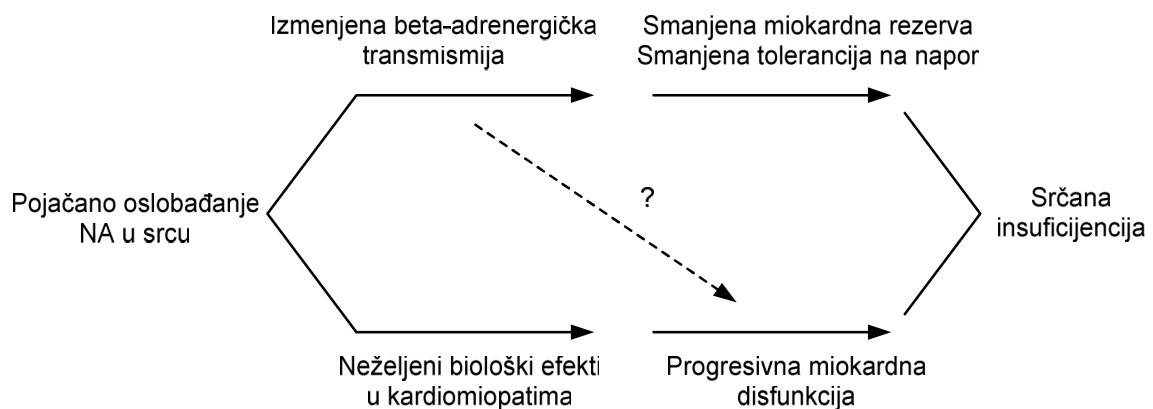
U SI pogoršanje kontraktilne funkcije miokarda je posledica (1) progresivne disfunkcije i (2) gubitka kardiomiocita. Ovaj niz patohistoloških promena koji je u osnovi remodelovanja LK i progresivne miokardne disfunkcije, je delom rezultat kompenzatorne neurohumoralne aktivacije.

#### **2.1.1.2.1 Mehanizmi nastanka miokardne disfunkcije u SI**

Jedan od mehanizama kojim hronična adrenergička hiperaktivnost dovodi do miokardne disfunkcije je *desensitizacija  $\beta$  adrenergičkog signalnog mehanizma* (1, 18). To je fiziološki adaptivni mehanizam koji nastoji da, barem privremeno, zaustavi progresiju SI. Međutim, po svemu sudeći, desensitizacija je korisna samo u kratkom periodu, a dalja simpatička stimulacija neminovno rezultira brojnim celularnim efektima koji vode progresiji srčane slabosti. Izmenjena  $\beta$  adrenergička transmisija uključuje: (1) nishodnu regulaciju  $\beta_1$  receptora (19, 20), (2) razdvajanje „uncoupling“  $\beta_2$  receptora (21), (3) razdvajanje „uncoupling“  $\beta_1$  receptora – mehanizam desensitizacije karakterističan samo za ishemijsku kardiomiopatiju (22), (4) ushodnu regulaciju  $\beta$  adrenoreceptorne kinaze ( $\beta$ ARK) koja je odgovorna za fosforilaciju  $\beta_1$  i  $\beta_2$  i doprinosi „uncoupling“-u (19) i (5) smanjenu ekspresiju i funkciju adenilat-ciklaze (23). Kao posledica desensitizacije  $\beta$  adrenergičke transmisije nastaje smanjenje inotropnog odgovora u toku egzogene primene  $\beta$  agonista, dobutamina kod pacijenata sa SI (24, 25), što je u osnovi smanjenja kontraktilne rezerve miokarda (24) i redukcije maksimalnog fizičkog napora (26). Dobra korelacija između gustine  $\beta$  receptora i maksimalnog fizičkog napora, je potvrđena kod pacijenata sa idiopatskom kardiomiopatijom (26) i na osnovu broja receptora jedino može da se sa sigurnošću predvidi stepen fizičkog opterećenja kod pacijenta sa SI (26, 27). Značaj noradrenalina u nastanku desenzitacije adrenergičkih receptora potvrđuju rezultati

studija u kojima su slični efekti noradrenalina registrovani u kulturi kardiomiocita kada se primeni u koncentracijama koje su prisutne (izmerene) u insuficijentnom srcu (28), u kojima je primena  $\beta$  blokatora i smanjeno vezivanje kateholamina za receptore (29, 30), povećalo gustinu  $\beta$  receptora i korigovalo druge promene u prenosu signala (31).

U svim srčanim šupljinama kod pacijenata sa sistolnom disfunkcijom potvrđena je **nishodna regulacija  $\beta_1$  receptora** (27). Ovo je najčešća promena u adrenergičkoj transmisiji čiji stepen zavisi od težine i etiologije srčane slabosti (24). Odnos  $\beta_1$  i  $\beta_2$  receptora se menja: od 80:20% kako je zdravom srcu, u 60:40% u srčanoj slabosti (32). U insuficijentnom srcu gustina  $\beta_1$  receptora je smanjena za 50% (34). Iako molekularna osnova agonistom-indukovane nishodne regulacije  $\beta$  receptora nije u potpunosti razjašnjena, na osnovu rezultata nekih studija se može pretpostaviti da je najverovatnije rezultat vezivanja proteina za iRNK za  $\beta$  receptore (34, 35). Potvrđeno je da u SI postoji agonistom indukovana ushodna regulacija AUF1, proteina koji se vezuje za adenin-uracil netranslirajući region iRNK, smanjuje njenu stabilnost i doprinosi nishodnoj regulaciji receptora (36).



Slika 3. Povećana kardijalna adrenergička aktivnost doprinosi prirodnom toku SI

Adaptirano i priređeno po ref.27

Druga izmena uslovljena prekomernom adrenergičkom stimulacijom je **razdvajanje („uncoupling“)  $\beta_2$  receptora** jer su, kao i  $\beta_1$  receptori, izloženi povćanoj koncentraciji noradrenalina (12). Aktivnost adenilat ciklaze nakon stimulacije  $\beta_2$  receptora, zinetrololom je za oko 30% manja u insuficijentnom srcu, iako je broj ovih receptora nepromenjen (37). Ovakve promene u senzitivnosti  $\beta_1$  receptora javljaju se samo kod pacijenta sa ishemijskom kardiomiopatijom i veoma malo su izražene u odnosu na  $\beta_2$  receptora (22).

Sledeće obeležje izmenjene  $\beta$  adrenergičke aktivnosti u SI je ***ushodna regulacija  $\beta$ -adrenoreceptorske kinaze*** ( $\beta$ ARK1, poznata je i kao GRK2) (19). Kao što je gore navedeno, ovaj enzim pripada porodici serin/treonin kinaza koje fosforilišu agonistom okupiran receptor. U srcu postoje tri izoforme GRK: GRK2 (ili  $\beta$ ARK1), GRK3 i GRK5. Kod pacijenata sa SI povećana je aktivnost samo GRK2, i to, kako rezultati nekih studija pokazuju, registruje se samo u ranoj fazi razvoja srčane slabosti ukoliko se aktivnost ovog enzima određuje u pretkomorama (38). Međutim, druga grupa autora je potvrdila povezanost težine bolesti i povećanja aktivnosti ovog enzima u limfocitima (39). Imajući u vidu značajnu ulogu GRK2 u regulaciji miokardne funkcije kao i značajno povećanje aktivnosti ovog enzima u SI, može se pretpostaviti da bi inhibicija GRK2 aktivnosti bila od koristi u srčanoj disfunkciji (40). Nažalost, klinička primena proteina inhibitora Raf-kinaze (Raf-kinase-inhibitor protein -RKIP) još nije izvesna (41).

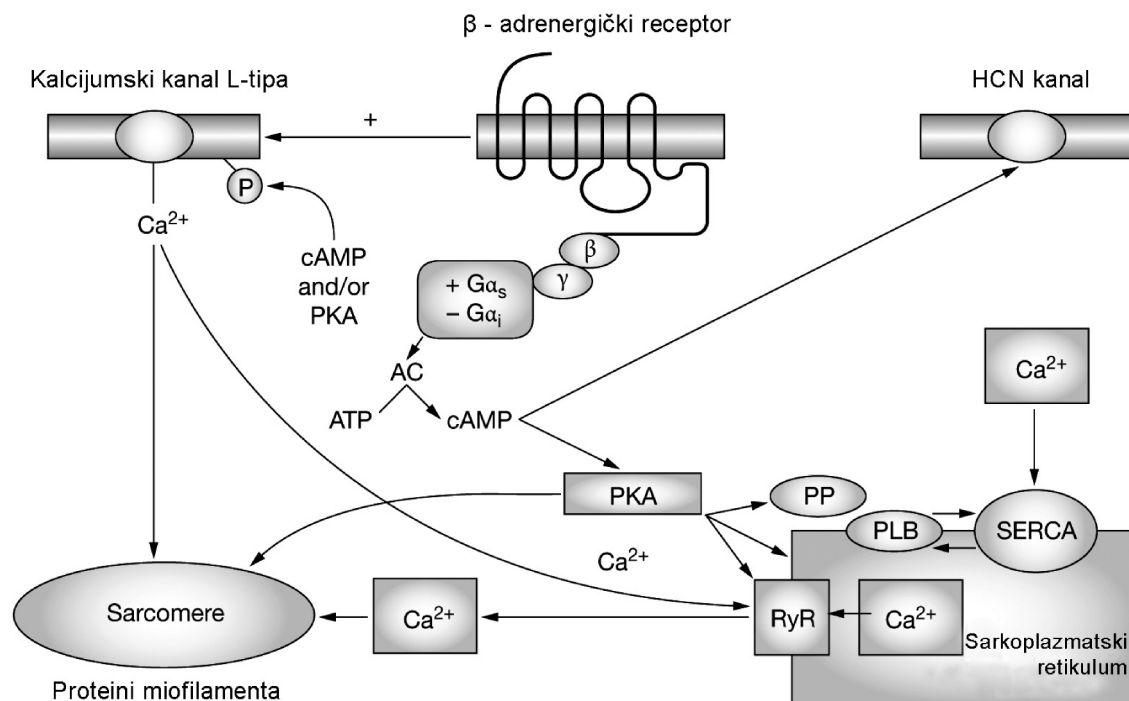
Značaj ***povećane aktivnosti  $G_i$***  u SI nije u potpunosti utvrđen. Dok na jednoj strani, povećana aktivnost  $G_i$  smanjuje pozitivno inotropno dejstvo aktivacije  $\beta_1$  i  $\beta_2$  receptora, na drugoj strani ima povoljan antiapoptotički efekat. Pored toga na eksperimentalnom modelu SI je dokazano da povećana aktivnost  $G_i$  smanjuje rizik od kateholaminima indukovanih aritmija (42).

#### **2.1.1.2.2 Celularni i biohemijski efekti adrenergičke aktivacije u SI**

Drugi način na koji hronično visoka adrenergička stimulacija šteti insuficijentnom srcu su biološke promene kardiomiocita ostvarene angažovanjem preostalih 40-50% kapaciteta prenosa signala preko  $\beta$  receptora (27). Neželjeni ćelijski i biohemijski efekti se manifestuju kao (1) maladaptivne promene u intracelularnoj kinetici kalcijuma i njegovom deponovanju u sarkoplazmatskom retikulumu (43) (2) gubitak kardiomiocita (nekroza, apoptoza) (44) (3) metabolički poremećaji kardiomiocita. Svi efekti su direktno ili indirektno povezani sa simpatoadrenergičkom stimulacijom i imaju važnu ulogu u progresiji disfunkcije i remodelovanju LK (27).

U toku razvoja srčane slabosti izmenjena je funkcija i ekspresija nekih proteina koji imaju veoma važnu ulogu u mobilizaciji  $Ca^{2+}$  u toku kontrakcije kardiomiocita. Naime, kako rezultati nekih studija to pokazuju, inače fino podešenu, mobilizaciju  $Ca^{2+}$ , u SI remeti hiperfosforilacija rijanodinskih receptora (eng. Ryanodine Receptor - RYR2) (45), receptora koji su važni za izlazak  $Ca^{2+}$  u citosol i iniciranje kontrakcije kardiomiocita. Kao rezultat pojačane aktivnosti RYR2 nastaje smanjenje depoa  $Ca^{2+}$ , smanjena povezanosti ekscitacije i kontrakcije i delom pogoršanje sistolne disfunkcije (46). Pored toga,

izmenjena je i funkcija još dva molekula koji su odgovorni za obrnut proces, odnosno brzo i efikasno uklanjanje  $\text{Ca}^{2+}$  iz citosola. To su  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-azna pumpa u membrani sarkoplazmatskog (sarkoplazminog) retikuluma (eng. sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase pump - SERCA) i  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  izmenjivačka pumpa (eng.  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger (NCX) pump). U insuficijentnom miokardu smanjena aktivnost SERCA2a nastaje zbog smanjene ekspresije (47), kao i ushodne funkcionalne regulacije njegovog inhibitora fosfolambana (PLB) (43). Slabljenje funkcije SR se delimično kompenzuje ushodnom regulacijom NCX koja korelira sa sistolnom i dijastolnom disfunkcijom (48). Prema tome, pomenuto smanjeno preuzimanje  $\text{Ca}^{2+}$  u SR u toku dijastole prati redukovano oslobađanje  $\text{Ca}^{2+}$  u toku sistole i slabljenje kontraktalnog odgovora (slika 4).



Slika 4. Šematski prikaz povezanosti  $\beta$  adrenergičke aktivacije i intracelularne kinetike kalcijuma. Adaptirano i priređeno po ref. 57.

Dva su mehanizma odgovorna za gubitak kardiomiocita u SI: **nekroza** (49) i **apoptoza** (44). Nekroza nastaje usled citotoksičkog delovanja kateholamina i potvrđena je i u akutnoj i hroničnoj miokardnoj disfunkciji, kao i *in vitro* uslovima, na osnovu rezultata često citirane studije Mann-a i sar. (28). Da je nekroza kardiomiocita rezultat pojačane simpatoadrenergičke stimulacije ukazuje povoljan efekat primene  $\beta$  blokatora (50). Za razliku od nekroze koja nastaje nakon letalnog oštećenja, apoptoza je aktivni, energetski zavistan, genski kontrolisan proces koji je rezultat disregulacije ćelijskog ciklusa.

Apoptoza najčešće nastaje usled prolongirane stimulacije rasta adultnog kardiomiocita koji ne može da se deli (4). Neki od okidača apoptoze kardiomiocita su posledica pojačane adrenergičke stimulacije i uključuju povećanje koncentracije kalcijuma u citosolu (51), hipoksiju (52) i visoku koncentraciju noradrenalina (53). Kao pokretač apoptoze posebno je interesantna redukovana oksigenacija miokarda ili ograničena hipoksija, koja nastaje zbog povećanih metaboličkih potreba kao i smanjenog snabdevanja miokarda krvlju. Imajući u vidu da su frekvencija srčanog rada, kontraktilnost i tenzija zida komora tri važne determinante potrošnje kiseonika u miokardu, može se pretpostaviti da su metaboličke potrebe dilatirane komore insuficijentnog srca veće u odnosu na zdravo srce (54). Na drugoj strani, ograničeno snabdevanje kiseonikom i relativna ishemija nastaju jer intenzivna fibroza i strukturne promene dilatirane komore smanjuju koronarnu perfuziju (4). Upravo u regionima intenzivnije fibroze, kako rezultati nekih studija to potvrđuju, najčešća se javlja apoptoza kardiomiocita (55). Uz to, rezerve visokoenergetskih fosfata su redukovane, njihova upotreba neekonomična, te insuficijentno srce postaje, kao što je Katz istakao, maksimalno energetski iscrpljeno (eng. Energy- starved heart) (56). Ove metaboličke promene u dužem vremenskom periodu oštećuju brojne subcelularne procese i doprinose progresiji miokardne disfunkcije.

Prema tome, u osnovi sistolne disfunkcije uzrokovane hroničnom adrenergičkom stimulacijom i desensitizacijom  $\beta$  receptora je izmenjena homeostaza  $Ca^{2+}$  u hipertrofisanom insuficijentnom kardiomiocitu (57). Neto efekat svih ovih promena je povećanje intracelularne koncentracije  $Ca^{2+}$  u toku dijastole. Ovako visoka koncentracija  $Ca^{2+}$  odgovorna je za ekspresiju gena koji kodiraju proteine, važne u  $\beta$  adrenergičkoj transmisiji, intracelularnoj kinetici  $Ca^{2+}$ , aktivaciji i funkciji sarkomera, deponovanju i razgradnji fosfata i održanju integriteta citoskeleta (27). Naime, izmene u ekspresiji gena u srcu, koje se opisuju kao rekapitulacija fetalnog genskog programa (neki geni se postnatalno reaktiviraju, dok se smanjuje ekspresija nekih adultnih gena) podrazumeva povećanje  $\beta$  izoforme teškog lanca miozina,  $\alpha$  aktina i atrijalnog natriuretskog peptida (ANP) (58). Osim toga u insuficijentnom srcu smanjena je ekspresija  $\alpha$  izoforme teškog lanca miozina i  $Ca^{2+}$ -ATP-aze sarkoplazmatskog retikuluma (SERCA2a). Izmenjena ekspresija gena u SI je posledica, kako rezultati nedavnih studija pokazuju, aktivacije  $Ca^{2+}$ -kalkmodulin zavisna protein kinaza II (CaMKII) signalnog puta (59).

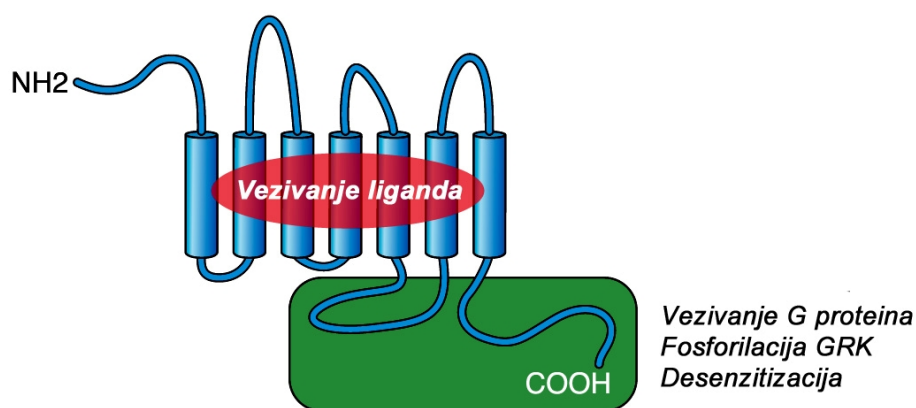
Kao što je gore navedeno, kao rezultat te pojačane adrenergičke aktivnosti javljaju se uobičajene kliničke manifestacije prirodnog toka srčane slabosti, a to su smanjena tolerancija fizičke aktivnosti, progresija miokardne disfunkcije i povećanje prevalnce



nekada fatalnih aritmija. Hronično visoka adrenergička aktivnost doprinosi progresiji srčane slabosti na dva načina: direktnim nepovoljnim dejstvom na srce kao i brojnim perifernim efektima.

### 2.1.2 Adrenergički receptori i njihov značaj u SI

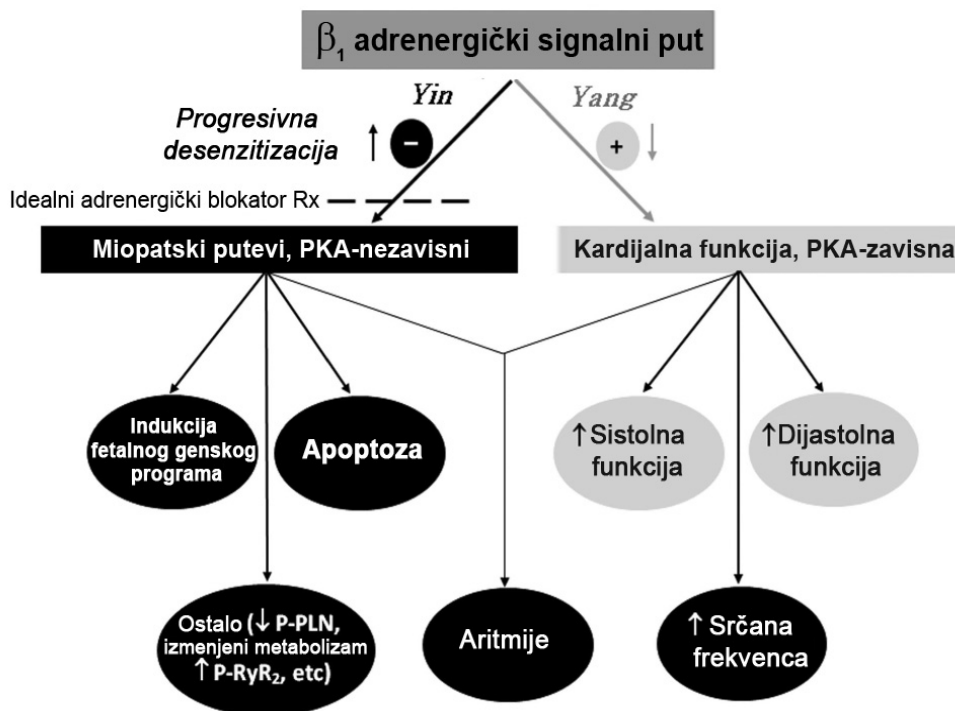
U humanom miokardu se nalaze dve klase adrenergičkih receptora,  $\alpha$  i  $\beta$  adrenergički receptori. Obe klase receptora pripadaju grupi receptora koji su vezani za G-proteine i imaju nekoliko dobro definisanih podtipova sa različitom funkcijom: po tri podtipa  $\beta$  receptora ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  i  $\beta_3$ ),  $\alpha_1$  ( $\alpha_{1a/d}$ ,  $\alpha_{1b}$  i  $\alpha_{1c}$ ) i  $\alpha_2$  ( $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  i  $\alpha_{2C}$ ) (60).



Slika 5. Prototip adrenergičkih receptora (Adaptirano i priređeno po ref. 3)

U zdravom srcu prisutni  $\beta_1$  i  $\beta_2$  receptori su u odnosu 60-70:40-30% u pretkomorama i 70-80:30-20% u komorama (22, 60). Adrenergički receptori pripadaju grupi receptora koji su vezani za G protein. G protein je ključni signalni molekul u kaskadi nastanka drugih glasnika i u lancu transdukcije poruka koje nose  $\beta$  adrenergički agonisti. Po strukturi predstavlja trimer, kompleks od tri subjedinice:  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ , svoje ime duguje vezivanju za gvanozin trifosfat (GTP). Po funkciji G protein pripada većoj grupi enzima, GTPaza.  $\beta$  receptori svoje efekte postižu posredstvom  $G_s$  proteina, koji nakon vezivanja agonista za receptor disosuje na subjedinice,  $G_{s\alpha}$  i  $G_{s\beta\gamma}$  (61).  $G_{s\alpha}$  subjedinica aktivira adenilat ciklazu (AC), enzim koji posreduje u sintezi cikličnog adenozin monofosfata (cAMP). Ovu kaskadu nastavlja protein kinaza-A (PK-A), enzim koji se aktivira vezivanjem cAMP-a za regulatornu subjedinicu, a odgovoran je za fosforilaciju brojnih regulatornih proteina, nuklearnih transkripcionih faktora, jonskih kanala poput voltažno zavisnih kalcijumovih kanala L-tipa i metaboličkih regulatornih enzima (27). U

pretkomorama stimulacija  $\beta_1$  i  $\beta_2$  receptora dovodi do maksimalnog povećanja snage srčane kontrakcije i ubrzanja srčanog rada, dok u komorama takav odgovor ima samo stimulacija  $\beta_1$  receptora (60). Nakon fosforilacije voltažno zavisnih  $\text{Ca}^{2+}$ -kanala L-tipa, povećava se influks  $\text{Ca}^{2+}$  u kardiomiocit u toku akcionog potencijala i postiže inotropni efekat (62). Pored toga, dolazi do fosforilacije fosfolambana i troponina I, a zatim i preuzimanja  $\text{Ca}^{2+}$  u sarkoplazmatski retikulum i redukcije afiniteta  $\text{Ca}^{2+}$  za troponin C, odnosno lusitropni efekat (60). Aktivacija ovih receptora je odgovorna i za hronotropni, dromotropni i batmotropni efekat  $\beta$  agonista (60) (Slika 6). Nakon stimulacije  $\beta_2$  receptora fosforilacija ovih ciljnih proteina, odnosno pozitivni inotropni odgovor je znatno slabiji u odnosu na  $\beta_1$  receptor (63). Osim toga, vrlo važna karakteristika  $G_s$  signalnog puta koji nastaje posredstvom  $\beta_2$  receptora funkcionalna kompartmentizacija za razliku od difuzne  $G_s$  kaskade nakon stimulacije  $\beta_1$  receptora (64). Dobro je poznato da  $\beta_2$  receptor pored aktivacije ove klasične signalne kaskade,  $G_s$ -AC-cAMP-PKA, aktivira i  $G_i$  proteine (65, 66). Dodatno povezivanje sa  $G_i$  ne samo da kvantitativno i kvalitativno menja  $G_s$  signalni put već ima i kardioprotektivne efekte. Međutim, upoznavanje adrenoreceptorne biologije u poslednjih nekoliko decenija je doprinelo da ova linearna signalna paradigma zamenjena kompleksnom multidimenzijalnom „signalosomom“ u kojoj je individualni adrenoreceptor može biti u dinamičkoj, prostorno i vremenski regulisanoj vezi sa brojnim G proteinima ali i drugim signalnim ili skafold proteinima (eng. scaffold) (67). To konkretno znači da u toku perzistentne stimulacije podtip  $\beta$  receptora vremenom može da zameni jednu signalnu kaskadu drugom i tako ima različit, čak suprotan uticaj na strukturu i funkciju miokarda (67). Ova pojava da jedan ligand može biti antagonist za jedan signalni put, dok istovremeno aktivira druge G protein-zavisnim ili nezavisnim mehanizmom (68) naziva se funkcionalna selektivnost ili kolateralna/pluridimenzionalna efikasnost. U toku hronične adrenergičke hiperaktivnosti,  $\beta_1$  receptor zamenjuje gore pomenuti  $G_{s\alpha}$ -AC-cAMP-PKA signalni put sa  $G_{s\beta\gamma}$ -CaMKII koji vodi apoptozi kardiomiocita i maladaptivnom remodelovanju (69). Na drugoj strani,  $\beta_2$  receptor aktivaciju  $G_s$  proteina zamenjuje stimulacijom inhibitorynog G proteina,  $G_{i/o}$  (65) što doprinosi desensitizaciji receptora i smanjuje inotropni odgovor. Međutim, ova zamena G proteina pokreće i nove signalne puteve, tzv. MAPK (mitogen-activated protein kinases -MAPK) sa kardioprotektivnim dejstvom (70). Aktivacija ovih signalnih puteva, odgovornih za mitogene i antiapoptične efekte nastaje pre svega nakon  $\beta_2$  stimulacije. Međutim, ova kolateralna/pluridimenzionalna efikasnost je potvrđena nešto kasnije i za  $\beta_1$  (71).

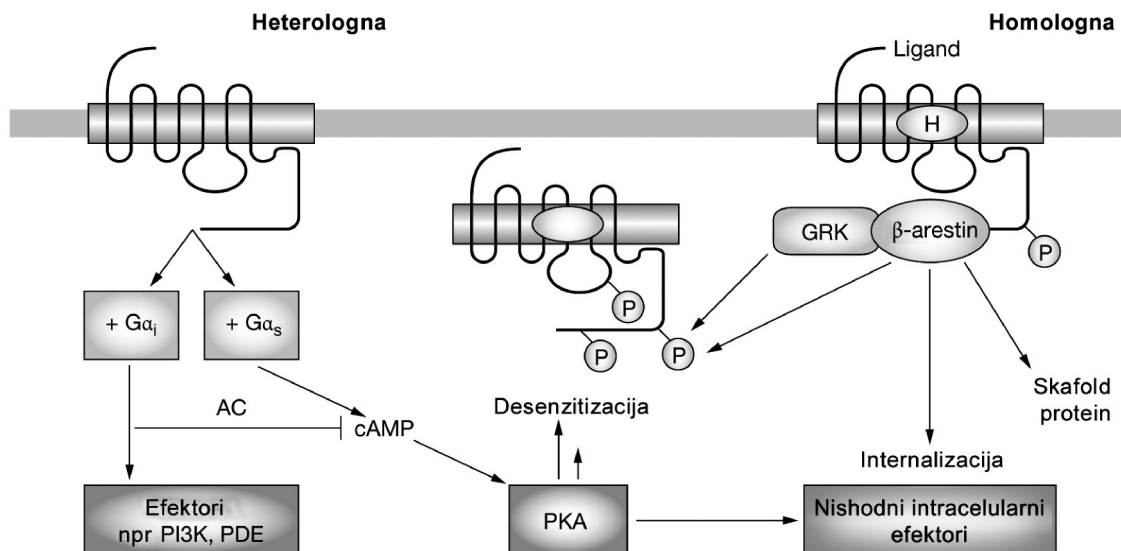


Slika br. 6 PKA-nezavisni i PKA-zavisni nishodni signalni putevi  $\beta_1$ receptora  
(Adaptirano i priređeno po ref.152)

Tradicionalni koncept  $\beta$  adrenoreceptorne signalne transdukcije podrazumeva da u fiziološkim uslovima kateholamini postižu pozitivni inotropni, lusitropni i hronotropni efekat aktivirajući cAMP-PKA signalnu kaskadu. Međutim, rezultati nedavnih studija ukazuju da je jedna druga kaskada odgovorna za kontraktilni odgovor kateholamina u uslovima perzistentne stimulacije  $\beta_1$  receptora (72). Ključni enzim tog signalnog puta, aktiviranog posredstvom druge subjedinice  $G_{s\beta\gamma}$ , je  $Ca^{2+}$ - kalmodulin zavisna protein kinaza II (CaKMII) (69, 72). Pomenuti enzim u uslovima permanentne aktivacije  $\beta_1$  receptora ostaje aktivan, signalni put koji pokreće postaje dominantni u regulaciji kontraktilne funkcije kardiomiocita (67). Kako rezultati Wang-a i saradnika pokazuju, PKA signalni put je aktivan 10 min. nakon stimulacije  $\beta_1$ , dok se CaKMII-aktivnost registruje 15 min. nakon stimulacije i održava najmanje 24h (73). Pored toga, ovaj signalni put je odgovoran za nastanak apoptoze nakon permanentne stimulacije  $\beta_1$  receptora (69). U prilog ovoj tvrdnji govore rezultati studije Olofsson-a i sar., u kojoj je inhibicija CaKMII mnogo efikasnije smanjila apoptozu kardiomiocita u odnosu na inhibiciju nekih drugih kinaza (74). Pored povećane aktivnosti i ekspresije ovog enzima u humanom kardiomiocitu insuficijentnog srca (75, 76), potvrđena je i pozitivna korelacija između ušodne regulacije njegove aktivnosti i EFLK (76). Kako rezultati nekih studija ukazuju, aktivnost ovog signalnog puta se povezuje sa hipertrofijom kardiomiocita (77) i fetalnom genskom

reekspresijom (59). Prema tome, perzistentna aktivacija CaMKII nakon stimulacije  $\beta_1$  receptora može biti ključni patofiziološki mehanizam nastanka miokardnog remodelovanja u SI.

Kao što je gore navedeno, perzistentna stimulacija  $\beta_2$  receptora je povezana sa aktivacijom  $G_{i/o}$  umesto  $G_s$  i ima dvojak efekat. Dok na jednoj strani aktivacija  $G_{i/o}$  umanjuje efekat stimulacije kaskade koju čine AC-cAMP-PKA i umanjuje njihov pozitivan inotropni i lusitropni efekat, na drugoj strani ima kardioprotektivni efekat jer posredstvom  $G_{\beta\gamma}$  aktivira fosfoinozitol 3-kinazu (PI3K) (78, 79). Pored toga,  $G_{i/o}$  učestvuje u inhibiciji  $Ca^{2+}$  kanala, stimulaciji ulazno ispravljajčkih kalijumovih kanala i stimulaciji fosfodiesteraza (80). Međutim, u fiziološkim uslovima uticaj stimulacije  $\beta_2$  receptora i aktivacije  $G_{i/o}$  u mehanizmu nastanka negativnog inotropnog odgovora je u potpunosti blokiran (81).



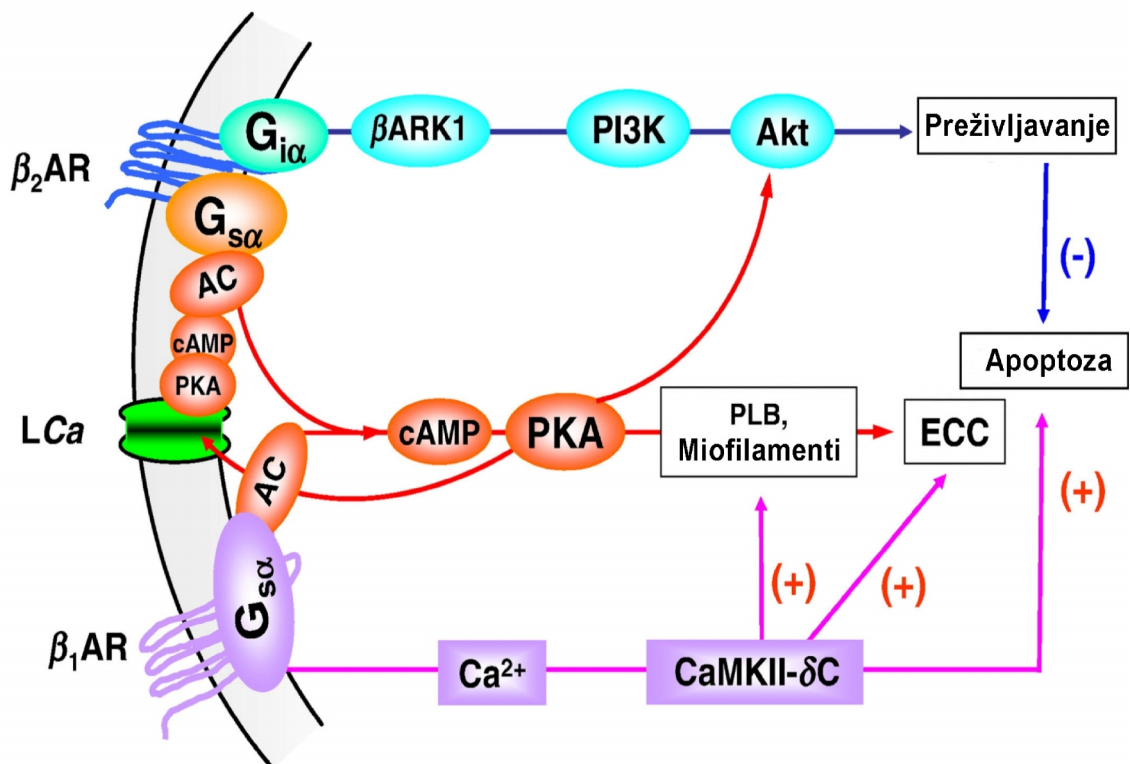
Slika 7. Šematski prikaz desenzitizacije i intracelularnog signalanog puta (preuzeto i adaptirano iz ref.57)

Dobro je poznato da vezivanje agonista za  $\beta$  receptore prate i neke intracelularne promene koje vode brzom slabljenju  $\beta$  adrenergičke transmisije koja se naziva desenzitizacija. Prvi korak u desenzitizaciji je fosforilacija receptora aktivnošću kinaza, (second messenger-dependent protein kinases) kao što su PKA i PKC, ili G receptorne kinaze-GRK (G protein-coupled receptors (GPCRs) kinases), što onemogućava povezivanje receptora sa G proteinom (82). Lokalizacija serin i/ili treonin rezidua u III intracelularnoj petlji ili C- kraju receptora koje podležu fosforilaciji zavisi od vrste kinaze (83). PKA i PKC mogu posredovati u fosforilaciji  $\beta$  receptora iako su aktivirane

stimulacijom drugih receptora. Ovaj tip desenzitizacije nestimuliranih receptora naziva se *heterolognom desenzitizacijom* (57). Na ovaj način dolazi do slabljenja  $\beta$  adrenergičke transmisije pri niskoj koncentraciji agoniste. U kardiomiocitima ova fosforilacija  $\beta_2$  receptora je odgovorna za slabljenje inotropnog odgovora jer menja njihov afinitet za G proteine: smanjuje afinitet za  $G_s$  a povećava za  $G_i$  (21). Međutim, kada je agonist prisutan u visokoj koncentraciji glavni mehanizam desenzitizacije je fosforilacija  $\beta$  receptora u kojoj posreduje GRK2 aktivirana  $G_{s\beta\gamma}$  subjedinicom (84). To je *homologna desenzitizacija* agonistom okupiranog receptora koju prati vezivanje  $\beta$  arestina, proteina odgovoranog za internacionalizaciju  $\beta$  receptora (85). Nakon defosforilacije,  $\beta$  receptor zauzima svoje mesto na površini membrane i obnavlja se njegova senzitivnost na vezivanje agonista. Druga mogućnost je degradacija fosforiliranog receptora i smanjenje njihovog broja, odnosno, nishodna regulacija (85). Pored toga, nakon internacionalizacije receptora pokreću se neuobičajeni signalni putevi, poput MAPK-a (80) dok se standardna kaskada cAMP-AC-PKA aktivira nakon stimulacije  $\beta$  receptora na membrani. Iako su arestini prvobitno opisani kao proteini koji se vezuju za fosforilirani receptor u cilju njegove desenzitizacije (82) danas su poznati kao bifunkcionalni ćelijski medijatori. Naime, oni su skafold proteini za MAPK signalne puteve poput ERK (86), JNK i p38 (87), ali i PI3K kinaze (88).

U toku hronične adrenergičke hiperaktivnosti dolazi do translokacije  $\beta_2$  receptora izvan kaveola i narušavanja subcelularne organizacije celokupnog signalnog sistema. Naime, jedno od najvažnijih saznanja o adrenergičkom signalnom sistemu u poslednjih desetak godina je kompartmanizacija cAMP-PKA signalnog sistema u kardiomiocitima, prvobitno opisana još početkom osamdesetih godina prošlog veka (89). Ova subcelularna organizacija podrazumeva da se uz pomoć nekih subcelularnih proteina (eng. A-kinase anchoring proteins-AKAPs), u posebnim mikrodomenima, nalaze određene izoforme AC, PKA, fosfodiesteraze (PDE) i fosfoprotein fosfataze, u blizini specifičnog supstrata PKA (64, 90). Na ovaj način je u diskretnom subcelularnom regionu obezbeđena veoma precizna kontrola lokalne koncentracije cAMP-a, u okolini, za membranu vezane AC (90). Dok zdravi kardiomiocit ima prostrano restriktivni cAMP-signalni sistem, u srčanoj slabosti je gore pomenuta translokacija  $\beta_2$  receptora odgovorna za širenje signala kao kod stimulacije  $\beta_1$  receptora, što može objasniti gubitak protektivnog efekta njihove stimulacije (91).

Na značaj  $\beta_1$  receptora u patološkim stanjima najbolje ukazuju rezultati eksperimentalnih studija u kojima je umereno povećanje broja receptora praćeno razvojem progresivne dilatantne kardiomiopatije i bez egzogene primene kateholamina (92). U istom eksperimentalnom modelu nije potvrđena podjednaka kardiotoksičnost  $\beta_2$  receptora (93). Međutim, kada se broj  $\beta_2$  poveća više od 300 puta razvija se slična progresivna dilatantna kardiomiopatija kao kod umerenog povećanja broja  $\beta_1$  receptora (94). Na osnovu prvih rezultata studija sa prekomernom ekspresijom  $\beta_2$  receptora, koji su u prvim mesecima života transgenih životinja pokazali povećanje kontraktilnog odgovora na adrenergičku stimulaciju (95), autori su pretpostavili da stimulacija  $\beta_2$  receptora može biti korisna. Međutim, potpuno suprotne rezultate dobile su studije u kojima je efekat povećanja  $\beta$  receptora praćen u dužem vremenskom periodu. Naime, razvoj dilatantne kardiomiopatije je posle nekoliko meseci registrovan kod transgenih životinja sa prekomernom ekspresijom  $\beta_1$  (92) i  $\beta_2$  receptora (96). Interesantno je da kod transgenih životinja sa prekomernom ekspresijom  $\beta_2$  receptora, uočena intenzivnija apoptoza (97, 99) za koju se pretpostavlja da je rezultat narušene kompartmanizacije cAMP (99).



Slika 8. Podtip-specifično vezivanje  $\beta_1$  i  $\beta_2$  receptora za G proteine u kardiomiocitu (preuzeto i adaptirano iz ref. 99).

Značaj  $\beta_3$  receptora u humanom miokardu nije u potpunosti razjašnjen. Mada je bilo studija čiji su rezultati negirali njihovo postojanje u srcu (99), Gauthier i sar. su potvrdili prisustvo  $\beta_3$  receptora na humanim kardiomiocitima koji su, za razliku od masnog tkiva, povezani sa  $G_{i/0}$  i imaju negativno inotropno dejstvo (101). Imajući u vidu dobro poznate izmene ekspresije podtipova  $\beta$  receptora u SI, u prilog značaja  $\beta_3$  receptora u patogenezi srčane slabosti govore i činjenice da su ovi receptori povezani sa  $G_{i/0}$  koji podležu ushodnoj regulaciji u SI (102), da su relativno rezistentni na agonistom stimulisanu (homolognu) desenzitizaciju (103), kao i heterolognu desenzitizaciju jer nemaju sekvencu koja se fosforiliše pod uticajem PKA i  $\beta$ -ARK (103), aktivirani su pri mnogo većim koncentracijama kateholamina u odnosu na  $\beta_1$  i  $\beta_2$  (104) i na kraju, da podležu ushodnoj regulaciji u toku razvoja SI (106). Za razliku od  $\beta_1$  receptora (106), ushodna regulacija  $\beta_3$  receptora nije praćena hipertrofijom, intersticijalnom fibrozom i razvojem SI u eksperimentalnom modelu sa prekomernom ekspresijom gena za ove receptore (107). Protektivna uloga  $\beta_3$  receptora u toku razvoja SI može se objasniti njihovim posredovanjem u redukciji aktivacije voltažno zavisnih kalcijumskih kanala L-tipa, boljom dijastolnom funkcijom zbog produkcije NO, očuvanim intracelularnim sadržajem ATP i kreatin fosfata usled negativnog inotropnog dejstva kao i redukcijom prethodnog i naknadnog opterećenja srca usled vazodilatacije (108). Prema tome, negativno inotropni efekat  $\beta_3$  receptora se u zdravom srcu može posmatrati kao „sigurnosni ventil“ u toku intenzivne adrenergičke stimulacije (stres, intenzivan fizički napor). Međutim, sa progresijom srčane slabosti aktivacija  $\beta_3$  receptora, negativnim inotropnim efektom i stimulacijom apoptoze kardiomiocita pojačavaju disfunkciju miokarda (108).

Pretpostavka o prisustvu četvrtog podtipa receptora u humanim kardiomiocitima je proistekla iz rada Kaumann-a i sar. koji su opisali povezanost ovog „receptora“ sa  $G_s$  kaskadom, njegovo pozitivno inotropno dejstvo i neosetljivost na klasične  $\beta$  blokatore kao što je propranolol (109). Međutim, iako se tada verovalo da su to „čisti  $\beta_4$ “ receptori, danas prevladava mišljenje da se radi o različitom mestu vezivanja na  $\beta_1$  receptoru: mesto vezivanja sa visokim afinitetom (eng. high-affinity site) -  $\beta_{1H}$  i mesto vezivanja sa niskim afinitetom vezivanja (eng. low affinity state) -  $\beta_{1L}$   $\beta_1$  receptora (110).  $\beta_{1H}$  se aktivira kateholaminima, a blokira klasičnim  $\beta$  blokatorima kao što u karvedilol, bisoprolol, metoprolol i atenolol. Drugo mesto vezivanja ( $\beta_{1L}$ ) aktivira CGP-12177, atipični agonist, a blokiraju karvedilol i bupranolol (111). Značaj mesta vezivanja niskog afiniteta na  $\beta_1$  receptoru su potvrdili rezultati nekih kliničkih studija. Naime, primena bucindolola,

nespecifičnog  $\beta$  blokatora sa vazodilatatornim efektom nije smanjila mortalitet kod pacijenta sa SI (112), što se može delom objasniti parcijalnom agonističkom aktivnošću na nivou  $\beta_{1L}$  receptora (113). Na drugoj strani, korisni efekti karvedilola u lečenju SI se delom mogu objasniti i blokadom  $\beta_{1L}$  receptora (114).

Prisustvo i značaj  $\alpha_1$ -adrenoreceptora na funkciju humanih kardiomiocita je odnedavno poznata (115). Imajući u vidu da je njihova primarna uloga u regulaciji perifernog vaskularnog tonusa, ne iznenađuje pet puta manja zastupljenost u odnosu na  $\beta$  receptore, kao i slabiji inotropni odgovor nakon njihove aktivacije (116, 117). Međutim, u nekim patološkim stanjima kao što je opterećenje pritiskom ili infarkt miokarda, ovi receptori, kao što rezultati nekih nedavnih studija ukazuju, doprinose zaštiti kardiomiocita i sporijem remodelovanju LK (118). U skladu sa ovim su rezultati Rorabaugh-a i sar. da u eksperimentalnom modelu sa prekomernom kardijalnom ekspresijom  $\alpha_{1A}$  receptora postoji manje ishemijsko oštećenje (119). Dosadašnja istraživanja o značaju  $\alpha_{1B}$  receptora su veoma skromna, a rezultati su suprotni u odnosu na funkciju i značaj  $\alpha_{1A}$  receptora. Naime, prekomerna ekspresija ovih receptora uslovljava miokardnu depresiju, verovatno aktivacijom  $G_i$  (116). Značaj  $\alpha_{1D}$  receptora je mnogo manji u odnosu na druge podtipove  $\alpha_1$  receptora i predominantno su prisutni u koronarnim arterijama (120).

Dobro je poznato da  $\alpha_2$  receptori imaju važnu ulogu u regulaciji oslobađanja neurotransmitera iz simpatičkih nervnih završetaka i adrenergičkih neurona u centralnom nervnom sistemu. Za presinaptičku kontrolu oslobađanja neurotransmitera posebno su značajna dva podtipa  $\alpha_2$  receptora,  $\alpha_{2A}$  i  $\alpha_{2C}$ , jer ukoliko nedostaju, kao rezultati jedne često citirane studije Hein-a i sar. ukazuju, razvija se hipertrofija miokarda, fibroza i srčana slabost (121).

Ekspresija  $\beta_1$  receptora u srcu korelira sa koncentracijom noradrenalina u sistemske cirkulaciji kao i u koronarnom sinusu. Neke od izmena  $\beta$ -adrenergičke transmisije u toku progresije srčane slabosti nastaju i u toku starenja. Naime, postoji dobra korelacija između gustine  $\beta_1$  receptora i starosti: sa starenjem se smanjuje broj  $\beta_1$  receptora (122).

### **2.1.3 Blokatori adrenergičkih receptora**

Blokatori adrenergičkih receptora ili kako se još nazivaju adrenergički antagonisti, su lekovi koji inhibiraju efekte aktivacije  $\alpha$  i  $\beta$  receptora nakon simpatičke nervne stimulacije, odnosno vezivanja endogenih kateholamina. Prema afinitetu za određeni tip



receptora, izvršena je podela ovih lekova na: specifične  $\alpha$  blokatore, blokatore  $\beta$  receptora i mešovite (neselektivne) antagoniste koji blokiraju oba tipa adrenergičkih receptora. Dalje, u grupi  $\beta$  blokatora se na osnovu farmakološkog profila mogu izdvojiti tri podgrupe, generacije lekova. Prvu podgrupu karakteriše podjednak afinitet za  $\beta_1$  i  $\beta_2$  receptor, to su neselektivni  $\beta$  blokatori poput propranolola i timolola. U drugoj podgrupi su kardioslektivni  $\beta$  blokatori sa većom selektivnošću vezuju za  $\beta_1$  receptor kao što je metoprolol koji se sa 75 puta većim afinitetom vezuje za  $\beta_1$  receptor, i bisoprolol, 120 puta selektivniji u vezivanju za  $\beta_1$  receptor u odnosu na  $\beta_2$  receptor (123). Treću podgrupu čine karvedilol i bucindolol koji blokiraju oba podtipa receptora ali imaju i neka plejotropna dejstva po kojima se razlikuju od prve generacije. Karvedilol blokira i  $\alpha_1$  receptore i ima antioksidativna svojstva (124), dok bucindolol ima vazodilatatorno dejstvo i pokazuje intrinzičku simpatomimetsku aktivnost (125).

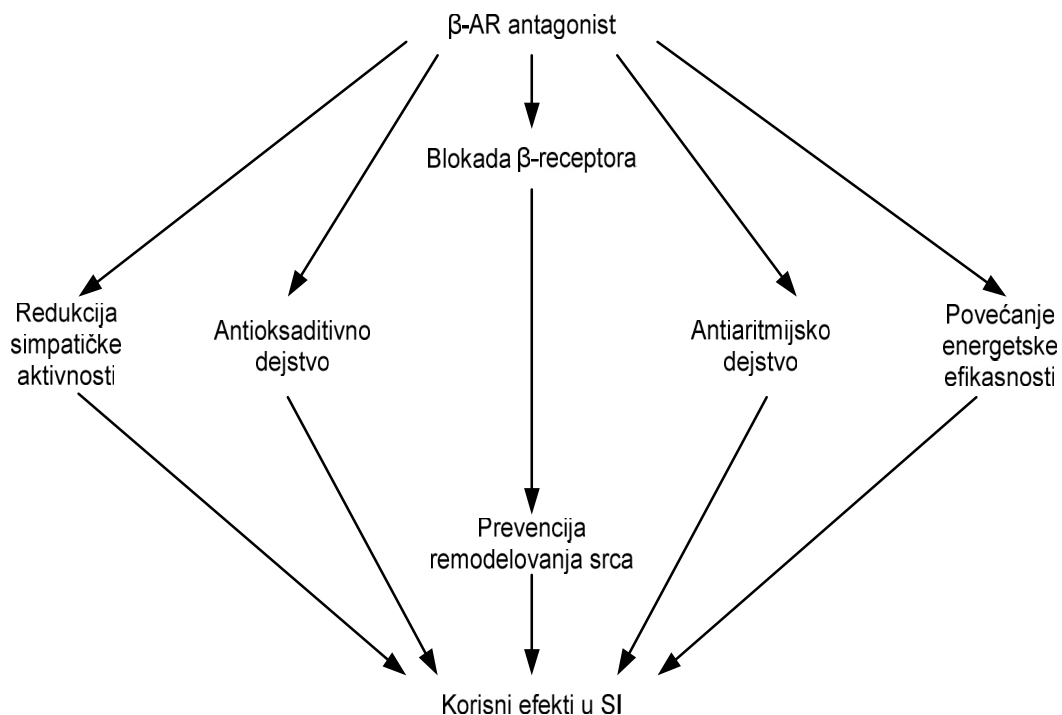
Imajući u vidu da je adrenergička podrška insuficijentnog srca veoma važna (126, 127), primena bilo kog  $\beta$  blokatora kod pacijenta sa SI usloviće miokardnu depresiju koja će se manifestovati u određenom stepenu. U toku akutne primene  $\beta$  blokatora prve generacije, depresija kontraktilne funkcije (126) i povećanje sistemske vaskularne rezistencije (128) uslovljavaju smanjenje minutnog volumena (126) u toj meri da ne iznenađuje intolerancija ovih lekova kod više od 20% pacijenta sa SI (129). Međutim, primena  $\beta$  blokatora druge generacije, metoprolola i bisoprolola je moguća i njihovo uvođenje uspešno kod 70-100% pacijenata (129). Ovi lekovi imaju mnogo povoljniji farmakodinamski profil jer selektivno blokiraju  $\beta_1$  receptor, dok  $\beta_2$  receptor ostaje slobodan za podršku miokardne funkcije, direktno (130) ili posredstvom povećanja presinaptičkog oslobađanja noradrenalina (127, 130). Pored toga, refleksna vazokonstrikcija kod primene selektivnih  $\beta_1$  blokatora je manja u odnosu na neselektivne, jer slobodan  $\beta_2$  receptor može posredovati u vazodilataciji. Na osnovu ovih farmakodinamskih razlika  $\beta$  blokatora druge generacije u odnosu na prvu, može se objasniti manja redukcija minutnog volumena i perfuzije vitalnih organa (131), kao i bolja inicijalna podnošljivost (129). Vrlo važno svojstvo  $\beta$  blokatora treće generacije, karvedilola, bucindolola i nebivolala, je redukcija naknadnog opterećenja srca (131, 132). Kako rezultati nekoliko studija ukazuju bucindolol ne menja minutni volumen (28, 132), dok primenu karvedilola prati blago povećanje (131). Imajući u vidu stereoselektivni metabolizam u jetri S-izomera (133), stereospecifično vezivanje S-izomera za  $\beta$  receptore (134), efekti  $\alpha$  blokade su podjednako značajni (13). Međutim, prilikom intravenske

primene karvedilola efekti  $\beta$  blokade su mnogo izraženiji (135). Izraženo vazodilatatorno dejstvo karvedilola može da uslovi značajne ortostatske simptome pri uvođenju leka i titraciji doze, smanji podnošljivost leka ili inicira smanjenje doze diuretika (136). Međutim, nije poznato da li ova dodatna vazodilatatorna svojstva beta blokatora treće generacije doprinose njihovoj većoj kliničkoj efikasnosti, imajući u vidu da u toku hronične primene karvedilola redukcija sistemske vaskularne rezistencije ne razlikuje se u odnosu na metoprolol ili placebo (137). Imajući u vidu da  $\beta$  blokatori treće generacije blokiraju i  $\beta_2$  receptore, njihova antiadrenergička aktivnost je sveobuhvatnija, ne samo zbog dodatne blokade ovih receptora u srcu već zbog, istim mehanizmom postignute, samnjene kardijalne (karvedilol, bucindolol) (137) i sistemske (bucindolol) (132) adrenergičke aktivnosti. Pozitivna korelacija između stepena antiadrenergičke aktivnosti i efekata  $\beta$  blokade na funkciju LK, kako ukazuju rezultati dve multicentrične placebo kontrolisane studije (138, 139) delom objašnjava superiorne efekte ovih lekova na funkciju LK (137; 139) i mortalitet (140, 143). Osim toga, potvrđena je efikasnost neselektivnih blokatora u prevenciji nagle srčane smrti kod pacijenata sa SI (143) za razliku od selektivnih blokatora (142, 144). Međutim, kako rezultati kasnijih velikih multicentričnih studija to ukazuju, selektivni  $\beta$  blokatori ne zaostaju u prevenciji nagle srčane smrti u odnosu na neselektivne  $\beta$  blokatore (145).

Kao što je u brojnim studijama potvrđeno (31, 146),  $\beta$  blokatori mogu na miokardnu funkciju dvojako da deluju u zavisnosti od dužine primene. Akutna primena  $\beta$  blokatora je praćena depresijom miokardne funkcije kao rezultat supresije inotropne i hronotropne adrenergičke podrške. Međutim, primena  $\beta$  blokatora u dužem vremenskom periodu ( $> 1$  mesec) kod pacijenata sa SI: (1) konzistentno prevenira progresiju miokardne disfunkcije i remodelovanja LK (137, 147, 148); (2) popravlja miokardnu disfunkciju - posredstvom ćelijskih i biohemijskih efekata utiču na intrinzičku sistolnu funkciju (4); i (3) uslovljava regresiju hipertrofije i popravlja ventrikularnu geometriju, odnosno popravlja remodelovanje LK (146). Pored toga, neki  $\beta$  blokatori doprinose obnavljanju, dugotrajnom adrenergičkom stimulacijom narušene, adrenergičke transmisije (29-31; 137). Prema tome,  $\beta$  blokatori doprinose prevenciji nekih neželjenih efekata hronične kardijalne adrenergičke stimulacije.

**Obnavljanje narušene  $\beta$  adrenergičke transmisije.** Dugotrajna primena metoprolola,  $\beta$  blokatora druge generacije, obnavlja narušenu  $\beta$  adrenergičku transmisiju pre svega ushodnom regulacijom  $\beta$  receptora (29-31) i na taj način doprinosi postepenom

poboljšanju miokardne disfunkcije, potvrđene u brojnim kliničkim studijama (145, 148, 149). Osim toga, metoprolol obnavlja povezivanje  $\beta_2$  receptora sa intracelularnom signalnom kaskadom (31). Ova dejstva metoprolola na molekularnom nivou su u osnovi poboljšanja tolerancije fizičkog napora (150, 153) i nisu svojstvena  $\beta$  blokatorima treće generacije (137). Međutim, u studiji u kojoj je testirana hipoteza o obnavljanju ekspresije receptora nije potvrđena razlika u produkciji iRNK kod pacijenata sa povoljnim terapijskim odgovorom u odnosu na druge koje nisu imali poboljšanje ventrikularne geometrije i ejskione frakcije (EF), kao i odnosu na placebo (152). Prema tome, ne može se sa sigurnošću reći da je obnavljanje adrenergičke transmisije presudno za klinički korisne efekte  $\beta$  blokade, posebno imajući u vidu na različita svojstva karvedilola. Naime, iako ne dovodi do ushodne regulacije  $\beta$  receptora (137), kao i da nakon akutne primene uzrokuje, za razliku od metoprolola, smanjenje kardijalnog odgovora na dobutamin (153), karvedilol podjednako usporava progresiju miokardne disfunkcije (139, 143).



Slika br. 9. Mahanizmi farmakoloških efekata  $\beta$  blokatora u SI (preuzeto i adaptirano iz ref.140).

Za **regresiju patološke hipertrofije i redukciju remodelovanja** veoma važan mehanizam su promene u ekspresiji gena u miokardu (154). Patološka ekspresija gena, po tzv. fetalnom obrascu, je svojstvo SI koje doprinosi miokardnoj disfunkciji zbog promena u regulaciji kontraktilnosti kardiomiocita (140, 141). To se pre svega odnosi na povećanu ekspresiju  $\alpha$ , a smanjenu  $\beta$  teškog lanca miozina (eng. myosin heavy chain –MHC) (155).

Nakon primene  $\beta$  blokatora, ekspresija ovih gena se vraća na adultni nivo i promena nivoa iRNK korelira sa kliničkim poboljšanjem kod pacijenta sa SI (156). Pored toga, ekspresija gena za  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-aznu pumpu u membrani sarkoplazmatskog retikuluma (SERCA2a) vraća se na normalni nivo (152). Na proteinskom nivou ove promene u ekspresiji izoformi teškog lanca miozina i SERCA2a popravljaju kontraktilnu funkciju, u potpunosti se odvijaju posredstvom  $\beta_1$  receptora i  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin zavisne protein kinaze II (CaMKII) (59). Efikasnost karvedilola u povećanju ekspresije SERCA2a je veća u odnosu na metoprolol (157). Karvedilol, poput antagonista kalcijuma, blokira voltažno-zavisne kalcijumove kanale L-tipa i smanjuje ulazak  $\text{Ca}^{2+}$  u kardiomiocit (158). Ovo dejstvo karvedilola je jedinstveno među  $\beta$  blokatorima (159) i rezultat je njegovog antioksidativnog delovanja (160). Da je modulacija genske ekspresije važan mehanizam kojim  $\beta$  blokatori smanju apoptozu kardiomiocita potvrđuju rezultati studija u kojima je primena metoprolola dovela do ushodne regulacije Bcl-2 proteina, inhibitora apoptoze (161), odnosno smanjila miokardnu produkciju Bak, proapoptotičkog faktora (162). Apoptoza kardiomiocita je u toku hronične primene  $\beta$  blokatora smanjena i usled redukcije ishemije i direktnog citoprotektivnog dejstva (163). Antiapoptotičko dejstvo karvedilola je rezultat njegove funkcionalne selektivnosti. Naime, kako rezultati studije Wisler-a i sar. ukazuju, ovo jedinstveno svojstvo karvedilola nastaje aktivacijom  $\beta_2$  receptora, G protein nezavisnog, a  $\beta$  arestin-zavisnog ERK signalnog puta (164, 165). Osim toga, sličan signalni put, aktiviran nakon stimulacije  $\beta_1$  receptora, dalje doprinosi jedinstvenoj farmakodinamici i kliničkoj efikasnosti ovog  $\beta$  blokatora (166).

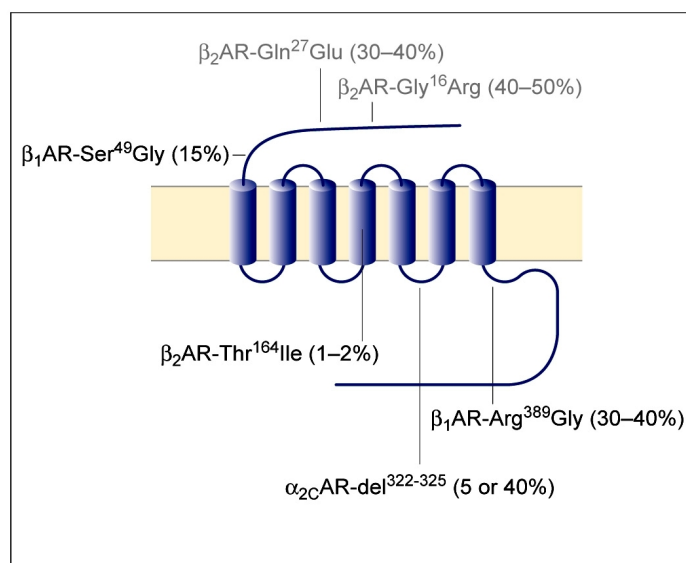
Povoljan terapijski odgovor  $\beta$  blokatora delom nastaje usled metaboličkih promena koje su rezultat negativnog hronotropnog dejstva, ali i inhibicije karnitin acil transferaze, enzima odgovornog za brzinu transporta masnih kiselina u mitohodrije (149).

Imajući u vidu sva ova dešavanja na ćelijskom, biohemijskom i molekularnom nivou (sl. 9), kao i kompetitivnu prirodu  $\beta$  adrenergičkog antagonizma i ekstrakardijalnu lokalizaciju ovih receptora, jasniji je uticaj ovih lekova na prirodni tok srčane slabosti. Naime, ovi lekovi, kao što je potvrđeno u brojnim kliničkim studijama (138, 148), ne samo da preveniraju progresiju miokardne disfunkcije i remodelovanja, već popravljaju disfunkciju i smanjuju remodelovanje (141). Prva saznanja o uticaju hronične primene  $\beta$  blokatora na kontraktilnu funkciju leve komore, dobijena sredinom sedamdesetih godina prošlog veka (167), pokrenula su brojna klinička ispitivanja koja su potvrdila superiornost ove terapije, kada traje duže od mesec dana, u odnosu na placebo (138, 141, 143, 147, 168, 169). Kako rezultati nekih studija

ukazuju, u osnovi farmakološkog efekata je pojačanje kontraktilnosti kardiomiocita (148, 170, 171). U toku hronične primene  $\beta$  blokatora, u proseku nakon 4 do 12 meseci, bolju miokardnu funkciju prati regresija hipertrofije LK (146, 172). Ovim delovanjem  $\beta$  blokatori usporavaju progresivan tok SI i to verovatno postižu ne samo blokadom adrenergičke aktivnosti. Naime, pretpostavlja se da se važni indirektni efekti poput inhibicija RAAS, prevencije sinteze kardiotropina-1, inhibicija oslobađanja endotelina kao i smanjenje tenzije u zidu LK (141). Ovo je efekat cele klase, postižu ga  $\beta$  blokatori i druge i treće generacije. Regresija hipertrofije LK i smanjenje miokardne disfunkcije je jedinstveno svojstvo  $\beta$  blokade. ACE inhibitori smanju remodelovanje LK ali bez izmena u sistolnoj funkciji (4).

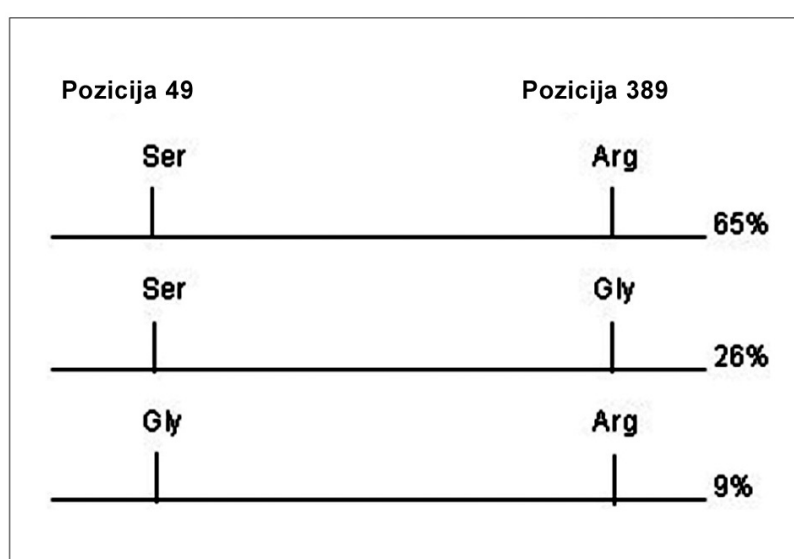
## 2.1.4 Polimorfizam beta receptora

Gen za  $\beta_1$  se nalazi na hromozomu 10q24-q26. Gen je bez introna, sastoji se od 1714 parova baza, i kodira protein od 477 aminokiselinskih rezidua, veličine 51,3 kDa (173). Za  $\beta_1$  je opisano dvanaest polimorfizama od kojih jedanaest rezultira zamenom aminokiseline u receptoru. Dva najznačajnija SNP u humanom kodirajućem regionu  $\beta_1$  receptora su: Ser<sup>49</sup>Gly gde je u položaju 49 serin (Ser) zamenjen glicinom (Gly) (174, 176), kao ređim alelom (minor alele). Na intraćelijskom (IC) kraju receptora koji je važan za vezivanje za G-protein, na poziciji 389 Arg je zamenjen Gly (174). Interesantno je da je Gly<sup>389</sup> iako ređi alel, inicijalno uzet za „divlji tip“ (eng. wild-tip)  $\beta_1$  receptora (173). Ostali polimorfizmi su znatno ređi, njihova zastupljenost se kreće oko 1-2% a funkcionalni značaj je nepoznat (177).



Slika 10. Polimorfizmi adrenergičkih receptora koji su od značaja u kardiovaskularnim bolestima (preuzeto i adaptirano iz ref.173)

Dobro je poznato da se distribucija ovih polimorfizama u zdravoj populaciji kreće od 0.72/0.28 za Arg<sup>389</sup> Gly i 0.85/0.15 za Ser<sup>49</sup>Gly (174,177, 178, 179) i da postoji nešto veće odstupanje u nekim etničkim grupama. Tako na primer, Arg<sup>389</sup> alel je zastupljen kod Afro-Amerikanaca ređe nego u drugim etničkim grupama: 74% kod Kineza, 72% belaca, 67% kod Hispanics i 58% kod Afro-Amrikanaca (178). Za polimorfizam u položaju 49 nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji u različitim etničkim grupama (180). Između kodona 49 i 389  $\beta_1$  receptora postoji vezano nasleđivanje: individue koje su homozigoti za Gly<sup>49</sup> su gotovo uvek homozigoti za Arg<sup>389</sup> i obrnuto, homozigoti za Ser<sup>49</sup> su i homozigoti za Gly<sup>389</sup>. Diplotip Gly<sup>49</sup>Gly/ Gly<sup>389</sup>Gly je izuzetno redak (179, 181).



Slika 11. Frekvencija haplotipova  $\beta_1$  receptora (preuzeto i adaptirano po ref. 179)

Funkcionalni značaj ovih SNP ispitivan je u mnogim rekombinatnim sistemima, u *in vitro* uslovima. Kako rezultati ovih studija pokazuju Arg<sup>389</sup> ima nešto veću bazalnu aktivnost, kao i 3-4 puta veću aktivnost adenil ciklaze u odnosu na Gly<sup>389</sup> (182). Smatra se da je to rezultat nešto redukovanog povezivanja Gly<sup>389</sup> varijante  $\beta_1$  receptora za Gs (184). U skladu sa ovim su i rezultati Joseph-a i sar., koji su utvrdili da postoji statistički značajna razlika u izoprenalinom indukovanoj maksimalnoj produkciji cAMP između ćelija sa Arg<sup>389</sup> i Gly<sup>389</sup> (185). Pored toga, u ćelijama sa Arg<sup>389</sup> alelom  $\beta_1$  receptori pokazuju veću kratkotrajnu desenzitizaciju u odnosu na receptore sa Gly<sup>389</sup> alelom (184).

Na sličan način ispitivan je značaj i polimorfizma na položaju 49 i dobijeni su nekonzistentni rezultati. Naime, Rathz i sar. (186) su utvrdili da nema razlike u afinitetu vezivanja agonista i antagonistu za obe varijante receptora. Pored toga u ovoj studiji nije bilo razlike u bazalnoj i indukovanoj aktivnosti adenil ciklaze. Međutim, druga grupa

autora dobila je potpuno drugačije rezultate: bazalna i agonistom stimulirana aktivnost adenilat ciklaze je veća u ćelijama sa Gly<sup>49</sup> u odnosu na Ser<sup>49</sup> (187). Pored toga, ova varijanta receptora je senzitivnija na inhibitorne efekte inverznog agoniste kao što je metoprolol i podleže intenzivnijoj nishodnoj regulaciji kod dugotrajne stimulacije agonistom u odnosu na receptor sa Ser<sup>49</sup>. Ispitivanje funkcionalnog značaja četiri moguća haplotipova  $\beta_1$  receptora u *in vitro* uslovima potvrdilo je da u ćelijama sa Gly<sup>49</sup> najveća bazalna aktivnost adenil ciklaze, da ukoliko je stimulirana izoprenalinom najveća je kod Gly<sup>49</sup>Arg<sup>389</sup> haplotipa, odnosno Gly<sup>49</sup>Arg<sup>389</sup>>Ser<sup>49</sup>Arg<sup>389</sup>>>Ser<sup>49</sup>Gly<sup>389</sup>, kao i da desenzitizacija najveća kod Gly<sup>49</sup>Arg<sup>389</sup> a najmanja kod Ser<sup>49</sup>Gly<sup>389</sup> haplotipa (188). Na osnovu rezultata ovih *in vitro* studija može se zaključiti da su oba polimorfizma funkcionalno značajna: Arg<sup>389</sup>Gly polimorfizam  $\beta_1$  receptora u delovanju agonista i to da se Gly<sup>389</sup> varijanta može smatrati hipofunkcionalnom, dok je Ser<sup>49</sup>Gly polimorfizam odgovoran za desenzitizaciju receptora sa Gly kao na dejstvo agonista mnogo senzitivnijom varijantom receptora.

Primena transgenetski modifikovanih sojeva eksperimentalnih životinja je drugi važan pristup u ispitivanju funkcionalnog značaja polimorfizama  $\beta_1$  receptora. Perez i sar. su u soju miševa sa prekomernom ekspresijom Arg<sup>389</sup> ili Gly<sup>389</sup>  $\beta_1$  receptora u srcu ustanovili da je kod tri meseca starih životinja bazalni i dobutaminom stimulirani kontraktilni odgovor veći kod sojeva sa Arg<sup>389</sup> u odnosu na Gly<sup>389</sup> (189). Interesantno je da ova varijanta receptora kod šest meseci starih životinja podleže intenzivnijoj desenzitizaciji u odnosu na Gly<sup>389</sup> što se može objasniti povećanom aktivnošću kinaze G-receptora (GRK) (190).

Značaj ova dva polimorfizma ispitivan je u *ex vivo* studijama na preparatu humanog miokarda dobijenom prilikom kardiohirurških intervencija. Molenaar i sar. u nameri da ispituju direktni uticaj Ser<sup>49</sup>Gly i Gly<sup>389</sup>Arg polimorfizma na humani miokard, su određivali kardiostimulirajući efekat noradrenalina, endogenog  $\beta_1$  agoniste, kod pacijenata sa i bez SI. U ovoj studiji nisu nađene razlike u odgovoru na dejstvo agoniste između nosioca različitih alela za  $\beta_1$  receptor (191). Međutim, suprotni rezultati drugih studija o genetski uslovljenoj razlici u odgovoru na noradrenalin i posledično većoj produkciju cAMP, ukazuju na značaj ovih polimorfizama (192, 193).

Imajući u vidu značaj  $\beta_1$  u dinamičkom, naporom izazvanom ubrzanju srčanog rada i pojačanju srčane kontrakcije, nekoliko studija je proučavalo genetski uticaj kod zdravih, mladih homozigota za Arg<sup>389</sup> ili Gly<sup>389</sup>. Ni u jednoj studiji nije potvrđena, na osnovu rezultata *in vitro* studija očekivana, genetski uslovljena razlika u frekvenciji i kontraktilnom

odgovoru ovih receptora kod zdravih nosilaca (178, 194-197). U skladu sa ovim su i rezultati veće finske kardiovaskularne studije (Finnish Cardiovascular study - FINCAVAS) u kojoj naporom izazvano ubrzanje srčanog rada kod 890 osoba se nije razlikovalo između nosilaca Arg<sup>389</sup> ili Gly<sup>389</sup> (198). Slične rezultate su dobili i Leineweber i sar. koji su prethodno primenili atropin sa pretpostavkom da bi mogao da demaskira taj genetski uticaj (199). Međutim, jasna razlika u genskom uticaju na funkciju  $\beta_1$  receptora je uočena u sličnim studijama kod pacijenata sa srčanom insuficijencijom. Naime, Wagoner i sar. su ispitivali značaj polimorfizma  $\beta$  receptora u grupi pacijenata sa SI i ustanovili da je kod homozigota za Arg<sup>389</sup> potrošnja kiseonika i tolerancija fizičke aktivnosti veća u odnosu na homozigote Gly<sup>389</sup> (200). U prilog značaja genskog uticaja ukazuje intermedijalni nalaz potrošnje kiseonika i tolerancije na napor kod heterozigota i njihove opadajuće vrednosti kod haplotipova 389/49: od najveće kod Gly<sup>389</sup> Ser<sup>49</sup> a najmanje kod Arg<sup>389</sup> Gly<sup>49</sup>. U ovoj studiji nije potvrđeno da genotip  $\beta_1$  receptora utiče na maksimalnu frekvenciju srčanog rada i krvni pritisak. Osim toga, značaj genske varijabilnosti na ovom lokusu potvrđen je u studiju Stanton-a i sar. koji su utvrdili da u grupi pacijenata sa bolestima bubrega homozigoti Gly<sup>389</sup>  $\beta_1$  receptora imaju veću masu LK u odnosu na nosioce jednog ili dva Arg<sup>389</sup> alela (200). Ova statistički značajna razlika se održava i kad se isključe pacijenti koji su primali beta blokatore. Primena dobutamina,  $\beta_1$  agoniste, kako rezultati nekih studija ukazuju, prati statistički značajna razlika u inotropnom odgovoru, ubrzanju srčanog rada i aktivnosti renina u plazmi kod homozigota za Arg<sup>389</sup> u odnosu na nosioce jednog ili dva Gly<sup>389</sup> alela za  $\beta_1$  receptor (201, 2002)

Dosadašnja ispitivanja o genski uslovljenim razlikama u funkciji  $\beta_1$  receptora upotpunjena su ispitivanjem uticaja Arg<sup>389</sup>Gly i Ser<sup>49</sup>Gly polimorfizama na srčani rad i krvni pritisak ali sa varijabilnim rezultatima. Naime, Humma i sar. (205) su u grupi od 142 ispitanika ustanovili da kod homozigota Arg<sup>389</sup> za  $\beta$  receptore je brži srčani rad i viši dijastolni krvni pritisak (2003). U skladu sa ovim su rezultati drugih studija (204, 205). Međutim, potpuno suprotne rezultate dobile su dve grupe autora. McCaffery i sar. su u grupi 101 monozigotnih i 44 dizigotnih blizanaca utvrdili da nosioci jednog ili dva Gly<sup>389</sup> alela za  $\beta_1$  receptor imaju viši sistolni i dijastolni pritisak (206) dok su rezultati FINCAVAS studije istakli uticaj Ser<sup>49</sup>Gly polimorfizama (198).

### **2.1.5 Polimorfizam CYP2D6**

Dobro je poznato da su interindividualne razlike u terapijskom odgovoru primenjenih lekova uslovljene farmakokinetikom varijabilnošću koja uglavnom nastaje zbog razlika u aktivnosti citohrom P450 enzima uključenih u metabolizam lekova. Na



osnovu genske varijabilnosti enzima koji učestvuju u metabolizmu leka mogu se izdvojiti četiri glavna fenotipa: fenotip sporog metabolizera (PM-poor metabolizers), ekstenzivnog metabolizera (EM- extensive metabolizers), intermedijalnog metabolizera (IM-intermediate metabolizers) i ultrabrzog metabolizera (UM – ultrarapid metabolizers). PM fenotip određuje prisustvo nefunkcionalnog gena (207, 208). Kod sporih metabolizera je smanjen metabolizam leka usled smanjene količine ili aktivnosti enzima. Ponekad enzim može u potpunosti da nedostaje. Kao rezultat primene aktivnog leka u ovom slučaju mogu se javiti ozbiljna neželjena dejstva leka, dok je primena neaktivnog leka praćena smanjenom terapijskom efikasnošću. Ovaj metabolički fenotip je prisutan u 5-10% pripadnika bele rase. Ekstenzivni metabolizeri predstavljaju najčešći fenotip. Neki autori definišu ekstenzivne metabolizere kao nosioce dve kopije funkcionalnih gena (209), dok su drugi mišljenja da EM takođe uključuju i osobe koje su heterozigoti sa najmanje jednim funkcionalnim alelom (207, 208). Na drugoj strani, kod nosioca više od dve kopije aktivnog gena, metabolizam leka je intezivan i označavaju se kao ultrabrzi metabolizeri. Za ovaj fenotip je karakteristično da primena aktivnog leka u običajnoj dozi rezultira terapijskim neuspelom jer se postižu veoma niske koncentracije leka u plazmi. Na drugoj strani, mogu se javiti i zbiljna neželjena dejstva ako primenjeni lek ima aktivne metabolite. Kod UM koncentracija aktivnih metabolita može da bude 10-30 puta veća od očekivane (210). Prema tome, ultrabrzi metabolizam je odgovoran za nefikasnost antidepresiva i sniženih koncentracija nekih lekova koji su supstrati CYP2D6 poput tramadola, antiemetika, venlafaksina, morfina i metoprolola (211). Četvrtom, fenotipu intermedijalnih metabolizera, pripadaju heterozigoti za nefunkcionalni/hipofunkcionalni alel, kao i homozigoti za hipofunkcionalni alel (207). Međutim, po mišljenju drugih autora IM se definišu kao nosioci samo jednog hipofunkcionalnog alela (208).

CYP2D6 je najznačajniji polimorfni oblik enzima citohrom p450 oksidaze koji učestvuje u metabolizmu 25% lekova koji su u prometu (212). Ovaj polimorfizam značajno utiče na metabolisanje 50% ovih lekova (210). Jedini je enzim iz porodice CYP enzima koji ne podleže indukciji, te genska varijabilnost najvećim delom utiče na individualnu varijabilnost enzimske aktivnosti. Prema tome, polimorfizam ovog enzima je veoma značajan za metabolizam i terapijsku efikasnost lekova kao što su antidepresivi, neuroleptici, antiaritmici, analgetici, antiemetici i neki citostatici. Upravo ovi lekovi mogu značajno da umanje njegovu aktivnost kod istovremene primene. Hinidin je najsnažniji inhibitor i redukuje aktivnost ovog enzima na nivo sporog metabolizera (214). Slično hinidinu deluju i hlorfeniramin, hlorpromazin, klomipramin, fluoksetin, paroksetin i

sertralin. Pored važne uloge u metabolizmu lekova, značaj CYP2D6 je potvrđen i u eliminaciji kancerogena poput nitrozamina. Imajući u vidu da se ovi ksenobiotici nalaze u dimu cigareta mnoge studije su testirale hipotezu o povećanom riziku PM za pojavu karcinoma pluća. Međutim, rezultati većine studija nisu potvrdili vezu između PM fenotipa i pojave ovog karcinoma (215).

Ovaj enzim je konstitutivno eksprimiran, osim u jetri, u tankom crevu i mozgu. Iako ima podjednaku aktivnost kao u jetri, intestinalna forma *CYP2D6* ima neznatan uticaj na presistemske eliminacije oralno primenjenih supstrata za *CYP2D6* (216). Posebno je interesantna ekspresija ovog enzima u mozgu zbog mogućeg metabolizma nekih lekova, endogenih supstanci ali i neurotoksina MPNP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin). Imunohistohemijska ispitivanja su potvrdila široku distribuciju *CYP2D6* u različitim regionima mozga i nervnim ćelijama, uključujući i pigmentne neurone supstancie nigrae (217). Endogeni supstrat, kako neka istraživanja ukazuju, je 5-metoksitriptamin, prekursor i metabolit melatonina, koji se aktivnošću *CYP2D6* konvertuje u serotonin (218). Da bi se razjasnio značaj ove ekstrahepatične ekspresije *CYP2D6* potrebna su nova istraživanja koja će eventualnu potvrditi i njegov značaj u razvoju neuroloških i psihijatrijskih bolesti.

Gen za *CYP2D6* nalazi se na 22 hromozomu, unutar lokusa u kojem su i dva pseudogena *CYP2D6*, *CYP2D7* i *CYP2D8* (219). Kao i drugi članovi *CYP2* porodice, *CYP2D* geni se sastoje od 9 eksona i 8 introna. Produkt *CYP2D6* gena je polipeptid sastavljen od 497 aminokiselina.

Do sada je opisano preko 100 različitih funkcionalnih genskih varijanti *CYP2D6* ([www.cypalleles.ki.se](http://www.cypalleles.ki.se)) i sve se mogu svrstati u alele koji uzrokuju poništenu, smanjenu, normalnu i ultrabrzenu enzimsku aktivnost. Produkt nefunkcionalnih alela (eng. null alleles) je protein sa nemejljivom enzimskom aktivnošću. Gubitak enzimске aktivnosti nastaje usled:

- mutacije baznog para ili male insercije/delecije koje prekidaju nukleotidni niz ili inreferiraju sa normalnom obradom iRNK što rezultira sigurnim ranim završetkom translacije: *2D6\*3, \*4, \*6, \*8, \*11, \*15, \*19, \*20, \*38, \*40, \*42, \*44*)
- sinteze polipeptidnog lanca neizmenjene dužine ali bez enzimске aktivnosti: *2D6\*7, \*12, \*14, \*18*
- veće hromozomske delecije: delecija celog *CYP2D6* gena (*2D6\*5* ili nastanak hibridnih *CYP2D6/2D7* gena (*2D6\*13* i *2D6\*16*))

Najznačajniji nefunkcionalni (eng. null alleles) su *CYP2D6\*4* i *CYP2D6\*5*. *CYP2D6 \*4* je otkriven kao primarni genski defekt na *CYP2D6* lokusu (220) sa zastupljenošću oko 20-25% u opštoj populaciji (221). Radi se o G1846A tranziciji koja

uslovljava sintezu nefunkcionalnog proteina. 70-90% sporih metabolizera bele rase su homozigoti *CYP2D6* \*4 alela.

Kod 4-6% pripadnika bele rase prisutna je kompletna delecija jednog kodona unutar kodirajućeg regiona sa potpunim gubitkom *CYP2D6* aktivnosti. Pošto zastupljenost ovog alela, označenog kao *CYP2D6*\*5, ne pokazuje izraženu etničku varijabilnost, sugerise se da potiče iz davne prošlosti. Nešto veću učestalost od ostalih nefunkcionalnih alela imaju 2549- A delecija (*CYP2D6*\*3) i 1707T (*CYP2D6*\*6).

Fenotip sporog metabolizera, određen prisustvom nefunkcionalnih alela, ima oko 5% stanovništva u Evropi i 1% u Aziji. U Evropi se 95% fenotipa PM može definisati određivanjem *CYP2D6*\*3, *CYP2D6*\*4, *CYP2D6*\*5 i *CYP2D6*\*6 (221). Preostalih 5% PM su homozigoti ili heterozigoti za druge retke alele.

Najčešći aleli sa smanjenom aktivnošću kodirajućeg proteina su *CYP2D6*\*10, *CYP2D6*\*17 i *CYP2D6*\*41.

*CYP2D6* \*10 alel kodira enzim redukovane aktivnosti i smanjene stabilnosti koja nastaje usled supstitucije aminokiseline prolina serinom na N- terminalnom kraju (222). Ova varijanta je retka u beloj populaciji ali značajno prisutna kod Azijata (223). Interesanto je da je samo alelu *CYP2D6*\*17 svojstvena smanjena aktivnost koja je supstrat specifična (224, 225). Značajna varijabilnost njegove aktivnosti se beleži u odnosu na supstrate kao što su dekstrometorfan, risperidon, kodein i haloperidol. Kod pripadnika crne rase zastupljenost *CYP2D6*\*17 alela je veća od 30%.

*CYP2D6*\*2 alel kodira protein koji ima dve različite aminokiseline u odnosu na divlji tip, *CYP2D6*\*1. Ova zamena vodi smanjenoj enzimskoj aktivnosti. Međutim, neka nova saznanja o kontroli genske ekspresije *CYP2D6* mogu da objasne pojavu različitog fenotipa kod nosioca istog alela. Naime, Raimundo-a i sar. su utvrdili da u regionu promotera *CYP2D6*, postoje šest polimorfizma, od kojih je za jedan (-1584 C>G) potvrđeno da je povezan sa funkcionalnim polimorfizmom \*2 alela (226). Prisustvo guanina na položaju -1584 kod nosioca *CYP2D6*\*2 određuje EM fenotip. Ukoliko je umesto guanina citozin na položaju -1584, determinisan je IM fenotip. Alel \*2(-1584C) je preimenovan u \*41. Utvrđeno je da u odsustvu ovih dodatnih alela, enzim koji kodira *CYP2D6*\*2 alel je smanjene aktivnosti i udružen je sa intermedijalnim metaboličkim fenotipom (227).

Vrlo važna karakteristika gena za *CYP2D6* je da se može javljati u većem broju kopija. Ova pojava je svojstvena funkcionalnim, delimično funkcionalnim i nefunkcionalnim genima. Kako rezultati Gaedigk-a i sar, ukazuju u većem broju kopija se

moгу javiti \*1×N, \*2×N, \*4×N, \*6×N, \*10×N, \*17×N, \*17× N, \*29×N, \*35×N, \*43×N, i \*45×N (228). Umnožavanje kopija funkcionalnih gena rezultira ultrabrzom enzimskom aktivnošću. Duplikacija gena se registruje u Evropi kod 5-10%, znatno ređe nego u Africi ili Aziji. Na osnovu činjenice da su neki biljni alkaloidi supstrati za CYP2D6, ranije se pretpostavljalo da je veća zastupljenost duplikacije gena u nekim populacijama Istočne Afrike u čijoj ishrani su zastupljene i biljke sa otrovnim alkaloidima, rezultat prirodne selekcije. Duplikacija gena je jedina mogućnost jer efikasniji mehanizam, mehanizam indukcije, nije svojstven ovom enzimu (229). Nosioци jedne do dve dodatne kopije CYP2D6\*1 ili CYP2D6\*2 u Evropi čine 1-5% opšte populacije.

Metabolizam lipofilnih beta blokatora se najvećim delom odvija u jetri posredstvom citohrom P-450 enzima, posebno CYP2D6. Kada su dobijeni metaboliti funkcionalno neaktivni, metabolički kapacitet *CYP2D6* u velikoj meri utiče na nivo leka u plazmi. Činjenica da se poluvreme eliminacije metoprolola kod sporih i ekstenzivnih metabolizera značajno razlikuje (7.5 vs. 2.8h), potvrđuje uticaj polimorfizma *CYP2D6* na farmakokinetiku metoprolola. Shodno tome, moguće posledice izmenjenog metaboličkog klirensa uključuju promenjenu efikasnost leka (usled nižih koncentracija kod UM i povišenih nivoa kod PM) ili povećanu toksičnost (zbog visoke koncentracije leka kod sporih metabolizera). Značaj genotipa *CYP2D6* u kliničkoj primeni metoprolola potvrđena je rezultatima nekoliko studija (230; 231). Kod pacijenata koji su nosioци nefunkcionalnih alela *CYP2D6* alela, metoprolol ima jači negativni inotropni efekat. Na osnovu činjenice da je veoma mala zastupljenost sporih metabolizera u opštoj populaciji, mogu se objasniti negativni rezultati manjih studija. U poređenju terapijskog odgovora metoprolola kod pacijenata koji su ekstenzivni metabolizeri (70%) sa grupom koju čine spori i intermedijalni metabolizeri, nije potvrđena statistička značajnost (232). Prema tome, iako je nedvosmisleno potvrđen uticaj *CYP2D6* genotipa na metabolički status i nivo leka u plazmi, terapijski odgovor je izmenjen samo kod PM koji čine mali deo populacije. Ukoliko se uzme u obzir da su u toku titracije metoprolola usporenje pulsa i pad krvnog pritiska pogodni za evaluaciju njegove efikasnosti, može se pretpostaviti da genotipizacija nije neophodna za optimalno doziranje ovog leka. Dalje, još jedna potencijalna primena genotipizacije *CYP2D6* je identifikacija sporih metabolizera kao populacije pacijenata kod kojih se u toku primene standardnih doza metoprolola mogu javiti neželjena dejstva. U prilog ovoj hipotezi govore rezultati retrospektivne studije u kojoj je utvrđeno da u grupi pacijenata sa neželjenim dejstvima bilo 38% sporih metabolizera (229). Međutim, u istraživanjima koja su usledila nije potvrđena veza između *CYP2D6* genotipa/fenotipa sa

neželjenim dejstvima metoprolola, uprkos činjenici da je postojala jaka korelacija sa nivoom leka u plazmi (234-236). Međutim, u tumačenju ovih rezultata treba uzeti u obzir da je zastupljenost sporih metabolizera u ispitivanoj grupi mala, kao i da su slična ispitivanja o uticaju genske varijabilnosti *CYP2D6* na pojavu neželjenih dejstava nekih drugih lekova imala pozitivne rezultate (237, 238).

Karvedilol je visoko lipofilan beta blokator koji nakon oralne primene podleže intenzivnoj presistenskoj eliminaciji. Stereoselektivni metabolizam u jetri odgovoran je za razliku u koncentraciji u plazmi njegovih enantiomera: R-enantimer postiže dva puta veću koncentraciju (239). Za intenzivan metabolizam karvedilola u jetri značajni su procesi oksidacije i konjugacije (240). U reakciji oksidacije aromatičnog prstena S- i R-karvedilola posreduje *CYP2D6*, uz mali doprinos *CYP1A2*, *CYP2C9*, *CYP2C19* i *CYP3A4* (240). Imajući u vidu da se najvećim delom proces oksidacije odvija posredstvom visoko polimorfnog *CYP2D6*, može se pretpostaviti da je, gore pomenuta razlika u koncentraciji enantiomera genetski determinisana (241). Međutim, činjenica da je jedan metabolit, 4'-hidroksifenil karvedilol, ima veću aktivnost od primarnog leka umanjuje značaj genske varijabilnosti gena za *CYP2D6* u nastanku interindividualnih razlika u terapijskom odgovoru (242).

Prema tome, na osnovu ovih saznanja može se zaključiti da najveći nasledni uticaj na farmakoterapiju ima upravo polimorfizam gena za *CYP2D6*. Pretpostavlja se da će značaj ove varijabilnosti u budućnosti biti manji jer se toku razvoja novih lekova vodi računa da se izbegne uticaj genski izmenjenog metabolizma na njihovu farmakokinetiku.

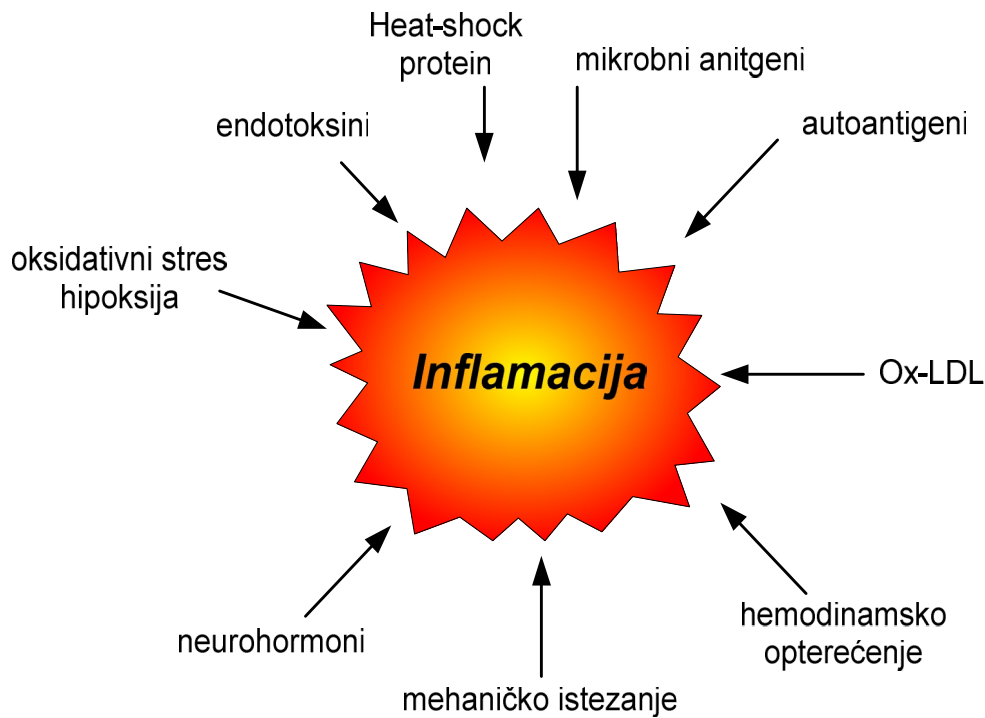
## **2.2 Kardioinflamatorni model srčane insuficijencije**

Srčana insuficijencija predstavlja patofiziološki kompleksnu terminalnu manifestaciju različitih bolesti poput ishemijske bolesti srca (IBS), valvularnih mana, idiopatske kardiomiopatije i dr., koja se danas ne posmatra kao jednostavan model popuštanja srca kao pumpe, već kao multisistemski poremećaj. Poznato je da pored kardiovaskularnog sistema, kako ističe hemodinamska hipoteza, razvijana 1960-tih i 1970-tih godina, uključeni i mišićno-skeletni, renalni, neuroendokrini i imuni sistem. Rezultati jedne studije u kojoj je utvrđen povišen nivo faktora nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ ) u krvi pacijenata sa srčanom insuficijencijom (243) inicirali su veliki broj ispitivanja tako da je, može se reći, nastao novi, kardioinflamatorni model srčane insuficijencije. Značaj inflamacije i imune aktivacije nije umanjen objavljivanjem negativnih rezultata dve velike multicentrične studije o efikasnosti anti TNF- $\alpha$  terapije kod pacijenata sa srčanom slabošću

(244, 245). Nesporno je da imuna aktivacija u srčanoj slabosti nije slučajni fenomen, jer citokini izvesno imaju specifičnu ulogu u patogenezi, razvoju i progresiji SI. Mehanizam imune aktivacije nije u potpunosti poznat. Pored toga i dalje je nepoznato kako aktivirani imuni odgovor posle inicijalnog oštećenja doprinosi progresivnom toku SI. Uprkos različitoj etiologiji klinička slika, kao i histološke i imunološke karakteristike su slični kod svih pacijenata. Aktivacija imunog sistema koja prati oštećenje miokarda uključuje aktivaciju različitih tipova ćelija (monociti/makrofage, T, B, NK ćelije, mastociti, endotelne ćelije, trombociti) i bioaktivnih supstancija kao što su TNF- $\alpha$ , interleukini, sistem komplementa, hemotaktički faktori, adhezioni molekuli i faktori rasta. Mnoga tkiva poput masnog tkiva, jetre i miokarda su važan izvor aktiviranih inflamatornih medijatora (246). Povišen nivo brojnih proinflamatornih medijatora u cirkulaciji nije samo marker imune aktivacije, već doprinosi progresiji srčane slabosti i to depresijom miokardne kontraktilnosti, promocijom ventrikularnog remodelovanja ali i funkcionalnim ekstrakardijalnim promenama kao što su umor i dispnea, anemija, kaheksija, ateroskeloza, bubrežna disfunkcija i depresija. Na drugoj strani brojne patofiziološke karakteristike srčane insuficijencije kao što su redukcija minutnog volumena, povećana periferna vaskularna rezistencija, disfunkcija endotela, mitohondrija, hipoksija tkiva, oksidativni stres i endoksemija, doprinose daljoj imunoj aktivaciji i progresiji srčane slabosti (242). Imajući u vidu da inflamacija predstavlja nasledni mehanizam samoodržanja a ne samodestrukcije, veoma je važno pronaći precizan mehanizam njene modulacije. Prema tome, efikasnija i bezbednija imuna modulacija je moguća ukoliko se dopune saznanja o tome 1) šta uzrokuje inflamaciju i aktivira imuni sistem kod pacijenata sa srčanom insuficijencijom, i 2) koji su patofiziološki i potencijalni protektivni efekti citokina.

### **2.2.1 Mehanizmi aktivacije imunog sistema u srčanoj insuficijenciji**

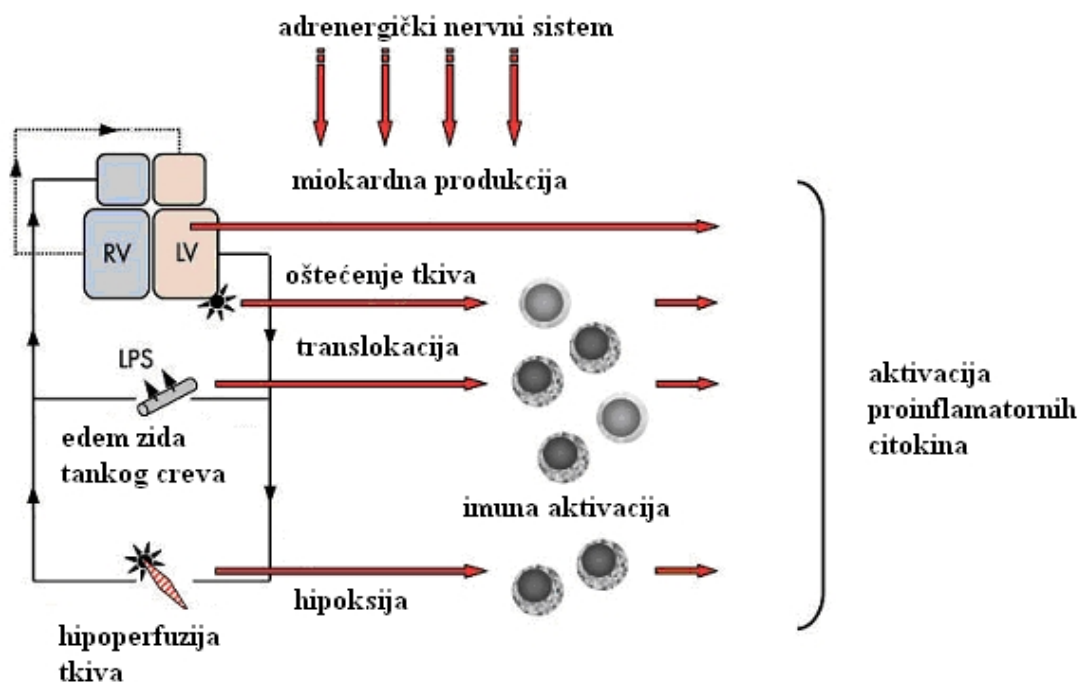
Vrlo važan korak u razumevanju značaja inflamacije u SI prestavlja mehanizam njegove aktivacije. Veoma je teško razviti jedinstveni teorijski model imune aktivacije koji će pokriti sve aspekte srčane slabosti. Postoji nekoliko hipoteza o aktivaciji imunog sistema u srčanoj slabosti (Slika 12).



Slika 12. Indukcija inflamacije kod pacijenata sa hroničnom srčanom insuficijom  
(preuzeto i adaptirano iz ref.256)

### 2.2.1.1 Hemodinamske promene i oksidativni stres

Jedan od puteva stimulacije sinteze citokina u miokardu, kako sugerišu rezultati nekih studija, pokrenut je hemodinamskim opterećenjem. Naime, jednostavno pasivno istežanje miokarda može pokrenuti biosintezu iRNK za TNF  $\alpha$  (243, 244) ali i drugih proinflamatornih citokina poput interleukina 1 (IL-1) i peptida hemotakse monocita (eng. monocyte chemoattractant peptide (MCP)-1) (246). Osim u kardiomiocitima ovi citokini mogu biti sintetisani i u endotelu i leukocitima, verovatno kao rezultat nagomilavanja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) sa aktivacijom NF- $\kappa$ B (247). Oksidisana forma lipoproteina male gustine (eng. oxidized low density lipoprotein cholesterol) povećava ekspresiju citokina u endotelu i monocitima i to može biti od značaja za razvoj SI u ishemijskoj bolesti srca (248). Od subcelularnih promena za razvoj i progresiju SI, najvažniji je povećan oksidativni stres, kao i da disbalans između pro i antioxiđanasa podstiče inflamaciju sistemski kao i u miokardu (251).



Slika 13. Nekoliko hipoteza o aktivaciji imunog odgovora u srčanoj insuficijenciji. (preuzeto i adaptirano iz ref.250)

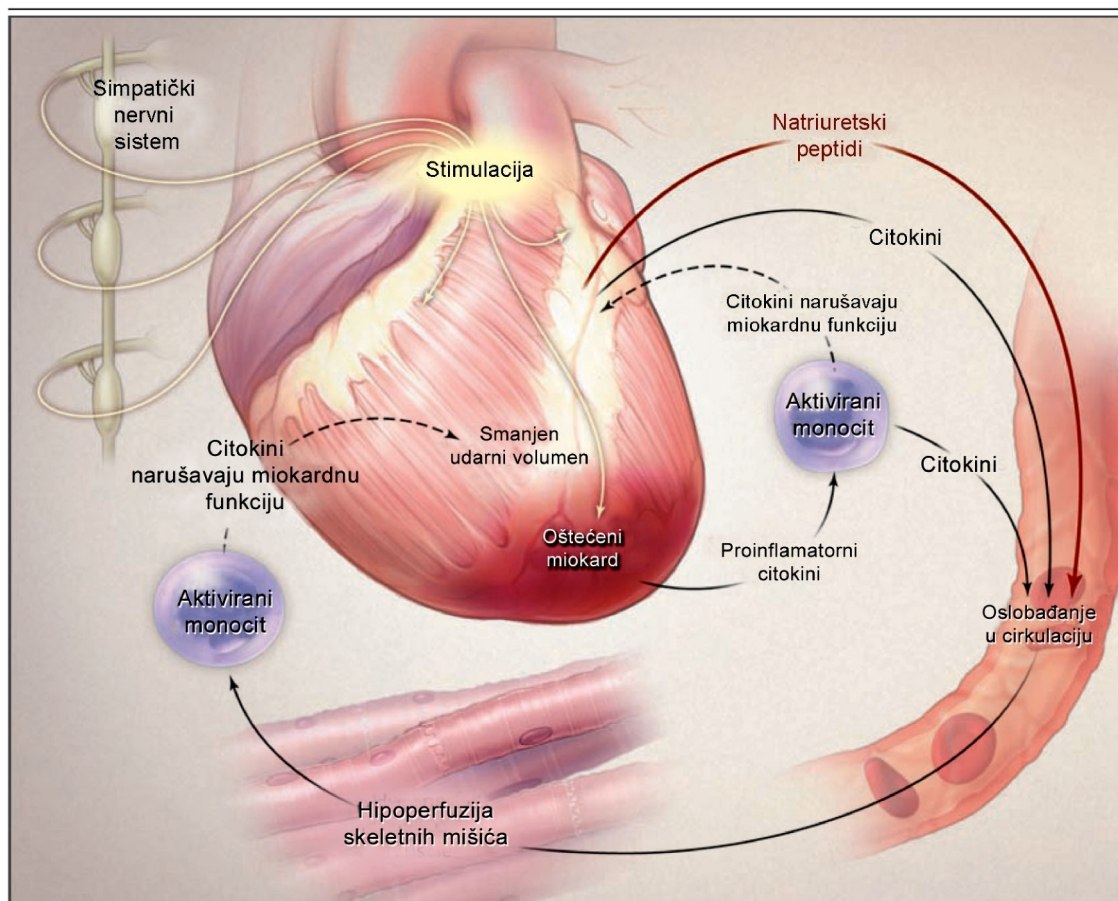
### 2.2.1.2 Direktna antigena aktivacija

Aktivacija imunog sistema može nastati direktnom antigenom stimulacijom kao u slučaju akutnog virusnog miokarditisa. Prodor kardiotropnog virusa u kardiomiocit pokreće imunološke mehanizme koji podrazumevaju aktivaciju mononukleara, B i T limfocita. U ovim ćelijama stvaraju se inflamatorni citokini i toksični radikali kiseonika, koji mogu uticati na funkciju miokarda. Pored toga aktivirane B ćelije stvaraju antitela usmerena protiv različitih peptida koja mogu imati patofiziološki značaj. Identičan histopatološki nalaz postoji kod reakcije akutnog odbacivanja nakon transplantacije srca i virusnog miokarditisa. Ukoliko se zaustavi proces inflamacije, miokardna disfunkcija je u potpunosti reverzibilna (250, 251, 254).

Autoimuni proces i infektivni agensi su značajan patogenetski faktor u jednoj podgrupi idiopatske dilatantne kardiomiopatije i mogu se povezati sa perzistentnom inflamacijom. Kod ovih pacijenata se nalaze različita autoantitela protiv kardijalnih proteina, kao što su miozin,  $\beta_1$  receptor i muskarinski receptor (256, 257). Antitela usmerena protiv  $\beta_1$  receptora mogu se naći i kod 18% pacijenata sa ishemijskom kardiomiopatijom (258).

Ukoliko se nastala autoantitela uklone može doći do poboljšanja kliničke slike kao što je potvrđeno u studiji Milera i sar. (259).





Slika 14. Citokina hipoteza srčane insuficijencije (Preuzeto i adaptirano iz ref. 251)

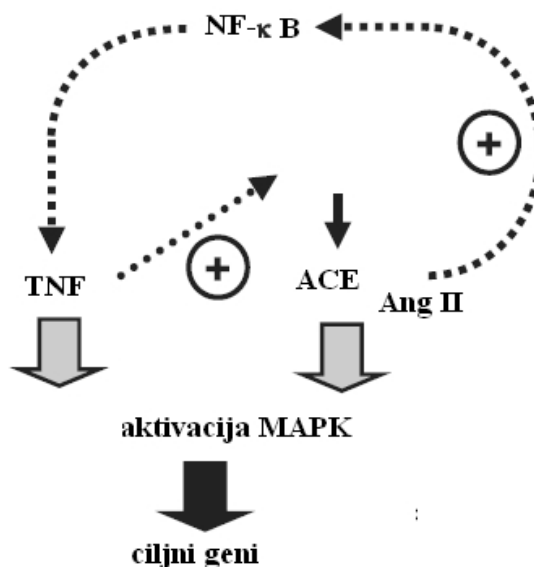
### 2.2.1.3 Sekundarna aktivacija nakon oštećenja miokarda

Moguća aktivacija imunog sistema može nastati sekundarno, nakon primarnog, najčešće ishemijskog oštećenja kardiomiocita, kada dolazi do pojave novih antigena kao što su  $\beta_1$  adrenoreceptori (Slika 15).

Nedavna istraživanja Satoh-a i sar. (260) istakla su značaj Toll-like receptora (TLR) u razvoju srčane slabosti kod pacijenata sa akutnim infarktom miokarda (AIM). Naime, ova grupa autora je ispitivala ekspresiju TLR4 u monocitima kao mogućem izvoru proinflammatoryh citokina u AIM i utvrdila da postoji intenzivnija ekspresija ovih receptora kod pacijenata sa AIM kod kojih se razvila SI u odnosu na pacijente sa AIM bez SI (260). Visoka ekspresija TLR4 u endotelnim ćelijama nakon stimulacije endotoksinom ukazuje na mogući značaj ovih receptora u endotel-zavisnoj inflamaciji u srčanoj slabosti (261). Ove receptore, pored endotoksina, aktiviraju i heat shock proteini i reaktivne kiseoničke vrste (ROS) (262) i to može da bude od značaja za hroničnu inflamaciju u SI.

#### 2.2.1.4 Neurohormonalna aktivacija

Rezultati nekih ispitivanja su potvrdili da neurohormonalna aktivacija, kao što je aktivacija RAAS i adrenergičkog sistema doprinosi perzistentnoj inflamaciji u SI (261, 263). Na mogući uticaj angiotenzina na inflamaciju ukazali su najpre rezultati studija u kojima je angiotenzin II povezan sa stimulacijom rasta kardiomiocita i fibroblasta (264). Angiotenzin II svoj uticaj na ekspresiju gena ostvaruje posredstvom aktivacije transkripcionog faktora NF- $\kappa$ B (265) koji ima presudan uticaj na pokretanje miokardnog inflamatornog odgovora i to povećanjem ekspresije proinflamatornih citokina, NO, hemokina i adhezionih molekula (266, 267). (slika 15). Kalra i sar. su utvrdili da angiotenzin II indukuje biosintezu TNF- $\alpha$  protein kinaza C zavisnim mehanizmom (268). Pored toga, proinflamatorni citokini mogu da dovedu do ushodne regulacije različitih komponenti RAAS u miokardu. Tako na primer, TNF- $\alpha$  povećava gustinu tip 1 AT receptora (AT1) na fibroblastima u miokardu kao i da povećá senzitivnost ovih ćelija na profibrotičko dejstvo endogenog angiotenzina II, što je suprotno od direktnog dejstva TNF- $\alpha$  na fibroblaste (269). Uzajamni uticaj RAAS i proinflamatornih citokina je moguć jer koriste zajednički signalni put - mitogen activated protein kinase (MAPK) i to, kako rezultati nekih studija sugerišu, preko tri člana MAPK porodice: ER kinaze (extracellularly responsive kinases - ERKs) (271, 272), c-Jun N-terminalne kinaze (JNKs) (273, 274) i p38 kinaze (271, 273). Angiotenzin II i TNF- $\alpha$  stimulišu hipertrofiju kardiomiocita nakupljanjem slobodnih kiseoničnih radikala (275) posredstvom p38 kinaznog puta.



Slika 15. Unakrsna regulacija RAAS i inflamatornih medijatora (preuzeto i adaptirano iz ref.270)

Kako rezultati kliničkih i eksperimentalnih studija sugeriraju TNF- $\alpha$  i NO su od značaja za efekte angiotenzina II i noradrenalina kao što su miokardna depresija i desenzitizacija  $\beta$  receptora koji se osim u srčanoj insuficijenciji javljaju i u sepsi i miokardnoj ishemiji (270, 276). Povećana aktivnost RAAS i hronična inflamacija perzistiraju istovremeno (277, 278), iako povišen nivo proinflamatornih citokina se javlja u ranijoj fazi od neurohumoralne aktivacije što ih čini mnogo senzitivnijim markerom miokardne disfunkcije (279). Potvrđeno je da postoji korelacija između visokog nivoa TNF- $\alpha$  i noradrenalina u serumu pacijenata sa blagom i umerenom (278), kao i teškom SI (281).

Na mogućnost interakcije između RAAS i  $\beta$  adrenergičkog sistema sa jedne i hronične sistemske inflamacije u srčanoj insuficijenciji sa druge strane, ukazuje prisustvo  $\beta$  receptora na membrani limfocita i monocita, kao i da njihova aktivacija utiče na produkciju citokina, verovatno preko nakupljanja cAMP (281). Na osnovu ovih rezultata može se pretpostaviti da se neki od maladaptivnih efekata neurohormona postižu aktivacijom imunog sistema.

Interesantnu hipotezu su postavili Jankovska i sar. o povezanosti smanjenog tonusa parasimpatikusa i hronične inflamacije u srčanoj insuficijenciji (282). Ovi autori su pretpostavili da smanjena aktivnost parasimpatikusa čiji su brojni antiinflamatorni efekti potvrđeni (283), može doprineti imunoj aktivaciji i inflamaciji u SI (282).

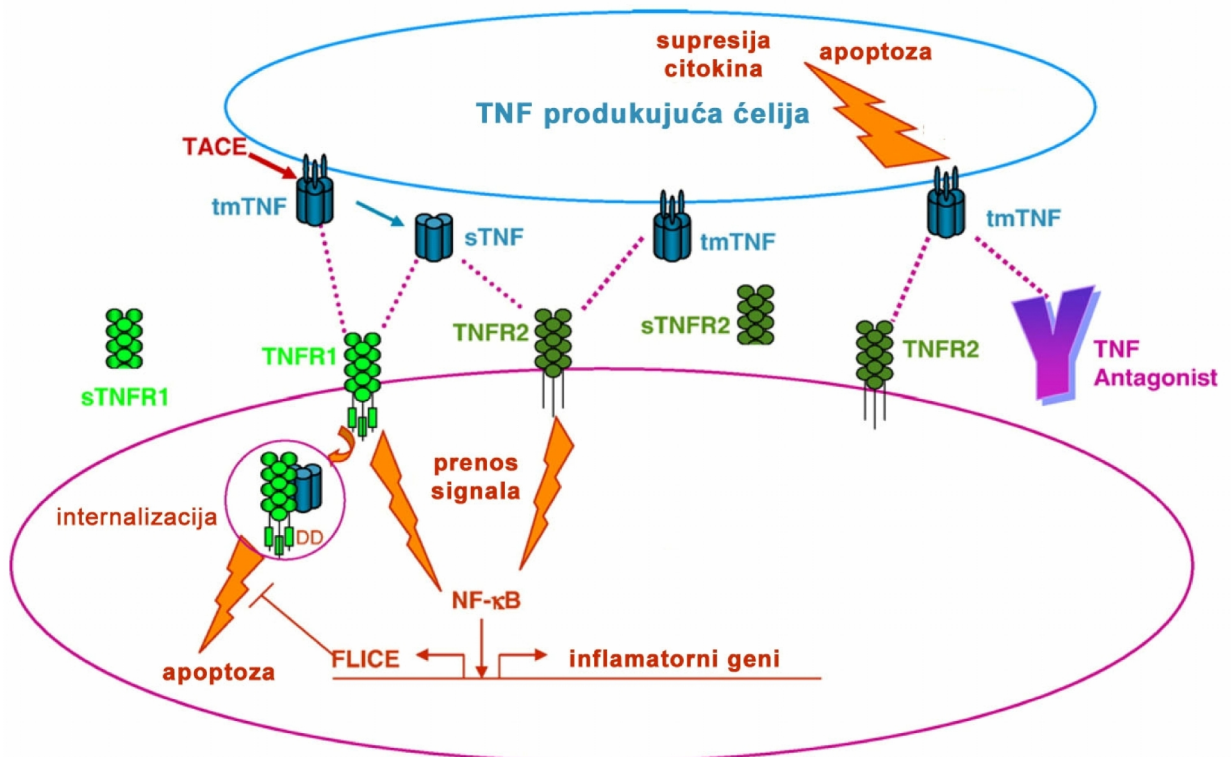
#### **2.2.1.5 Endotoksin hipoteza**

Po sledećoj hipotezi, jednostavno nazvanoj „endotoksin-citokini“ hipotezi bakterijskim endotoksinom indukovana sinteza citokina, nastaje posle prodora endotoksina iz digestivnog trakta u cirkulaciju i stimulacije produkcije TNF- $\alpha$  u monocitima (284). Prvi rezultati koji su ukazivali na značaj endotoksina u aktivaciji imunog sistema u srčanoj insuficijenciji objavljeni su 1997. god. Anker i sar. su utvrdili visok nivo solubilne forme CD14 receptora (sCD14) za koji se vezuje endotoksin, posebno kod pacijenata sa izraženom kaheksijom (285). U ovoj studiji nađena je posebno snažna korelacija između visokog nivo sCD14 i TNF- $\alpha$ , sTNF-R1 i sTNF-R2 (285). Prodor endotoksina i stimulacija sinteze citokina je posebno visok u fazi dekompenzacije i pojave izrazitih edema (286), u kojoj ishemija povećava intestinalnu permeabilnost (288). Međutim, diuretska terapija, u proseku nakon 40 dana, doprinosi normalizaciji koncentracije endotoksina sa tendencijom pada i novoa TNF- $\alpha$  (286). Interesantni su rezultati pilot studije Konrada i sar. (289) koji

su istakli značaj selektivne intestinalne dekontaminacije primenom neresorptivnih antibiotika, polimiksina B i tobramicina, u toku osam nedelja u eliminaciji intestinalnih Gram negativnih bakterija i redukciji nivoa endotoksina u krvi i fecesu, kao i nivoa TNF- $\alpha$ , IL-1 i IL-6 i redukcije periferne endotelne disfunkcije kod pacijenata sa srčanom insuficijencijom. Kako rezultati nekoliko studija ukazuju monociti mogu biti značajan izvor TNF- $\alpha$  (289-292), što uz potvrđenu njihovu interakciju sa miokardom (293, 294) ukazuje na njihov značaj u patogenizi srčane insuficijencije.

### **2.2.2 Faktor nekroze tumora**

Mnogi aspekti fenotipa srčane insuficijencije se mogu objasniti biološkim efektima proinflamatornih citokina, kao što je TNF- $\alpha$  kada su prisutni u dovoljno visokoj koncentraciji kao što je u srčanoj insuficijenciji. Najbolje proučen proinflamatorni citokin u srčanoj insuficijenciji je TNF- $\alpha$ . 1975.g. Carswell i sar. (295) identifikovali su serumski protein čija je sinteza endotoksinom stimulisana i za koji je utvrđeno da izaziva nekrozu tumora. Prvobitno je nazvan kahektin jer se smatralo da ima ulogu u molekularnoj osnovi kaheksije (295). Sintetiše se kao prekursor (proTNF- $\alpha$ ) protein izgrađen od 212 aminokiseline (AK) (26kDa) kao stabilna homotrimerna transmembranska forma (tmTNF- $\alpha$ ). Aktivnošću TNF- $\alpha$  konvertirajućeg enzima (eng. TNF-alpha-converting enzyme-TACE), za membranu vezanog enzima iz grupe matriks metaloproteinaza, izdvaja se zrela forma, polipeptid od 17kDa. Polimerizacijom tri polipeptidna lanca nastaje cirkulišući homotrimer, solubilna forma TNF- $\alpha$  (51kD; sTNF- $\alpha$ ) (296). Obe forme, tmTNF- $\alpha$  i sTNF- $\alpha$  su biološki aktivne i njihova relativna količina zavisi od vrste stimulusa, od aktivnosti i vrste stimulisanе ćelije kao i od aktivnosti TACE i prirodnih inhibitora TACE kao što je tkivni inhibitor 3 metaloproteinaza (eng. tissue inhibitor of metalloproteinases-3) (297). Kada koncentracije sTNF- $\alpha$  padne na nanomolarni nivo dolazi do izdvajanja monomernog fragmenta od 17 kd koji nije biološki aktivan (298). Sintezu prekursora postižu brojni infektivni i inflamatorni stimulusi kao što su lipopolisaharaidi, virusi, antigeni parazita i gljiva, IL-1 ali i molekul TNF- $\alpha$  (299). Mnoge imune ali i neimune ćelije mogu sintetisati TNF- $\alpha$  kao što su makrofagi, T limfociti, mastociti, granulociti, natural killer (NK ćelije), fibroblasti, neuroni, keratinociti i glatkomišićne ćelije (300).



Slika 16. Sinteza, vezivanje za receptore i signalni put TNF- $\alpha$ .  
(preuzeto i adaptirano iz ref. 306)

Biosinteza TNF- $\alpha$  zavisi od genske transkripcije i indukcije sinteze iRNK posredstvom brojnih stimulusa unutar 30 min. Međutim, mnogo značajnija regulacija TNF ekspresije se odvija na postranslacionom nivou. Naime, adenin-uracil (eng. A-U-rich elements – ARE) segmenti 3-netranslirajućeg regiona utiču na translaciju i degradaciju iRNK (301). Na sopstvenu produkciju TNF- $\alpha$  može da utiče pozivnom i negativnom povratnom spregom. Povećanje sinteze nekih citokina kao što su interleukin 1 (IL-1), interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) i interleukin 2 (IL-2) podstiče produkciju TNF- $\alpha$ . Međutim, TNF indukcijom sinteze IL-10, prostaglandina i kortikosteroida, inhibira sopstvenu sintezu (300).

Kada se sintetiše i oslobodi, TNF- $\alpha$  svoje biološke efekte ostvaruje preko dva tipa TNF receptora- TNF receptor 1 (TNFR-1) i TNF receptor 2 (TNFR-2). TNFR mogu aktivirati i sTNF- $\alpha$  i tmTNF- $\alpha$ . TNFR su membranski glikoproteini koji se razlikuju po profilu ekspresije u različitim ćelijama, po afinitetu za ligande, strukturi bočnog lanca i transdukciji signala. Uz to, tmTNF- $\alpha$  može funkcionisati i kao ligand i kao receptor (300) (sl. 15). Posle aktivacije receptora, intracelularne promene su posledica aktivacije nuklearnog faktora  $\kappa$ B NF- $\kappa$ B ili apoptoza, u zavisnosti od metaboličkog stanja ćelije.

Interesantno je da vezivanje tmTNF ili TNF antagonista za TNFR može imati potpuno suprotne efekte i usloviti aktivaciju ćelije, supresiju citokina i apoptoze (302).

Zdrav miokard ne sadrži TNF- $\alpha$  ali ima oba tipa receptora koje aktivira TNF- $\alpha$  (TNFR1 i TNFR2). Međutim, u insuficijentnom srcu postoji ekspresija TNF alfa i nishodna regulacija TNFR (303). Kao što je gore navedeno, u miokardu se TNF- $\alpha$  sintetise kao odgovor na delovanje endotoksina, opterećenje pritiskom ili volumenom, ishemije/reperfuzije i oksidativnih stimulusa kao što je nuklearni faktor kapa B (NF $\kappa$ B) (247), što je potvrđeno nalazom iRNK za TNF- $\alpha$  u insuficijentnom srcu (304).

TNFR1 je konstitutivno prisutan na skoro svim ćelijama osim eritrocita, dok TNFR2 je generalno inducibilna forma i prevashodno prisutna na endotelnim i hematopoetskim ćelijama (300). Solubilna forma TNF- $\alpha$  (sTNF- $\alpha$ ) ima veći afinitet i 30 puta je duže vezana za TNFR-1 u odnosu za TNFR-2 (305), pored toga, posle disocijacije od TNFR-2, TNF- $\alpha$  vezuje se za TNFR-1. Na drugoj strani tmTNF- $\alpha$  ispoljava veći afinitet prema TNFR-2.

Stimulacijom TNF receptora aktivira se signalni put koji vodi apoptozi ili aktivaciji nuklearnog faktora  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) i aktivacionog protein-1 (AP-1 Activating protein-1) (306). Kada je aktiviran NF- $\kappa$ B put, suprimiran je proces apoptoze. To se postiže vezivanjem proteina, tzv. domena smrti (eng. death domen, DD) za intracelularni deo TNFR1. Međutim, ukoliko je iz bilo kojih razloga otežana aktivacija NF- $\kappa$ B puta, apoptoza postaje dominantan signalni put (300). Aktivaciji NF- $\kappa$ B prethodi fosforilacija i proteolitička degradacija inhibitornog proteina I $\kappa$ B. Slobodni NF- $\kappa$ B, heterodimer koji se vezuje za promotore brojnih gena kao što su geni za TNF- $\alpha$ , iNOS i adhezione molekule. Permanentna aktivacija NF- $\kappa$ B u SI nezavisno od etiologije sugerise na značaj ovog transkripcionog faktora u patofiziologiji srčane slabosti (307).

U srcu aktivacija TNFR1 ima negativni inotropni efekat, pokreće apoptozu kardiomiocita i povećanu ekspresiju HSP 72 (308). Na drugoj strani, aktivacija TNFR2 je povezana sa protektivnim dejstvom TNF- $\alpha$  na kardiomiocit u toku hipoksije i ishemije koja se delom odvija posredstvom i TNFR1 receptora (309, 310). Ovaj receptor posreduje u nastanku autoimunog miokarditisa u eksperimentalnim uslovima, a njegov nedostatak kod miševa sa prekomernom ekspresijom TNF- $\alpha$  pogoršava srčanu insuficijenciju i mortalitet (311). U studiji Hamida i sar. potvrđeno je da TNFR1 i TNFR2 imaju suprotne efekte na remodelovanje, hipertrofiju leve komore, produkciju nuklearnog faktora  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), inflamaciju i apoptozu u miokardu (312).

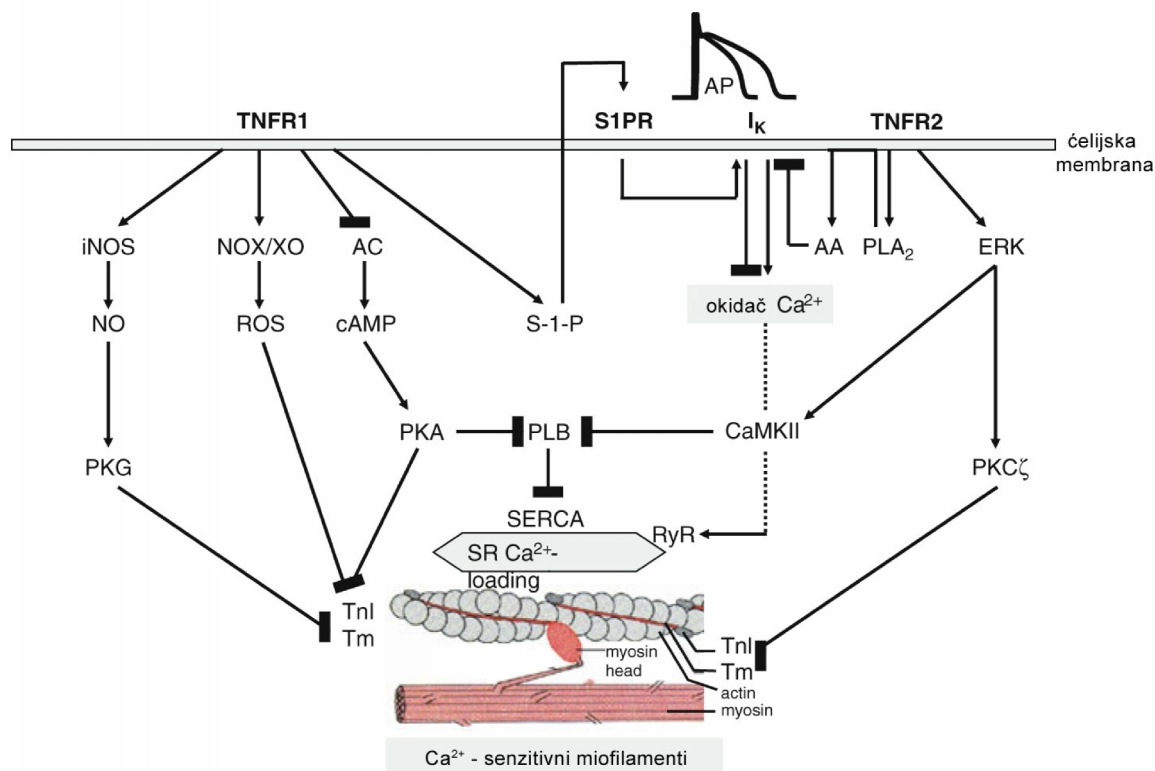
Solubilna forma TNFR ima potencijalno koristan efekat jer se vezivanjem 1-og do 3 molekula TNF- $\alpha$  redukuju njegovi ćelijski efekti ali, sa druge strane, je izvor prolongirane aktivnosti ovog citokina (313, 314). Oba tipa receptora, nakon aktivacije mogu se naći u krvi i urinu. Ova, tzv. solubilna forma receptora (sTNFR) u korelaciji je sa lošom prognozom SI u kraćem (315) i dužem vremenskom intervalu (316). Pored toga, pokazano je da je TNFR1 nezavisni faktor rizika za mortalitet i pojavu srčane slabosti kod pacijenata sa akutnim infarktom miokarda zajedno sa EF, Kilip klasom i kreatin kinazom-MB (C-ALPHA studija) (317). Nivo sTNFR1 je najviši kod pacijenata sa najtežom formom srčane slabosti, u fazi dekompenzacije i kod pacijenata sa kaheksijom (279). Zbog toga što je teško direktno meriti TNF- $\alpha$  u miokardu, meri se TNFR kao relativni index lokalne aktivacije TNF- $\alpha$  (318, 320).

### **2.2.2.1 Biološki efekti TNF- $\alpha$ u srcu**

Koje će efekte TNF- $\alpha$  imati zavisi od tipa ćelije, u kojoj se fazi ćelija aktivira i od lokalne koncentracije citokina. Npr, infuzija TNF- $\alpha$  zdravim dobrovoljcima usloviće vazokonstrikciju (320) i delovati prokoagulatno (321), ali ukoliko se sa visokim dozama TNF- $\alpha$ , primeni endotoksin, dolazi do hipotenzije, povećane vaskularne permeabilnosti i depresije miokarda (322). Kratkotrajna produkcija u srcu je korisna u adaptaciji na različite stresore, dok u dužem vremenskom periodu doprinosi progresiji srčane slabosti. Veliki broj studija je ispitivao patofiziološki značaj produkcije TNF- $\alpha$  u miokardu koristeći razvijen eksperimentalni model transgenih miševa sa prekomernom ekspresijom ovog citokina, kod kojih je registrovana miokardna inflamacija, dilatacija srčanih šupljina i razvoj SI (323, 324).

Miokardna disfunkcija u SI je posledica, pre svega izmene  $\beta$  receptorske signalne transdukcije, povećane sinteze reaktivnih kiseoničnih vrsta i aktivacije inducibilne forme NO sintetaze (325, 326). Prve rezultate o kardiodepresornom dejstvu TNF- $\alpha$  objavili su Finekel i sar. (327) koji su utvrdili da je umereni negativni inotropni efekat dozno-zavistan i reverzibilan što je bilo u skladu sa rezultatima i drugih autora (328,329). Danas je poznato da je inotropni efekat citokina kompleksan, da uključuje inicijalni, unutar nekoliko minuta, depresorni ili stimulatorni efekat u zavisnosti od eksperimentalnih uslova i fiziološkog miljea, i kasniji, kardiodepresorni odgovor koji traje od nekoliko sati do nekoliko dana i zavisi od sinteze sekundarnih glasnika (326). Za inicijalno dejstvo TNF- $\alpha$  značajna je aktivacija konstitutivne NO sintetaze, sfingolipidnih medijatora, arahidonske

kiseline, kao i promena intracelularne koncentracije kalcijuma, dok je odložen odgovor rezultat delovanja NO (sintetisan uz učešće inducibilne NO sintaze), stvaranje reaktivne kiseonične vrste, izmene  $\beta$  adrenergičkog signalnog puta (326).



Slika 17. TNF $\alpha$  i kontraktilna funkcija ((preuzeto i adaptirano iz ref. 331)

Pored funkcionalnih javljaju se i strukturne promene koje doprinose progresiji srčane slabosti kao što su hipertrofija, apoptoza kardiomiocita i kardijalna fibroza. U osnovi kompleksnih promena koje se odvijaju u toku remodelovanja leve komore nalaze se važne izmene na molekularnom, ćelijskom i intersticijalnom nivou koje utiču na funkciju i veličinu leve komore (Tabela br.1). Neke od ovih promena poput smanjene ekspresije gena za  $\alpha$  a povećane za  $\beta$  teški lanac miozina, progresivnog gubitka miofilamenata, izmena u citoskeletu i desenzitizacije  $\beta$  adrenergičke transmisije su revezibilne i posle  $\beta$  blokade, uz povećanje EFLK, dolazi do povećanja iRNK za ATPazu sarkoplazmatkog retikuluma,  $\alpha$  lanac miozina i smanjenja ekspresije gena za  $\beta$  teški lanac miozina (308). Prema tome, efekat  $\beta$  blokade je delom povezan sa izmenama u ekspresiji gena u miokardu.

Kada se TNF- $\alpha$  primeni u patofiziološki relevantnim koncentracijama dovodi do hipertrofije kardiomiocita eksperimentalnih životinja (330), kao i u *in vitro* uslovima (331). U skladu sa ovim su i rezultati drugih studija sa prekomernom ekspresijom gena za TNF- $\alpha$



(332, 333). Interesantni su rezultati dve studije u kojima su eksperimentalni modeli srčane slabosti uzrokovani izolovanom prekomernom kardijalnom ekspresijom tmTNF- $\alpha$ , odnosno sTNF- $\alpha$ , imali različit patofiziološki supstrat (332, 334). Naime, ukoliko je povećana sinteza tmTNF- $\alpha$ , fenotip srčane isuficijencije imao je u osnovi koncentričnu hipertrofiju leve komore, povećan sadržaj kolagena i reekspresiju fetalnih gena (332), dok prekomerna ekspresija sTNF- $\alpha$  uslovlila dilatantnu kardiomiopatiju i smanjenje sadržaja kolagena (334). Pored svog direktnog dejstva na sintezu proteina i reekspresiju fetalnih gena (331, 332) TNF- $\alpha$  može posredno, stimulacijom sinteze iRNK za IL-1 i IL-6, usloviti hipertrofiju kardiomiocita (335). TNF- $\alpha$  stimulirana hipertrofija kardiomiocita se može smanjiti istovremenom primenom losartana, antagoniste angiotenzina II (263) i blokadom NF- $\kappa$ B (336), a delom je posledica nakupljanja reaktivnih kiseoničnih vrsta (275).

Tabela 2. Efekti TNF- $\alpha$  na remodelovanje leve komore

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biološke promene miocita               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Hipertrofija miocita</li> <li>○ Kontraktilna disfunkcija</li> <li>○ Ekspresija fetalnih gena</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Promene ekstracelularnog matriksa               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Degradacija matriksa</li> <li>○ Fibroza</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Progresivni gubitak miocita               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Nekroza</li> <li>○ Apoptoza</li> </ul> </li> </ul>

Za progresivni gubitak miocita putem nekroze odgovorni su noradrenalin, angiotenzin II i endotelin, dok se promene na DNK koje su karakteristične za apoptozu povezuju sa dejstvom još i TNF- $\alpha$  i oksidativnim stresom. Uloga apoptoze u progresiji srčane insuficijencije nije u potpunosti razjašnjena iako je poznato da gubitak kardiomiocita na ovaj način nesporno doprinosi disfunkciji miokarda. Naime, kod pacijenata u terminalnoj fazi dilatantne kardiomiopatije apoptoza je zastupljena kod 0,08 do 0,25% kardiomiocita, dok je u kontrolnoj grupi 0,001 do 0,002% (343). Pored članova TNF familije značajni su i neki drugi citokini, poput IL-1 $\beta$  i monocitnog hemotaktičnog proteina (eng. monocyte chemoattractant peptide-MCP-1) (259). U procesu apoptoze,

pokrenutog aktivacijom TNFR1, najvažnija je aktivacija kaspaza (cistein-aspart proteaza) i povećanja intracelularnog oksidativnog stresa što ima za posledicu poremećaj funkcije mitohondrija i oslobađanje citohroma C u citoplazmu (253). Međutim, za fiziološki značaj oksidativnog stresa, kako rezultati jedne studije ukazuju, je mnogo značajniji balans između TNF- $\alpha$  i IL-10 od aktivnosti ovih citokina ponaosob (338).

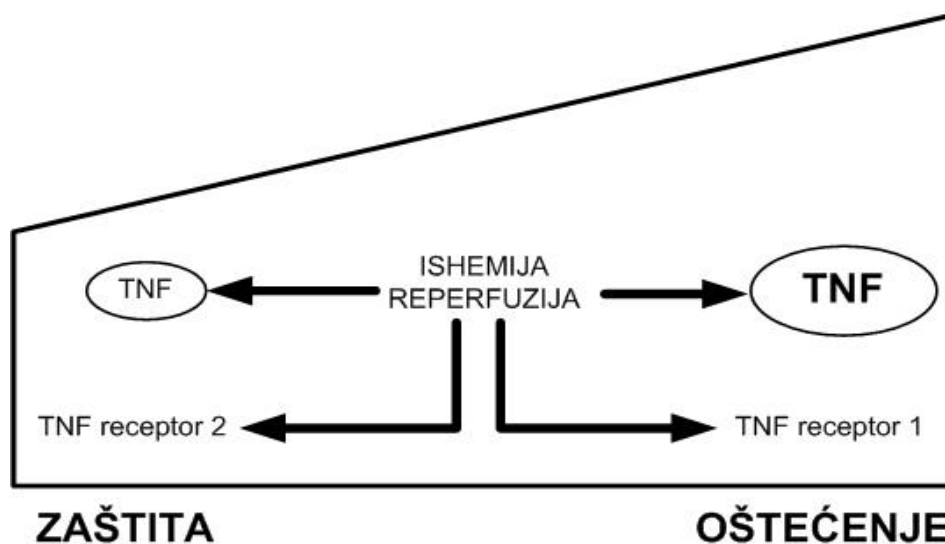
Ekstracelularni matrix (ECM) je izgrađen od mreže kolagenih vlakana, bazalne membrane i proteoglikana. Neke promene ECM poput prekida kontinuiteta mreže kolagena, smanjenja adhezivnosti kardiomiocita za bazalnu membranu, promena aktivnosti matriks metaloproteinaza (eng. matrix metalloproteinases-MMPs) i njihovih endogenih inhibitora - tkivnih inhibitora metaloproteinaza (eng. tissue inhibitors of metalloproteinases - TIMPs) koje su veoma značajne u remodelovanju leve komore i progresiji miokardne disfunkcije (339) nastaju posredstvom TNF- $\alpha$  (340). Naime, u osnovi izmenjenog balansa između sinteze i razgradnje kolagena je disregulacija aktivnosti MMPs i TIMPs (341). Stimulacija aktivnosti MMPs pod uticajem TNF- $\alpha$  vremenom slabi i zajedno sa povećanom ekspresijom TIMPs uslovljava povećanje sinteze i deponovanja kolagena i miokardnu fibrozu (313, 342). U skladu sa ovim su rezultati studije Lija i sar. da neutralizacija TNF- $\alpha$  smanjuje denaturaciju kolagena i aktivnost matriks metaloproteinaze (343).

Pored toga, TNF- $\alpha$  dovodi do povećanja aktivnosti lipoproteinske lipaze (344) i izmene metabolizma insulina (345) što povećava intenzitet slobodnih masnih kiselina i potrebe miokarda za kiseonikom (308). Na osnovu ovih rezultata može se pretpostaviti da su biološke promene u kardiomiocitima delimično uslovljene i metaboličkim izmenama.

Prema tome, TNF- $\alpha$  posredovane promene u veličini LK i debljini njenog zida su veoma kompleksne i povezane sa izmenama u biologiji kardiomiocita (hiperofija, apoptoza) i ekstracelularnom matriksu (sinteza i/ili degradacija kolagena) (308).

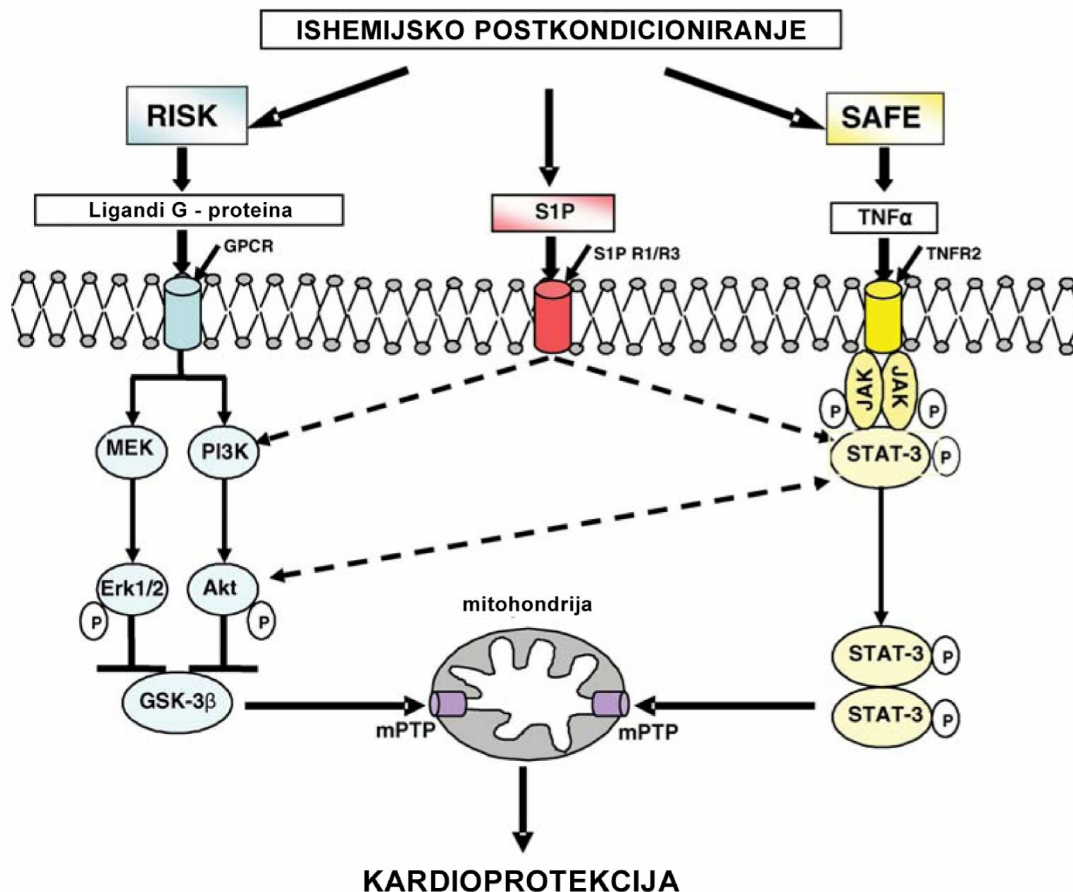
Kao što je već ranije pomenuto, oštećenje miokarda u toku ishemije i reperfuzije je delom uslovljeno efektima TNF- $\alpha$ . Naime, pored reverzibilne endotelne i miokardne disfunkcije, egzogena primena ili povećana produkcija TNF- $\alpha$  u toku ishemije/reperfuzije uslovljeće miokardnu disfunkciju iako je koronarni protok neizmenjen ili blago redukovan (346, 347). U sličnim istraživanjima je pokazano da nakon reperfuzije prvi skok TNF- $\alpha$  nastaje u prvim satima, dok se drugi skok javlja posle osam dana (348, 351). Pored toga, eksperimentalno je pokazano da nedostatak gena za TNF- $\alpha$  kod miševa štiti miokard od ishemija/reperfuzija oštećenja (351), kao i da primena At protiv TNF redukuje veličinu

infarkta (352). Međutim, objavljeni rezultati drugih studija ukazali su na protektivnu ulogu TNF- $\alpha$  u toku ishemije i reperfuzije, odnosno srčane insuficijencije. Kurrelmeyer i sar. su utvrdili da ukoliko postoji nedostatak gena za TNFR1 i TNFR2 kod miševa, infarktna zona je veća, a apoptoza kardiomiocita je intenzivnija (310). U prilog ovome govori i činjenica da egzogena primena TNF- $\alpha$  u *in vitro* uslovima štiti humane kardiomiocite od hipoksičkog oštećenja (353).



Slika 18. TNF $\alpha$  u ishemiji/reperfuziji miokarda  
(preuzeto i adaptirano iz ref. 362)

Ovo kardioprotektivno dejstvo, kako ukazuju rezultati nekih studija, je dozno-zavisno (sl. 18). Naime, male doze egzogenog TNF- $\alpha$  preveniraju ishemija-reperfuzija oštećenje (0,5 ng/ml, *in vitro*), dok su veće doze (10-20 ng/ml, *in vitro*) citotoksične (353, 354). Ovakvi kontraverzni rezultati se možda mogu objasniti tipom receptora koji se aktivira, odnosno da TNFR1 posreduje u kardiotoksičnom, a TNFR2 kardioprotektivnom dejstvu (312). Važan signalni put koji se u srcu aktivira posredstvom TNFR2 je SAFE put (eng. Survivor Activating Factor Enhancement pathway). Nakon što se TNF- $\alpha$  veže za TNFR2 aktivira se janus kinaza/signalni prenosilac i aktivator transkripcije 3 (eng. Janus kinase / signal transducer and activator of transcription 3 - JAK/STAT3) signalni put (355, 356) (Slika 19). JAKs je porodica tirozin kinaza koja ima važnu ulogu regulaciji transkripcije gena odnosno u trasmisiji signala od citosola do jedra i ekspresiji antiapoptotičnih i supresiji proapoptotičnih gena (357). Prema tome, umerena stimulacija ovog puta povećava preživljavanje ćelije dok je prekomerna aktivnost štetna i, kako rezultati nekih studija pokazuju, odgovorna za inflamaciju, remodelovanje LK i razvoj srčane insuficijencije (350, 358).



Slika 19. Šematski prikaz kardioprotektivnog SAFE puta (preuzeto i adaptirano iz ref. 350).

## 2.2.2.2 Prognostički značaj TNF-a u SI

### 2.2.2.2.1 TNF- $\alpha$ kao marker srčane insuficijencije

Prvi rezultati o povišenom nivou TNF- $\alpha$  kod pacijenata sa teškom formom SI objavljeni su 1990. godine (282). Kako je povišen nivo TNF- $\alpha$  utvrđen kod pacijenata sa kardijalnom kaheksijom (359, 360) i dekompenzacijom (286) pretpostavljeno je da pojačana ekspresija ovog inflamatornog markera nastaje samo u terminalnoj fazi bolesti. Međutim, kao što su rezultati brojnih studija to potvrdili, aktivacija ovog proinflamatornog molekula počinje u ranijim fazama SI (NYHA klase II) (282, 296) ili kod asimptomatskih pacijenata (353), nastavljajući da raste sa pogoršanjem bolesti (296, 362) nezavisno od uzroka (292, 303; 319) i korelira sa mortalitetom kod uznapredovale srčane slabosti (364).

Povećanje nivoa TNF- $\alpha$  povezano je sa smanjenjem broja receptora u miokardu i povećanjem broja solubilnih TNFR (303). Povećanje solubilnih TNFR, kao što je već pomenuto je mnogo senzitivniji marker imune aktivacije od nivoa TNF- $\alpha$  (319).

#### **2.2.2.2.2 Nivo TNF- $\alpha$ kao prediktor loše prognoze srčane slabosti**

Postoji korelacija nivoa TNF- $\alpha$  i solubilnog TNFR i povećanja mortaliteta kod pacijenata sa SI (363, 364). Posebno se izdvaja značaj solubilnih TNFR kao nezavisnog faktora rizika. Kako rezultati Dunlay i sar. (365) pokazuju, lošu prognozu imaju i pacijenti sa srčanom insuficijencijom i očuvanom ejakcionom frakcijom. Potvrđena je direktna povezanost nivoa TNF- $\alpha$  sa neurohumoralnom aktivacijom i stepenom anemije kao i kaheksije, kao najvažnijim kliničkim markerom loše prognoze (366).

#### **2.2.2.2.3 Nivo TNF- $\alpha$ kao marker terapijskog odgovora u srčanoj insuficijenciji**

U nekoliko studija je praćen nivo TNF- $\alpha$  u toku standardne terapije SI. Rezultati studija o uticaju ACE inhibitora na produkciju TNF- $\alpha$  nisu konzistentni. Iako je ACE inhibicija u *in vitro*, u kulturi mononukleara i endotelnih ćelija, suprimirala produkciju TNF- $\alpha$  (367; 368) kao i kod eksperimentalnih životinja (367; 369), to nije potvrđeno u svim kliničkim studijama, ni sa svim ACE inhibitorima (362, 363). Prema tome, potrebna su druga ispitivanja da bi se ovaj efekat povezao sa ACE inhibicijom.

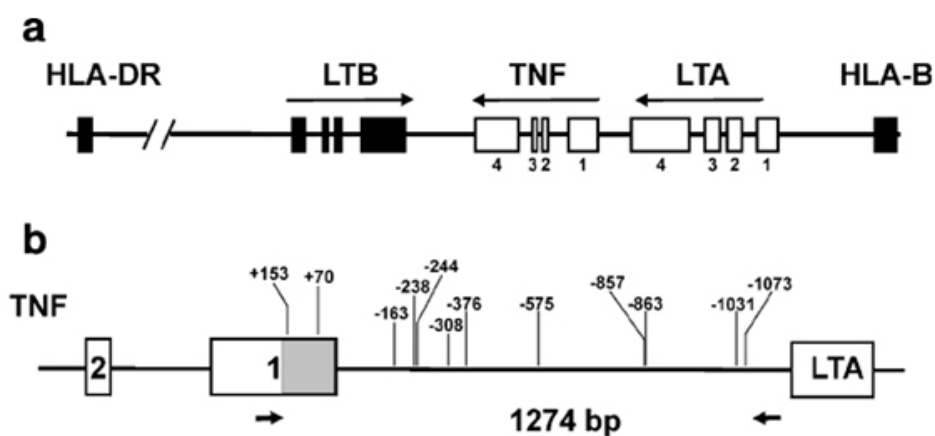
Slični rezultati dobijeni su i u studijama u kojima je ispitivan uticaj beta blokatora. U eksperimentalnom modelu postinfarktnog remodelovanja LK, kao i kod pacijenata sa dilatantnom kardiomiopatijom (372, 373) metoprolol, selektivni  $\beta_1$  antagonist, je suprimirao produkciju proinflamatornih citokina. Međutim, druge eksperimentalne studije to nisu potvrdile (374, 375) kao ni subanaliza MERIT-HF studije (Metoprolol CR/XL Randomized Intervention Trial in Congestive Heart Failure) (376).

Karvedilol, neselektivni  $\beta$  blokator, u *in vitro* uslovima suprimira endotoksinom stimulisanu sintezu TNF- $\alpha$  u humanim monocitima (377), smanjuje ekspresiju NF- $\kappa$ B u aktiviranim humanim T limfocitima (375). Ovaj efekat karvedilol verovatno postiže svojim antioksidativnim svojstvima (375, 378). U kliničkim studijama karvedilol je suprimirao intrakardijalnu produkciju TNF- $\alpha$  (379, 380) i, za razliku od metoprolola, smanjio i produkciju IL-6 kod pacijenata sa idiopatskom kardiomiopatijom (374).

Ovi rezultati ukazuju na važnu interakciju između RAAS i proinflamatornih citokina, kao i da se efekti konvencionalne terapije mogu delimično objasniti i modulacijom proinflamatornih citokina.

### 2.2.2.3 Polimorfizma gena za TNF- $\alpha$

Gen za TNF- $\alpha$  nalazi se na kratkom kraku šestog hromozoma, između gena za TNF- $\beta$  (LT $\alpha$ ) i LT $\beta$  i zajedno sa njima leži u klasi III regiona glavnog kompleksa histokompatibilnosti (eng. major histocompatibility complex (MHC)), između klase II humanog leukocitnog antigena (HLA) površnih molekula HLA-DP, DQ i DR i MCH klase I antigena, HLA-A, B i C (Slika 20). To je region sa najvećom gustinom gena koji determinišu individualnost imunog odgovora: oko 40% gena u ovom regionu su značajni za imuni sistem (The MHC sequencing consortium, 1999, Nature). Pored toga, ovo je region sa najvećim brojem polimorfizma u celom genomu. Imajući u vidu ovakav značaj MHC regiona, može se pretpostaviti da polimorfizam unutar ovog lokusa može doprineti njegovoj udruženosti sa infektivnim i autoimunim bolestima (373,374), posebno ukoliko TNF- $\alpha$  pokreće inflamatornu reakciju kao što je u reumatoidnom artritisu (382) ili kada je visoka koncentracija ovog citokina u serumu udružena sa lošom prognozom, kao što je u malariji (385). U prilog ovome govori udruženost specifičnih MCH haplotipova sa različitim TNF- $\alpha$  fenotipovima: DR3 i DR4 haplotipovi su udruženi sa većom (386, 387), a DR2 haplotipovi sa smanjenom produkcijom TNF- $\alpha$  (386, 387). Ovi rezultati sugerišu da funkcionalni polimorfizam koji reguliše gen za TNF se nalazi unutar ovog regiona. Prema tome, zbog tzv. „vezanog disekvilibrjuma“ tj. vezanog nasleđivanja ovih alela, udruženost MCH haplotiva i TNF fenotipova može se objasniti polimorfizmom TNF gena ili varijabilnošću povezanog gena koji direktno ili indirektno reguliše ekspresiju TNF- $\alpha$ .



Slika 20. TNF kompleks (preuzeto i adaptirano iz ref. 373)

Identifikovani su brojni polimorfizmi unutar i oko gena za TNF koji mogu uticati na njegovu produkciju (Slika 20). U regionu promotora registrovano je 10 polimorfizama: na poziciji -1073 (C/T), -1031 (T/C), -863 (C/A), -857 (C/T), -575 (G/A), -376 (G/A), -308(G/A), -244 (G/A), -238 (G/A) i -163 (G/A). Dva polimorfizma su registrovana u egzonu 1 unutar UTR (eng. 5' untranslated region - UTR), na poziciji +70 (insercija C) (343) i +153 (C/T) (390). Nekoliko polimorfizma su pronađena u intronima (395), dok je G/T dimorfizam prisutan u 3' UTR (392). Značaj polimorfizma jednog nukleotida (SNP) je mnogo veći ukoliko se za tu sekvencu DNK vezuju transkripcioni faktori. Postoje brojne tehnike kojima se može utvrditi da li izmena jednog nukleotida menja vezivanje transkripcionih faktora, transkripcionu aktivnost te sekvence ili količinu sintetisanog TNF- $\alpha$ . Nažalost, u različitim eksperimentalnim uslovima dobijeni su suprotni rezultati o uticaju nekih polimorfizama na TNF- $\alpha$  sintezu.

Najveći broj ispitivanja funkcionalnog značaja polimorfizma jednog nukleotida u promotoru TNF su fokusirana na poziciju -308 gde postoji, kako su prvi opisali Wilson i sar., bialelni polimorfizam: zamena uobičajnog guanina, označenog kao divlji tip (TNFA1), adeninom kao ređim alelom (TNFA2) (395). Polimorfni TNFA2 alel je povezan sa MCH haplotipom HLA-A1, B8, DR3 (394) koji, kao što je već gore navedeno, povezan sa povećanom produkcijom TNF- $\alpha$  (385,387) i autoimunim bolestima kao što su insulin zavisni diabetes melitus (385) i sistemski eritemski lupus (396). Pored toga, kako rezultati nekih studija ukazuju, TNFA2 homozigoti imaju viši nivo TNF- $\alpha$  u cirkulaciji u odnosu na TNFA1 homozigote (397, 398). Međutim, druga istraživanja nisu potvrdila uticaj -308 G/A polimorfizma na nivo TNF- $\alpha$  u cirkulaciji (399, 400). Brojna ispitivanja o uticaju ovog polimorfizma na transkripciju imala su kontraverzne rezultate. Dok su rezultati četiri nezavisne grupe autora pokazali da TNFA2 alel ima veću transkripcionu aktivnost u poređenju sa TNFA1 (401-403), druge studije nisu utvrdili statistički značajnu razliku (389, 404). Pored toga, nekonzistentne rezultate imale su i studije u kojima je u *in vitro* uslovima ispitivana stimulirana produkcija TNF- $\alpha$  u ćelijama -308 G/G homozigota i G/A heterozigota: dve grupe autora su potvrdila povećanu produkciju kod nosioca G/A u odnosu na G/G (397, 405) dok četiri nisu (406-409). Statističku značajnost dobijenih rezultata ovih studija umanjuju dva važna faktora: razlika u koncentraciji primenjenog LPS, 1ng-10 $\mu$ g/ml, mali broj heterozigota G/A, od 6 do 16.

Značaj ovog polimorfizma ispitivan je u mnogim infektivnim, autoimunim i malignim bolestima. Smatra se da kod nosioca TNFA2 postoji povećan rizik od pojave sepse (410) i da je kod pacijenata ako se razvije septički šok povećan mortalitet (411).

Potvrđena je udruženost -308 G/A polimorfizma sa astmom (412), diabetesom (413), sistemskim eritemskim lupusom (414) i juvenilnim reumatoidnim artritisom (415). Pored toga, značaj ovog polimorfizma je potvrđen u Guillan–Bareovom sindromu (416) i nonHodkin limfomu (417). Interesantni su rezultati dve metaanalize o značaju ovog polimorfizma kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom i ulceroznim kolitisom. Naime, autori su utvrdili da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji TNFA1 i TNFA2 alela kod obolelih u Evropi za razliku od Južne Amerike (418), odnosno istočne Azije (419).



### 3 HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

#### Nulta hipoteza

- Ne postoji značajna razlika u distribuciji genskih polimorfizama na genima za  $\beta_1$  i  $\beta_2$  receptore pacijenata sa srčanom insuficijencijom u odnosu na grupu zdravih ispitanika
- Ne postoji uticaj genskih polimorfizama na genima za  $\beta_1$  i  $\beta_2$  receptore na terapijski odgovor beta blokatora kod pacijenata sa SI
- Ne postoji značajna razlika u učestalosti G i A alela i genotipova polimorfizma (-308 G/A) na genu za TNF- $\alpha$  između ispitivane i kontrolne grupe
- Ne postoji veza između genskog polimorfizma (-308 G/A) na genu za TNF- $\alpha$  i težine kliničke slike, toka i ishoda bolesti

#### Radna hipoteza

- **Prisustvo određenog alela ili genotipa** na genima za  $\beta_1$  i  $\beta_2$  receptore određuje predispoziciju za pojavu srčane insuficijencije
- **Prisustvo određenog alela ili genotipa** na genima za  $\beta_1$  i  $\beta_2$  receptore određuje težinu kliničke slike, tok i ishod bolesti
- **Prisustvo određenog alela ili genotipa** na genima za  $\beta_1$  i  $\beta_2$  receptore utiče na terapijski odgovor beta blokatora
- **Prisustvo određenog genotipa** polimorfizma (-308 G/A) na genu za TNF- $\alpha$  na pojavu, tok i ishod srčane insuficijencije

## 4 CILJ RADA

1. Ispitati učestalost genskih polimorfizama na genima za  $\beta_1$  i  $\beta_2$  receptore pacijenata sa srčanom insuficijencijom u odnosu na grupu zdravih ispitanika
2. Ispitati distribuciju genskog polimorfizma (-308 G/A) na genu za TNF- $\alpha$  kao i učestalosti G i A alela i genotipova (A/A, G/A i G/G) ispitivanog polimorfizma, kod pacijenata sa SI u odnosu na zdrave ispitanike
3. Ispitati distribucije alela i genotipova ovih genskih polimorfizama unutar podgrupa napravljenih na osnovu težine kliničke slike i primene određenog beta blokatora
4. Ispitati uticaj genskih polimorfizama na genima za  $\beta_1$  i  $\beta_2$  receptore na terapijski odgovor beta blokatora kod pacijenata sa SI
5. Ispitati učestalost polimorfizma na genu za CYP2D6 kod pacijenata sa SI
6. Ispitati uticaj genskog polimorfizma na genu za CYP2D6 kod pacijenata sa SI na koncentraciju i terapijski odgovor  $\beta$  blokatora
7. Populacionom farmakokinetičkom analizom odrediti populacione farmakokinetičke parametre karvedilola i ispitati uticaj pojedinih činilaca na njihove vrednosti
8. Populacionom farmakokinetičkom analizom odrediti populacione farmakokinetičke parametre bisoprolola i ispitati uticaj pojedinih činilaca na njihove vrednosti

## 5 ISPITANICI I METODE

Istraživanje je obavljeno u Laboratoriji za funkcionalnu genomiku i proteomiku Naučnoistraživačkog Centra za Biomedicinu, Medicinskog fakulteta u Nišu, na materijalu koji je dobijen od bolesnika sa srčanom insuficijencijom lečenih na Institutu za lečenje i rehabilitaciju „Niška Banja“ i Klinici za kardiovaskularne bolesti Kliničkog centra Niš i kontrolne grupe, klinički zdravih osoba (dobrovoljni davaoci krvi Zavoda za transfuziju, Kliničkog centra Niš). Svi ispitanici su pre uključivanja u istraživanje obavješteni o ciljevima istraživanja i saglasnost potvrdili potpisivanjem informativnog pristanka. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Nišu (rešenje broj: 01-5413-4) i Etičkog odbora Instituta „Niška Banja“. Ispitivanja su vršena na mononuklearnim ćelijama izolovanim iz sveže krvi uzete sa 0,38% Na-citratom kao antikoagulansom (9ml krvi i 1ml antikoagulansa). Koncentracije karvedilola i bisoprolola u plazmi određene su metodom tečne hromatografije visokih performansi (HPLC).

### 5.1 Ispitanici

U istraživanje je uključeno ukupno 298 ispitanika, 216 pacijenata sa SI i 82 klinički zdrave osobe. Ispitanici studijske grupe bili su prosečne starosti  $63,98 \pm 11,39$  godina (95% CI: 62.44-65.53). Starost ispitanika se kretala od 28 do 83 godine. U ispitivanoj grupi bilo je značajno više muškaraca ( $n=159$ , 73,6%) nego žena ( $n=57$ , 26,4%). Pacijenti su odabirani u momentu kliničke prezentacije bolesti, dijagnoza je postavljana na osnovu kliničkih i ehokardiografskih kriterijuma. Dijagnoza SI je postavljena prema preporukama ACCA/AHA (American College of Cardiology, American Heart Association) na osnovu tipičnih simptoma i znakova srčane slabosti kod pacijenata koji imaju ehokardiografski utvrđenu normalnu EF i oštećenu dijastolnu funkciju LK (dijastolna SI), odnosno smanjenu EF i sistolnu disfunkciju (sistolna SI) (420). Procena težine kliničke slike izvršena je funkcionalnom klasifikacijom NYHA (New York Heart Association) koja se zasniva na subjektivnoj proceni lekara o pacijentovim mogućnostima i sposobnostima za uobičajne dnevne aktivnosti (420). Pacijenti su bili na standardnoj terapiji koja podrazumeva primenu ACEi, beta blokatora, spirinolaktona, diuretika, digoksina i statina. U istraživanje nisu uključeni pacijenti koji su bili na terapiji lekovima koji su snažni inhibitori CYP2D6 poput fluoksetina, paroksetina, bupropiona i hinidina, kao i pacijenti sa teškim funkcionalnim oštećenjem jetre.

Polna i starosna struktura ispitivanih grupa data je u tabeli 1.

Kontrolnu grupu činila su 82 ispitanika, prosečne starosti  $43,69 \pm 13,60$  godina, (27-79 godina), 51 žena (62,20%) i 31 muškarac (37,80%).

Tabela 3. Polna i starosna struktura ispitivane i kontrolne grupe

	Ispitivana grupa		Kontrolna grupa	
	N(%)	Starost (god)	N(%)	Starost (god)
<b>Muškarci</b>	159 (73,6)	62,75	31	37,80
<b>Žene</b>	57 (26,4)	67,38	51	62,20
<b>Ukupno</b>	216	63,98	82	43,69

U prospektivno istraživanje je uključeno 70 pacijenta koji su u proseku praćeni  $34,80 \pm 3,25$  meseci. U ovom periodu je registrovana rehospitalizacija, potreba za hitnom medicinskom pomoći i mortalitet ovih pacijenata. Na osnovu dobijenih podataka analiziran je uticaj polimorfizma adrenergičkih receptora i citohrom P 450 na klinički tok i ishod bolesti.

## 5.2 Metode

### 5.2.1 Ispitivanje genskih polimorfizama PCR-RFLP metodom

Izolacija DNK iz krvi bolesnika izvršena je korišćenjem komercijalnog QIA amp DNA Blood Mini kita (Qiagen GmbH, Hilden, Nemačka). Uzorkovana krv je čuvana na  $-80^{\circ}\text{C}$  do izolacije. Na dobijenom uzorku DNK ispitivani su polimorfizmi gena za TNF- $\alpha$  u poziciji - 308G/A (rs1800629), metodom lančane reakcije polimeraze-određivanje polimorfizama na osnovu dužine restrikcionih fragmenata (PCR-RFLP) (421).

#### 5.2.1.1 Ispitivanje polimorfizma Arg 389Gly (rs1801253) na genu za $\beta_1$ receptor

Na genu za  $\beta_1$  adrenergički receptor u položaju 1165, guanin ("divlji tip") može biti zamenjen citozinom, što može imati za posledicu u sekvenci amino kiselina tj amino kiselina glicin se menja u arginin u položaju 389. Fragment od 463 baznih parova amplifikovan je korišćenjem ushodnog (F 5'-CCGCCTCTTCGTCTTCTTCAACTG-3') i nishodnog (R 5'-TGGGCTTCGAGTTCACCTGCTATC-3') prajmera. Reakciona smeša

zapremine 25 ml sastojala se iz: 12,5 ml 10 x PCR reakcionog miksa (Kappa Biosystems), po 0,5 ml ushodnog i nishodnog prajmera (20 pmol/ml), i 10 ng DNK. Sve je dopunjeno ultračistom vodom do 25 ml.

Lančano umnožavanje gena vršeno je pod sledećim uslovima: inicijalna denaturacija na 95°C-2 minuta, praćena sa 39 ciklusa denaturacije na 95°C- 15 sec, anilingom na 66°C-30 sec, elongacijom na 72°C-30 sec i terminacijom na 72°C- 30 sec

#### **5.2.1.1.1 Elektroforeza na agaroznom gelu**

PCR amplikati proveravani su elektroforezom na agaroznom gelu (2%). Gel je pripreman tako što je 1,2g agaroze (Applichem, GmbH, Darmstadt, Nemačka) rastvoreno u 60 ml 1x TBE pufera (0,89 M Tris- HCL, 0,89 M borna kiselina, 0,5M EDTA pH 8,0). Isti pufer korišćen je za elektroforezu pod sledećim uslovima: jačina struje 100 mA, napon 100 V, vreme 30 min. DNK ladder (100 bp) korišćen je za detekciju veličine fragmenata. Nakon završene elektroforeze gel je bojen 30 minuta u smeši 20 µl etidijum bromida i 200 ml TBE, nakon čega je vršena vizuelizacija DNK fragmenata pod UV zracima.

#### **5.2.1.1.2 Digestija dobijenih PCR produkata**

Nakon potvrđene amplifikacije na agaroznom gelu, PCR amplikati su metodom restriktivne digestije, uz pomoć restriktivnih endonukleaza, isecani na manje fragmente, zavisno od prisustva polimorfizma restriktionog mesta. Reakciona smeša finalne zapremine 20 µL sadržala je: 2µL pufera Tango, 1 U µl *NcoI* enzima (Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Nemačka) i 15 µL PCR amplikata i dd H<sub>2</sub>O do finalne zapremine.

Digestija je vršena u vodenom kupatilu na 37°C u toku noći.

#### **5.2.1.1.3 Vizuelizacija dobijenih produkata digestije**

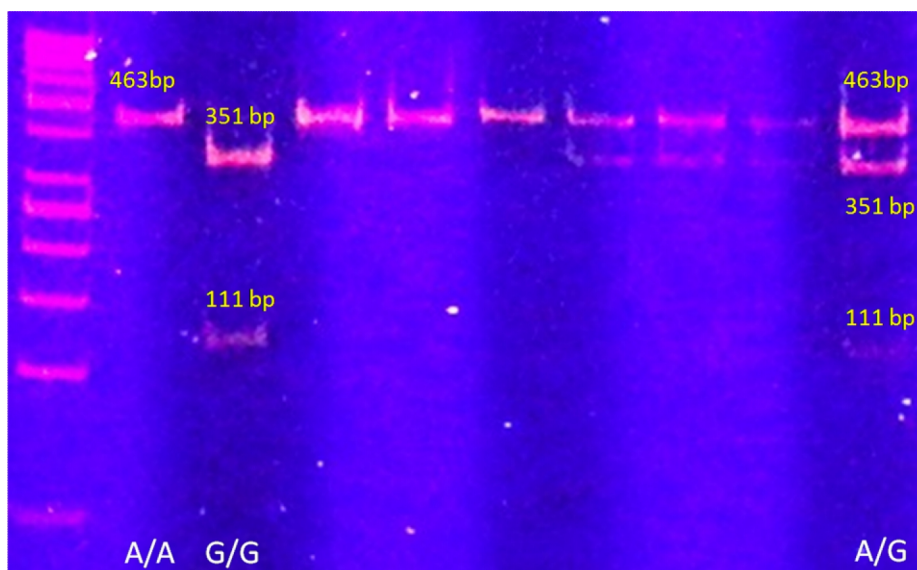
##### *5.2.1.1.3.1 Identifikacija fragmenata za ADRB1 Arg389Gly*

Nakon završene digestije, dobijeni DNK fragmenti identifikovani su na vertikalnom forezom na 8% poliakrilamid gelu. Gel je pripreman na sledeći način: 2,66 ml 30% akrilamidnog rastvora (29:1 akrilamid:N’N’metilen-bisakrilamid u vodi); 1ml 10x TBE pufera (0,89 M Tris-HCl, 0,89 M borne kiseline i 0,5 M EDTA pH 8,0); 6,13 mL dd H<sub>2</sub>O. Neposredno pre nalivanja gela dodati su inicijatori polimerizacije: 100µl 10% amonijumpersulfata i 10µL TEMED-a (N,N,N’,N’- tetrametilenetilen-diamin). Elektroforeza je izvedena u 1x TBE pod sledećim uslovima: jačina struje – 20 mA, napon -

120 V, vreme 80 min. Nakon završene elektroforeze, gel je ostavljen 30 minuta u smeši etidijum bromid i 1xTBE (0.5 $\mu$ g/  $\mu$ L), nakon čega je vršena vizualizacija DNF fragmenata pod UV zracima.

Nakon digestije mogla su da se vizuelizuju tri genotipa Arg389Gly polimorfizma

1. Arg/Arg-homozigot (divlji tip) (351+111bp)
2. Arg/Gly- heterozigot (463+351+111bp)
3. Gly/Gly- homozigot (mutirani) 463bp



Slika 21. Prikaz digestije na 8% akrilamid gelu. Kolona I DNK standard od 50 bp; kolona 2 A/A Arg/Arg-homozigot (divlji tip) (351+111bp); A/G, Arg/Gly- heterozigot (463+351+111bp); G/G, Gly/Gly- homozigot (mutirani) 463bp

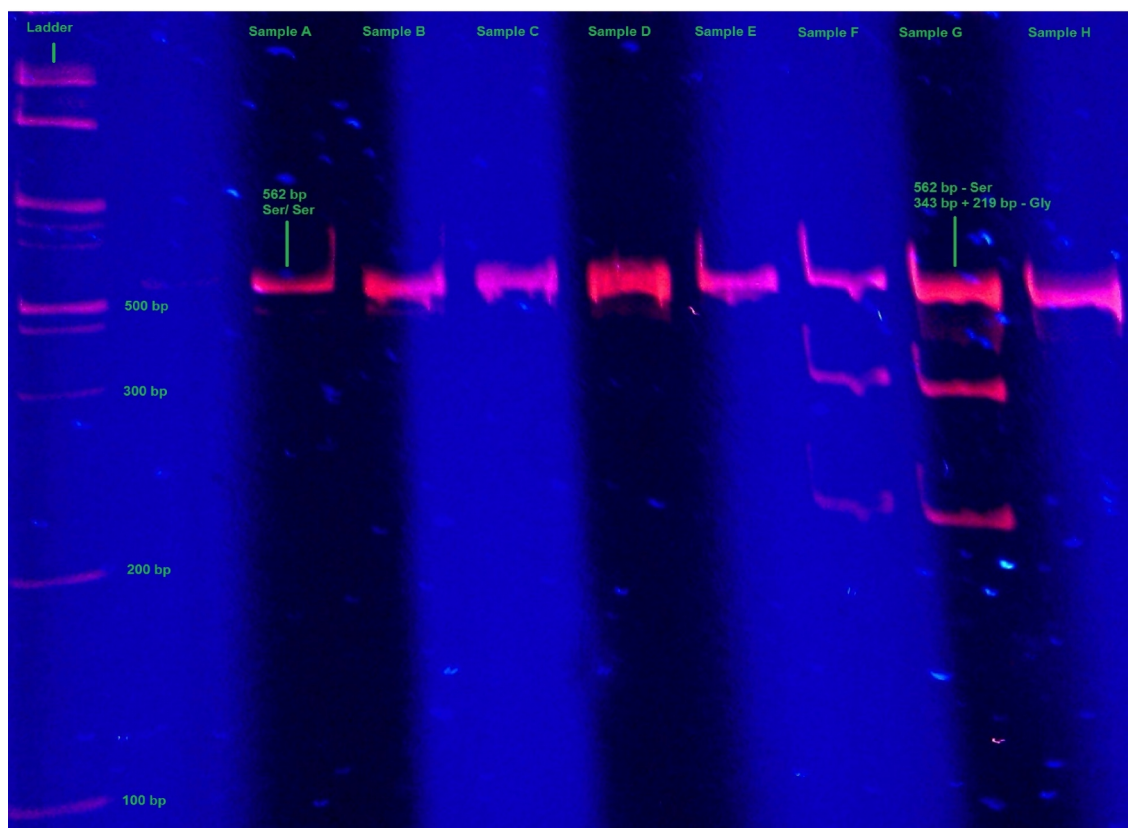
### 5.2.1.2 Ispitivanje genskog polimorfizma na 49 na genu za $\beta_1$ receptor

Polimorfizam Ser49Gly na  $\beta_1$  adrenergičkom receptoru detektovan je metodom RFLP. Amplifikat veličine 562 bp dobijen je uz pomoć prajmera čija je sekvenca prikazana u tabeli (Tabela).

Lančano umnožavanje gena vršeno je pod sledećim uslovima: inicijalna denaturacija na 95°C- 2 minuta, praćena sa 39 ciklusa denaturacije na 95°C- 15 sec, anilingom na 65°C-30 sec, elongacijom na 72°C-30 sec i terminacijom na 72°C- 30 sec. Dobijeni amplifikat je nakon provere na agaroznom gelu (na isti način kao za predhodni polimorfizam) podvrgnut restriktivnoj digestiji (restrikcioni enzim ECO0109, Thermo Fischer, USA). Nakon digestije dobijeni fragmenti su detektovani na vertikalnoj elektroforezi na 8% PAGE.

Nakon digestije mogla su da se vizuelizuju tri genotipa Ser49Gly polimorfizma (Slika 22 )

1. Ser/Ser, homozigot A/A, jedan fragment 562 bp,
2. Ser/Gly, heterozigot A/G, 3 fragmenta od 562 bp, 343bp i 219 bp,
3. Gly/Gly, homozigot G/G: sa dva fragmenta od 343 i 219 bp.

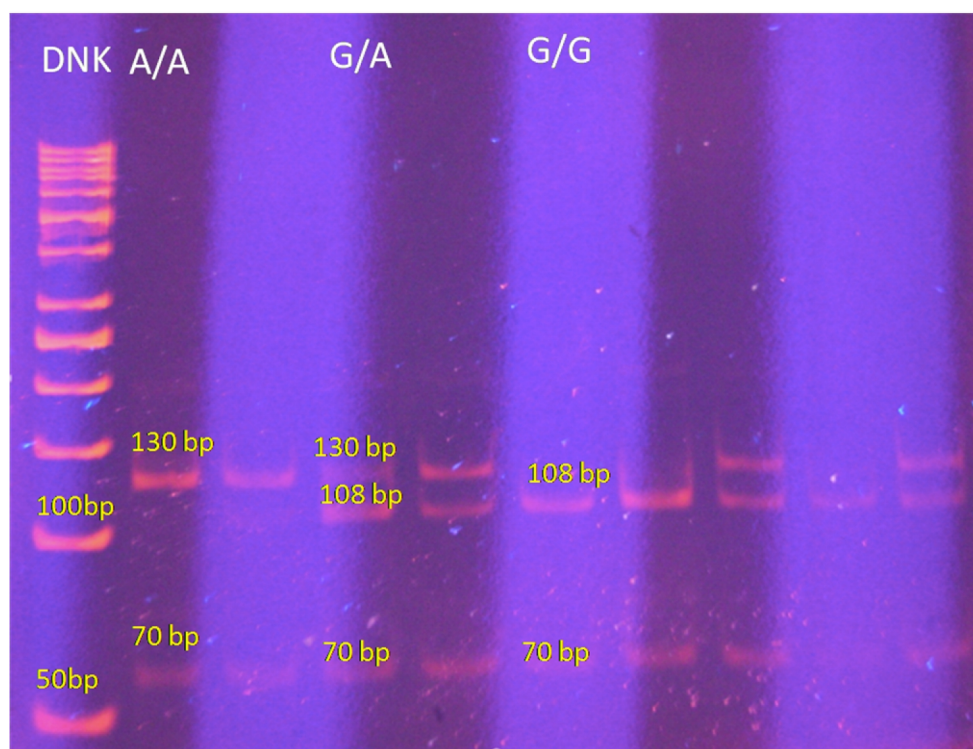


Slika 22. Prikaz digestije na 8% akrilamid gelu  
Kolona 1 100 bp ladder; kolona 2 Ser/Ser, homozigot A/A, jedan fragment 562 bp, Ser/Gly, heterozigot A/G, 3 fragmenta od 562 bp, 343bp i 219 bp

### 5.2.1.3 Ispitivanje polimorfizma Gly16Arg (rs1042713) na genu za $\beta_2$ adrenergički receptor

Detekcija polimorfnog gena za  $\beta_2$  receptor Gly16Arg izvršena je takođe metodom RFLP uz pomoć restriktivnog enzima BsrDI (Fermentas). Umnožavanje dela gena koji sadrži ovaj polimorfizam je izvršeno u prisustvu nishodnog (sens) 5'-CTTCTTGCTGGCAGCAAT-3' I ushodnog (antisens) 5'-CCAGTGAAGTGA TGAAGTAGTTGG-3. PCR amplifikat je bio veličine 200 bp, a temperaturni profil (35 ciklusa (95°C 2 min, 95°C-15 sec, 56°C 15 sec min, 72° C 15 sec i 72°C 30 sec min). Nakon provere amplifikata na agaroznom gelu

izvršena je digestija pomoću *BsrDI* na 65° C (Gly16 alel se karakteriše sa dva benda od 130 i 70 bp; Arg16 alel se detektuje pomoću 3 benda na 22, 108, i 70 bp).



Slika 23. Prikaz digestije na 8% akrilamid gelu: Kolona I DNK standard 50 bp; A/A, Gly16 alel (dva benda od 130 i 70 bp); G/A Gly16Arg heterozigot; G/G, Arg16 alel (3 benda na 22, 108, i 70 bp).

#### 5.2.1.4 Ispitivanje genskog polimorfizma na (-308G/A) na genu za TNF- $\alpha$

Fragment od 117 baznih parova amlifikovan je korišćenjem ushodnog (5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3') i nishodnog (5'-ACACTCCCCATCCTCCCTGCT-3') prajmera. Reakciona smeša zapremine 25 ml sastojala se iz: 2,5 ml 10x PCR reakcionog pufera (150 mM TRIS-HCl, pH 8,0, 500 mM KCl), 8 $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>, 0,5ml dNTP (10 mM), po 0,5 ml ushodnog i nishodnog prajmera (20 pmol/ml), 0,5  $\mu$ l HotStarTaq DNK polimeraze (Quiagen) i 10 ng DNK. Sve je dopunjeno ultračistom vodom do 25 ml.

Lančano umnožavanje gena vršeno je pod sledećim uslovima: inicijalan denaturacija na 95°C- 15 minuta, praćena sa 35 ciklusa denaturacije na 94°C- 1 minut, anilingom na 50°C-1 minut, elongacijom na 72°C i terminacijom na 72°C- 10 minuta.



#### **5.2.1.4.1 Elektroforeza na agaroznom gelu**

PCR amplikati proveravanisu elektroforezom na agaroznom gelu (2%). Gel je pripreman tako što je 1,2g agaroze (Applichem, GmbH, Darmstadt, Nemačka) rastvoreno u 60 ml 1x TBE pufera (0,89 M Tris- HCL, 0,89 M borna kiselina, 0,5M EDTA pH 8,0). Isti pufer korišćen je za elektroforezu pod sledećim uslovima: jačina struje 100 mA, napon 100 V, vreme 30 min. DNK ladder (100 bp) korišćen je za detekciju veličine fragmenata. Nakon završene elektroforeze gel je bojen 30 minuta u smeši 20 µl etidijum bromida i 200 ml TBE, nakon čega je vršena vizuelizacija DNK fragmenata pod UV zracima.

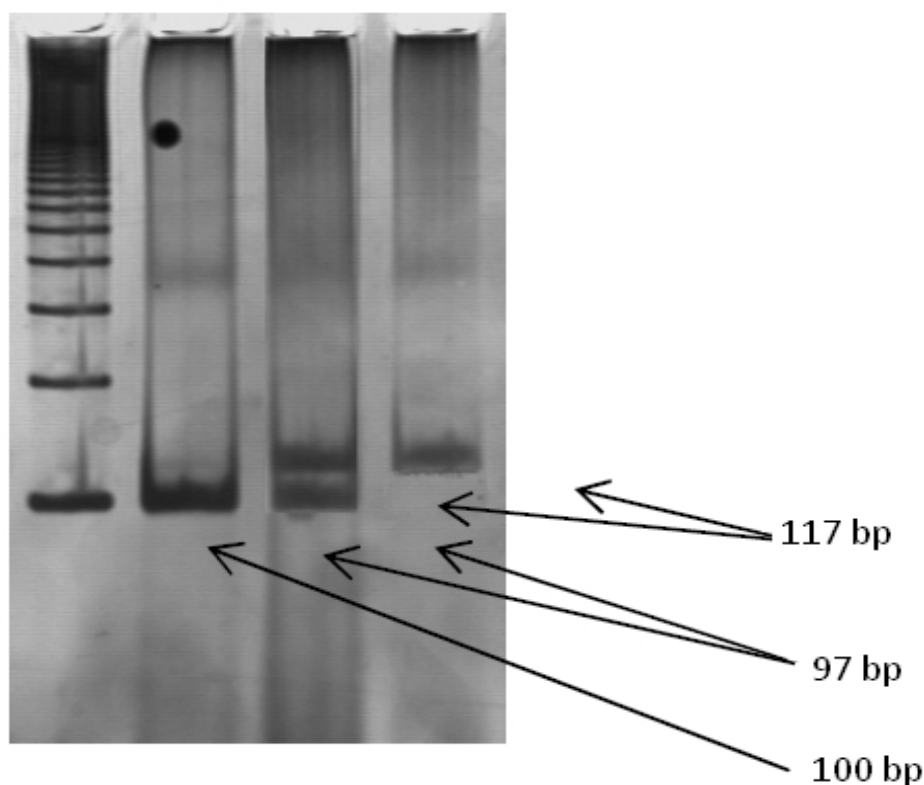
#### **5.2.1.4.2 Digestija dobijenih PCR produkata**

Nakon potvrđene amplifikacije na agaroznom gelu, PCR amplikati su metodom restriktivn edigestije, uz pomoć restriktivnih endonukleaza, isecani na manje fragmente, zavisno od prisustva polimorfizma restriktionog mesta. Reakciona smeša finalne zapremine 20 µL sadržala je: 2µL pufera Tango, 1 U µl *NcoI* enzima (Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Nemačka) i 15 µL PCR amplikata I dd H<sub>2</sub>O do finalne zapremine. Digestija je vršena u vodenom kupatilu na 37°C u toku noći.

#### **5.2.1.4.3 Vizuelizacija dobijenih produkata digestije**

##### *5.2.1.4.3.1 Identifikacija fragmenata za TNFα-308G/A*

Nakon završene digestije, dobijeni DNK fragmenti identifikovani su na vertikalnom forezom na 8% poliakrilamid gelu. Gel je pripreman na sledeći način: 2,66 ml 30% akrilamidnog rastvora (29:1 akrilamid:N’N’metilen-bisakrilamid u vodi); 1ml 10x TBE pufera (0,89 M Tris-HCl, 0,89 M borne kiseline i 0,5 M EDTA pH 8,0); 6,13 mL dd H<sub>2</sub>O. Neposredno pre nalivanja gela dodati su inicijatori polimerizacije: 100µl 10% amonijumpersulfata i 10µL TEMED-a (N,N,N’,N’- tetrametilenetilen-diamin). Elektroforeza je izvedena u 1x TBE pod sledećim uslovima: jačina struje – 20 mA, napon - 120 V, vreme 80 min. Nakon završene elektroforeze, gel je ostavljen 30 minuta u smeši etidijum bromid i 1xTBE (0.5µg/ µL), nakon čega je vršena vizualizacija DNF fragmenata pod UV zracima.



Slika 24. Prikaz digestije na 8% akrilamid gelu

Kolona 1 100 bp ladder; kolona 2 wild tip (97 bp i 20 bp koji se ne vidi), kolona 3 heterozigot G/A (117 bp, 97 bp i 20 bp koji se ne vidi na gelu); kolona 4 homozigot A/A (117 bp)

Nakon digestije mogla su da se vizuelizuju tri genotipa TNF $\alpha$ -308 promotornog polimorfizma (Slika 24):

- homozigot GG, sa vizuelizacijom dva fragmenta, 97 i 20 bp,
- heterozigot GA, sa prisustvom 3 fragmenta od 97 bp, 20 bp i 117 bp,
- homozigot AA: sa samo jednim fragmentom od 117 bp.

### 5.2.2 Određivanje koncentracije beta blokatora HPLC metodom

Koncentracije karvedilola i bisoprolola određivane su standardnom metodom visokoefikasne tečne hromatografije (HPLC) sa fluorescentnim detektorom, po prethodno opisanoj metodi (422; 423). Uzorkovanje krvi je vršeno u ravnotežnom stanju pri kraju doznog interval ili pri maksimalnoj koncentraciji leka u plazmi. Za svaku analizu neophodno je bilo obezbediti 200  $\mu$ l plazme. Primenjenom metodom ostvarena je granica detekcije leka u plazmi od 0.3 ngml<sup>-1</sup>, odnosno granica kvantifikacije od 1.0 ngml<sup>-1</sup>. Sva merenja izvršena su na HPLC aparatu/instrument, Agilent 1200 i primenom kolone Zorbax SB-C18 (150 $\times$ 4.6 mm; 3.5  $\mu$ m; Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

### 5.3 Statistička obrada podataka

Učestalost alela i genotipova u zdravoj populaciji i grupi pacijenata analizirana je i komparirana pomoću  $\chi^2$  ili Fisherovog testa, kao i eventualno odstupanje od očekivanih vrednosti Hardy Weinbergovog equilibriuma za pacijente i kontrolu.

Frekvencija alela izračunavana je po formuli:

(2x frekvencija homozigota+1x frekvencija heterozigota): 2x broj svih pacijenata.

Atributivni parametri su predstavljeni učestalostima i procentualno, a kontinualni (merljivi) parametri su predstavljeni srednjim vrednostima ( $\bar{x}$ ) i standardnim devijacijama (SD), ili medijanom (Md). Studentovim t-testom nezavisnih uzoraka (pri normalnim raspodelama) i Mann-Whitney U testom (pri raspodelama parametara koje odstupaju od normalne) vršeno je testiranje statističke značajnosti razlike vrednosti kontinualnih parametara između dveju grupa.

Povezanost kontinualnih veličina utvrđvana je Pearsonovim koeficijentom linearne korelacije (r) pri normalnim raspodelama, odnosno Spearmanovim koeficijentom korelacije ranga (ρ) pri parametrima čija raspodela odstupa od normalne. Korelacije ispitivanih parametara ocenjuju se kao:

- niska: r=0,10 do 0,29
- umerena: r=0,30 do 0,49 i
- visoka: r=0,50 do 1,00

Za uticaj prediktorskih varijabli na pojavu zavisne kategorijske ili kontinuirane varijabile korišćena je binarna linearna logistička regresija, odnosno standardna višestruka linearna regresija. Kod statistički značajnih modela predviđanja, jedinstven doprinos svake od nezavisnih varijabli prikazan je kao “odd ratio”.

Statistička obrada rezultata urađena je primenom SPSS programa za statistiku (verzija 15,0; SPSS; INC., Chicago, IL, USA).

### 5.4 Populaciona farmakokinetika

Populaciona farmakokinetika (PFK) je studija uzroka varijabilnosti koncentracija leka kod osoba (bolesnika ili zdravih dobrovoljaca) koji primaju klinički relevantne doze leka koji se ispituje (424). Populacioni prilaz se razvio u pokušaju da se prevaziđu problemi primene lekova sa malom terapijskom širinom i velikom interindividualnom varijabilnošću u terapijskom odgovoru. Iako je primarno orjentisana ka farmakokinetici (FK), populaciona analiza se vremenom proširila i na toksikokinetiku (TK),

toksikodinamsko (TD) i farmakokinetičko/farmakodinamsko modeliranje (FK/FD). Za razliku od klasične FK analize gde se ispitivanja vrše u homogenoj, maloj grupi zdravih dobrovoljaca ili pacijenata, uz učestalo uzorkovanje biološkog materijala, u populacionoj FK analizi pojedinac nije centar ispitivanja, već se teži dobijanju populacionog profila leka kroz ispitivanje heterogene grupe pacijenata, sa malim brojem uzoraka od svakog od njih (425). Kako se koriste podaci iz kliničke prakse, ispitivanja, osim što su obimna, teška su za kontrolu zbog različitih demografskih i patofizioloških karakteristika pacijenata. U poređenju sa klasičnim, populacioni pristup je medicinski i ekonomski opravdaniji jer se podaci za analizu prikupljaju prilikom rutinske kontrole pacijenata (426). Veoma je važno naglasiti da poznavanje populacione kinetike pruža mogućnost postavljanja inicijalnog režima doziranja leka, i daje preporuku za prilagođavanje režima doziranja individualnim potrebama bolesnika na osnovu željenog farmakodinamskog odgovora (425).

Populaciona-model zavisna analiza podrazumeva postojanje jednog modela za celu populaciju (populacioni model), na osnovu koga se dobijaju populacione vrednosti FK parametara, kao i stepen njihove varijabilnosti unutar populacije (interindividualna varijabilnost). Osim toga mogu se dobiti podaci od varijabilnosti ispitivanih parametara unutar svakog ispitanika ponaosob (intraindividualna ili rezidualna varijabilnost) i karakterističnoj povezanosti fizioloških/patofizioloških karakteristika pacijenata i FK parametra, čime se objašnjava varijabilnost FK parametara i smanjuje procenat interindividualne varijabilnosti nepoznatog uzorka u FK parametrima (425). Populaciona analiza se zasniva na:

- dobijanju klinički relevantnih podataka o FK leka u ciljnoj populaciji ispitanika,
- izračunavanju populacione vrednosti FK parametara,
- utvrđivanju izvora i stepena interindividualne varijabilnosti koja utiče na FK leka, i
- utvrđivanju stepena intraindividualne varijabilnosti (427).

PK analizu čine tri povezana koraka: prvi, prikupljanje podataka potrebnih za analizu u ciljnoj populaciji, drugi, razvijanje modela i treći, validacija konačnog modela. Nakon što se definiše ciljna populacija i odredi broj ispitanika, prikupljaju se željeni podaci i to: telesna masa, telesna visina, starost, pol, dužina primanja leka koji se ispituje, dozni režim i ukupna dnevna doza leka, vreme uzimanja poslednje doze i koterapija. Nakon toga sledi razvijanje PFK modela. To je složen proces koji uključuje određivanje osnovnog modela koji opisuje dati farmakokinetički parametar i seriju međukoraka u kojima se ispituje uticaj navedenih demografskih faktora i faktora vezanih za lek (kovarijante).

Konačni populacioni model treba tačno da definiše matematičku jednačinu koja pokazuje povezanost farmakokinetičkog parametra sa ispitivanim kovarijantama. Prema tome, populacioni model se sastoji od tri dela: strukturalnog (koji opisuje osnovne FK parametre leka), kovarijantnog (opisuje uticaj demografskih i ostalih karakteristika na FK parametre) i statističkog (opisuje dva nivoa varijabilnosti: interindividualnu odstupanja individualnih od populacionih vrednosti FK parametara i intraindividualnu – odstupanja merenih koncentracija od individualnih predviđenih) (429). Na kraju se radi validacija, procena predvidljivosti konačnog modela, novom grupom podataka. Validacije ima za cilj da proveriti da li je konačan model dobro opisao validacioni set podataka u smeru njegovog ponašanja i predložene primene (424).

Jedan od tri osnovna statistička pristupa u populacionoj analizi je nelinearno modelovanje kombinovanih efekata (*“NONlinear Mixed Effect Modelling Approach”*-NONMEM) koje su u farmakokinetiku uveli 1979. godine Lewis B. Sheiner i Stuart L. Beal (Sheiner LB, 1980, J Pharmacokinet Biopharm). Ovaj programski paket se danas najčešće koristi i napisan je Fortran programskom jeziku (424). Suština NONMEM programa je set subrutina povezanih sa subrutinom koja definiše izvršni fajl. Softver sadrži veliku biblioteku subrutina za definisanje modela za farmakokinetičku primenu nazvanu PREDPP (*PRED Population Pharmacokinetics*); PRED je subrutina NONMEM programa, koja je dobila naziv od „prediction for observation“ jer izračunava vrednosti opservacija na osnovu matematičkog modela. Postojeći modeli mogu se modifikovati, a modeli koji nisu uključeni u biblioteku mogu se definisati od strane korisnika (424)

Cilj nelinearnog modelovanja kombinovanih efekata jeste identifikacija, određivanje i uključivanje kovarijanti u konačan populacioni model koji će na najbolji način opisati farmakokinetički parametar. Konačni populacioni model mora da obezbedi dobru prediktivnu snagu za buduće opservacije. Naziv kombinovani efekti (eng. mixed effect) potiče od dva nivoa efekata: stalni, fiksni (eng. fixed effect) i slučajni (eng. random effect), koji mogu da utiču na vrednosti FK parametara (424, 425). Stalni, fiksni efekti su oni koji imaju samo jednu vrednost parametra (to je prosečna, tipična, populaciona vrednost parametra), dok slučajni imaju raspon vrednosti i slučajnu distribuciju vrednosti parametra (npr. slučajna varijabilnost vrednosti parametara modela ima distribuciju gde je srednja vrednost distribucije jednaka 0, i okarakterisana je standardnim devijacijama tj. varijansama i kovarijansama) (425). Ukoliko je distribucija parametara populacionog modela poznata ili unapred zadata u pitanju je parametarski populacioni pristup, a u suprotnom govorimo o neparametarskom ili semiparametarskom pristupu (427). Parametri

stalnih efekata određuju populacionu vrednost FK parametra (koja se označava sa npr. TVCL – typical value of CL, TVV - typical value of Vd) (427), kao i povezanost srednje vrednosti FK parametra sa faktorima koji su prepoznati da u najvećoj meri utiču na vrednost FK parametara leka kod pojedinca. Ti faktori (eng. concomitant factors, eng. covariates) mogu biti:

- demografski (godine, pol, telesna masa, rasa),
- spoljašnji (pušenje, alkohol, dijeta),
- fiziološki/patofiziološki (trudnoća, oboljenja gastrointestinalnog trakta, jetre, bubrega, ostale akutne i hronične bolesti),
- kombinovana terapija,
- genetički (usled polimorfizma pojedinih izoenzima CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19) i
- ostali (ishrana, biološki ritmovi, formulacija preparata, komplijansa –eng. *compliance, adherence*) (428).

Prema tome, fiksni efekti su deo eksperimentnog dizajna i pod kontrolom su istraživača.

Slučajni efekti predstavljaju varijabilnost nepoznatog uzroka koja neminovno postoji i koja se izražava u vidu slučajnog efekta - parametri slučajnih efekata. Postoje dva nivoa slučajnih efekata: interindividualni (eng. interindividual, intersubject, between-subject variability) i intraindividualni (eng. intraindividual, intrasubject, within-subject, residual variability). Interindividualna slučajna varijabilnost, predstavlja stepen varijabilnosti u vrednostima FK parametara među ispitanicima i može da posluži kao koristan pokazatelj bezbednosti leka. Intraindividualna slučajna varijabilnost predstavlja razliku između izmerene koncentracije leka u krvi i stvarne koncentracije za pojedinca, a javlja se usled greške prilikom merenja (eng. measurement error), usled nepoštovanja protokola ispitivanja ili pogrešno odabranog modela za opis podataka (model misspecification error) (425).

#### **5.4.1 Populaciona farmakokinetička analiza bisoprolola i karvedilola**

Za populacionu farmakokinetičku analizu bisoprolola i karvedilola korišćen je NONMEM programski paket (verzija 5, nivo 1.1). Analiza je obavljena na Katedri za farmakologiju Medicinskog fakulteta u Kragujevcu. Za populacionu farmakokinetičku studiju bisoprolola prikupljeni su podaci dobijeni od 78 pacijenta sa SI koji su bili

podeljeni u dve grupe: prva grupa od 61 pacijenta za za izgradnju modela i druga, 17 pacijenta za validaciju. U drugoj grupi pacijenta koji su lečeni karvedilolom uključeno je ukupno 64 pacijenta sa SI.

Prva faza populacionog FK modelovanja sastojala se u definisanju baznog modela. Iz NONMEM biblioteke izabrana je ADVAN 1 subrutina za populacionu FK analizu bisoprolola a ADVAN2 TPAHC2 subrutina karvedilola. Prva subrutina opisuje model sa jednim odeljkom, bez apsorpcije (430), dok se u slučaju druge radi o jednodimenzionalnom modelu sa apsorpcijom prvog reda. Apsolutna bioraspodivnost za oba leka nije određena jer su sve doze date oralno. Krv je uzorkovana u stanju ravnoteže na kraju doznog intervala ili kada su postignute maksimalne koncentracije. Imajući u vidu da je kod većine pacijenata uzorkovanje krvi vršeno na kraju doznog intervala, nije utvrđena konstanta brzine resorpcije karvedilola ( $k_a$ ). Uzeta je vrednost iz literature,  $0.81\text{h}^{-1}$  (431). U izgradnji baznog modela razmatrani su izabrani stalni efekti modela i određena je interindividualna i intraindividualna varijabilnost u ispitivanoj populaciji. Interindividualna varijabilnost i rezidualna greška izmerenih koncentracija ispitivane su preko modela eksponencijalne i aditivne greške.

U drugoj fazi je univarijantnom selekcijom utvrđen značaj pojedinačnih varijabli. Testirane su sledeće kovarijante za bisoprolol: telesna masa, starost, pol dnevna doza bisoprolola, komedikacija amjodaronom (kao slabog inhibitora CYP2D6), ACEi, spirinolaktone ili furosemida, holesterol, klirens kreatinina, EF i genetski polimorfizam CYP2D (heterozigoti  $-wt/*4$  i homozigoti  $-*4/*4$ ). U populacionoj PF analizi karvedilola razmatran je značaj varijabli kao što su: telesna masa (TM), starost, pol, dnevna doza karvedilola, ejakciona frakcija, genski polimorfizam CYP2D6 ( $wt/*4$ ), pušenje i komedikacija sa digoksinom, amjodaronom, varfarinom, aminofilinom i inhibitorom protonске pumpe. Za svaki parametar je utvrđen minimum objektivne funkcije (MOF) u modelu koji se definiše kao negativni dvostruki logaritam verovatnoće podataka (430). Kovarijante su posebno testirane, linernom ili nelinernom regresijom baznog modela. Uticaj varijabile je smatran značajnim ukoliko su ispunjeni svi sledeći kriterijumi: redukcija u minimumu objektivne funkcije (MOF) koji iznosi 3.841, uz prvi stepen slobode ( $p < 0.05$ ), redukcije interindividualne i rezidualne varijabilnosti, poboljšanje distribucije podataka postavljenim na grafikonima koji pokazuju odnos između predviđenih (PRED) i izmerenih (DV) koncentracija leka kao i između vrednosti korigovane razlike (WRES) i predviđenih koncentracija (PRED) leka. Samo oni faktori koji su ispunili ove kriterijume su simultano uključeni u puni model.

Formiranje konačnog modela zahtevalo je proces unazadne delecije kovarijanti koje su činile pun model, uz strožije statističke zahteve. Za svaku ispitivanu kovarijantu potrebna redukcija u MOF-u je iznosila 6.6 za df 1, p manje od 0.01. Samo kovarijante koje su ispunile ovaj uslov zadržane su iz punog modela i formirale su finalni FK model.

Treću fazu PFK predstavljala je validacija finalnog populacionog modela - proces koji je bio neophodan za potvrdu predvidljivosti konačnog modela. Pouzdanost dobijenog modela je potvrđena izračunavanjem grešaka u predviđanju: srednje greške u predviđanju - MPE; srednje statističke greške - MSPE i rezidualne srednje greške predviđanja - RMSE).



## 6 REZULTATI

Naše istraživanje obuhvatilo je 216 pacijenata sa SI i 82 zdrava ispitanika čije su demografske i kliničke karakteristike najpre analizirane. Ispitanici studijske grupe bili su prosečne starosti 63,98±11,39 godina (95% CI: 62.44-65.53). U ispitivanoj grupi bilo je značajno više muškaraca (n=159, 73,6%) nego žena (n=57, 26,4%). U ispitivanoj grupi bilo je najviše nepušača 114 (55,1%) u odnosu na pušače 54 (26,1%) i bivše pušače 39 (18,8%).

Ishemijska bolest srca je bila prisutna kod 152 pacijenta (84%), sa jednakom zastupljenošću kod muškaraca (82.1%) i kod žena (82.8%). Kod žena je dijabetes bio češći (54.6%). Demografske i kliničke karakteristike ispitivanih pacijenata prikazane su u tabelama 4 i 5.

Tabela 4. Demografske i kliničke karakteristike ispitivane grupe

	<b>Muškarci N (%)</b>	<b>Žene N (%)</b>	<b>Ukupno N (%)</b>
<b>IBS</b>	110 (82.1)	24 (82.8)	152 (84.0)
<b>Diabetes</b>	57 (37.3)	30 ( <b>54.6</b> )	87 (41.8)
<b>Pušački status (pušači/nepušači)</b>	47 (44.33)	7 ( <b>12.9</b> )	54 (33.8)
<b>EF</b>			
• < 20%	11 (8.50)	3 (5.9)	14 (7.7)
• 20-30%	38 (29.2)	14 (27.5)	52 (28.7)
• 30-40%	58 (44.6)	20 (39.2)	78 (43.1)
• >40%	23 (17.7)	14 (27.5)	37 (20.4)
<b>Ritam</b>			
• Sinusni	95 (79.2)	34 (72.3)	129 (77.2)
• Atrijalna fibrilacija	18 (15.0)	13 (27.7)	31 (18.6)
• Pejsmejker	7 (5.8)	0	7 (4.2)
<b>Terapija</b>			
• Beta blokator			
• ACEi/ARA	117 (73.6)	41 (73.2)	158 (73.5)
• Diuretik HP	124 (78.0)	41 (71.9)	165 (76.4)
• Tiazidni diuretik	19 (12)	10 (18.2)	29 (13.6)
• Nitrati	34 (21.4)	17 (29.8)	51 (23.6)
• Nenitratni vazodilatatori	<b>34 (21.4)</b>	<b>20 (35.1)</b>	54 (25.0)
• Antiaritmici	41 (25.8)	8 (14.0)	49 (22.7)
• Statini	103 (65.6%)	34 (59.6)	137 (64.0)
• Acetilsalicilna kiselina	113 (71.1)	44 (77.2)	157 (72.7)
• Antikoagulansi	53 (34.2)	18 (33.3)	77 (34.0)
• Klopidoogrel	36 (23.1)	12 (22.2)	48 (22.9)

Tabela 5. Demografske i kliničke karakteristike ispitivane grupe

		<b>N</b>	<b>X ± SD</b>		<b>t</b>
<b>SF</b>	<i>Muškarci</i>	133	74.68	18.35	-0.299
	<i>Žene</i>	47	75.34	10.33	
<b>Krvni pritisak</b>					
• <b>sistolni</b>	<i>Muškarci</i>	136	125.50	16.63	<b>-2.714</b>
	<i>Žene</i>	50	137.10	28.49	
• <b>dijastolni</b>	<i>Muškarci</i>	136	76.51	8.78	<b>-2.301</b>
	<i>Žene</i>	50	81.00	12.74	
<b>Ehokradiografija</b>					
• <b>EFLK (%)</b>	<i>Muškarci</i>	130	34.84	8.83	-1.549
	<i>Žene</i>	51	37.20	10.13	
• <b>EDD (mm)</b>	<i>Muškarci</i>	88	63.06	8.55	<b>3.769</b>
	<i>Žene</i>	33	56.64	7.74	
• <b>ESD (mm)</b>	<i>Muškarci</i>	98	48.92	10.09	<b>4.008</b>
	<i>Žene</i>	37	41.28	9.26	
• <b>LPK (mm)</b>	<i>Muškarci</i>	94	48.03	8.14	1.657
	<i>Žene</i>	40	45.58	7.02	
• <b>SPDK (mmHg)</b>	<i>Muškarci</i>	68	36.98	13.24	-.497
	<i>Žene</i>	29	38.48	14.44	
<b>Holesterol</b>					
• <b>LDL (mmol/)</b>	<i>Muškarci</i>	90	2.53	1.10	-.008
	<i>Žene</i>	33	2.54	1.15	
• <b>HDL (mmol/)</b>	<i>Muškarci</i>	78	1.19	.50	<b>-2.555</b>
	<i>Žene</i>	30	1.49	.63	
<b>Trigliceridi (mmol/)</b>	<i>Muškarci</i>	135	1.59	1.17	-1.869
	<i>Žene</i>	52	2.18	2.14	
<b>Hb g/L</b>	<i>Muškarci</i>	65	134.34	20.48	<b>2.187</b>
	<i>Žene</i>	25	123.08	25.23	
<b>AST (U/l)</b>	<i>Muškarci</i>	66	42.14	60.87	1.268
	<i>Žene</i>	25	26.54	11.71	
<b>ALT (U/l)</b>	<i>Muškarci</i>	66	35.87	33.97	<b>3.166</b>
	<i>Žene</i>	25	21.30	9.63	
<b>Kreatinin μmol/l</b>	<i>Muškarci</i>	118	117.94	77.15	<b>3.789</b>
	<i>Žene</i>	51	83.85	39.43	
<b>Klirens kreatinina ml/min</b>	<i>Muškarci</i>	99	63.09	37.07	1.936
	<i>Žene</i>	34	51.66	26.69	

Kod većine pacijenata je dijagnostikovana sistolna ili sistolno-dijastolnu srčana slabost (146 (78.9%), dok je dijastolnu SI imalo 39 pacijenata (21.1%). Većina pacijenata u našem ispitivanju je bila NYHA klase II, 94 (51,1%), trećina ispitanika pacijenata NYHA III klase 58 (31.5%), dok je I klasu imalo 32 (17.4%). U tabeli 3. prikazana je klasifikacija bolesti kod naših ispitanika na osnovu EF i terapije.

Tabela 6. Osnovni SI status pacijenata na osnovu EF i terapije

Vrednost EF	< 20% N (%)	21-30% N (%)	31-40% N (%)	> 40%
NYHA I	1 (7.1%)	1 (2.1%)	13 (18.3%)	14 (41.2%)
NYHA II	2 (14.3%)	20 (41.7%)	43 (60.6%)	19 (55.9%)
NYHA III-IV	11 (78.6%)	27 (56.3%)	15 (21.1%)	1 (2.9%)
Terapija:				
• ACEi/ARA	9 (64.3%)	41 (78.8%)	66 (84.6%)	26 (70.3%)
• Diuretik	13 (92.9%)	47 (92.2%)	69 (89.6%)	22 (61.1%)
• Kardiotonički glikozidi	5 (35.7%)	18 (34.6%)	21 (26.9%)	2 (5.6%)
• Spirinolakton	12 (85.7%)	27 (51.9%)	34 (43.6%)	7 (18.9%)
• Svi nabrojani	3 (21.4%)	9 (17.3%)	11 (14.1%)	0 (0%)

Prospektivno smo pratili 70 pacijenata u periodu od  $34.80 \pm 3.25$  meseci. Hitnoj medicinsku pomoć je zatražilo 33 pacijenta (47.1%), najčešće zbog miokardne ishemije (41%) i pogoršanja srčane slabosti (27%). Od toga 72. pacijenta je dva ili više puta tražilo HMP bez razlike u polu. Kod žena koje su tražile HMP vrednosti EDD-a su bile statistički značajno veće ( $t=2.526$ ;  $p=0.021$ ).

U toku periodapraćenja rehospitalizovano je 53 (75.7%) pacijenta. U ovoj grupi podjednako su bili zastupljeni oba pola, bez statistički značajne razlike u starosti, etiologiji i funkcionalnoj klasi SI.

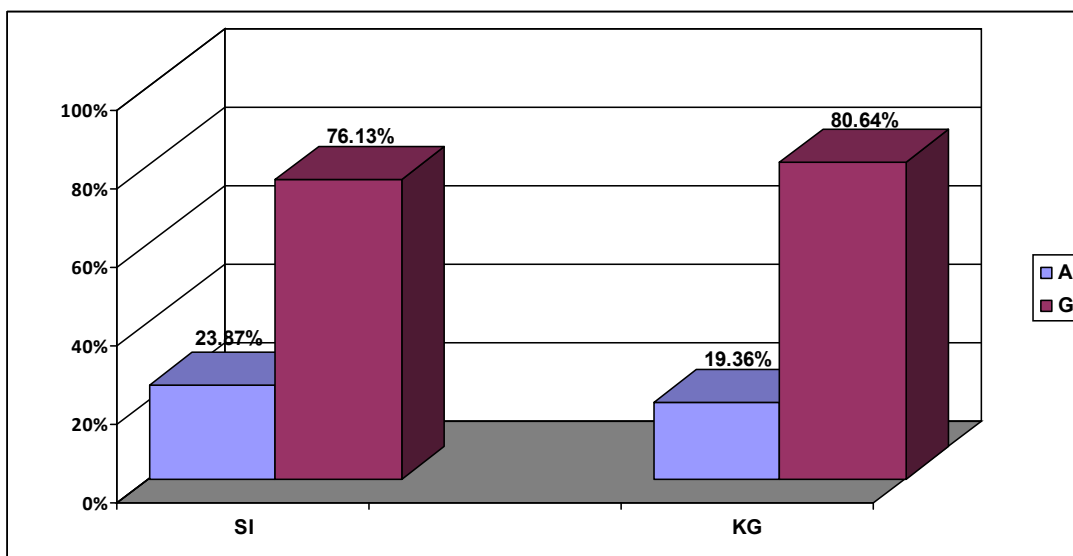
U ovom periodu je umrlo 13 pacijenata (18.57%), najčešće usled nagle srčane smrti (46.15%) i progresije srčane slabosti (30.76%). Pacijenti koji su umrli su u proseku bili 7 godina stariji ( $t= 2.294$ ;  $p=0.024$ ) u odnosu na preživjele.

## 6.1 Rezultati ispitivanja polimorfizma -308 G /A gena za TNF- $\alpha$

### 6.1.1 Polimorfizam -308 G/A gena za TNF- $\alpha$ : udruženost sa pojavom srčane insuficijencije

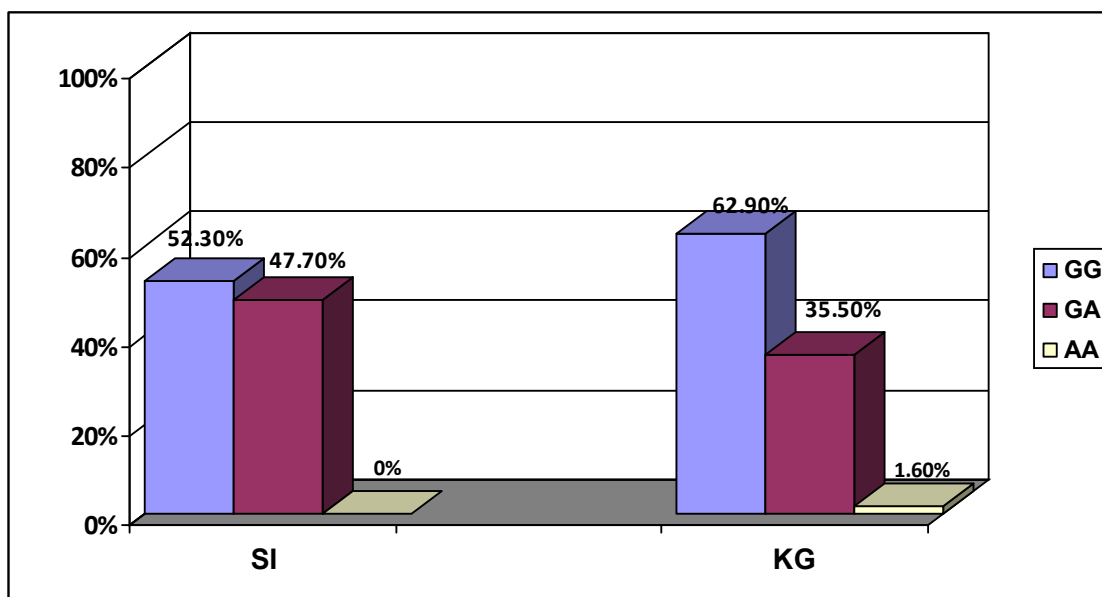
Ispitivanjem distribucije A alela između grupe pacijenata sa srčanom insuficijencijom (SI) i kontrolne grupe (KG), utvrdili smo da nema statistički značajne razlike. Alel A je bio zastupljen kod 21 (47.7%) pacijenta sa SI, i kod 24 (38.7%)

ispitanika kontrolne grupe. U obe grupe G alel je statistički značajno više zastupljen u odnosu na A alel ( $p < 0,001$ ). Učestalost A i G alela kod bolesnika sa SI ne pokazuje statistički značajnu razliku u odnosu na učestalost tih alela u KG (grafikon 1).



Grafikon 1. Prisustvo A i G alela polimorfnog gena za TNF- $\alpha$  (-308 G/A) u ispitivanim grupama

Učestalost genotipova -308 G/A polimorfizma gena za TNF- $\alpha$  ne odstupa od normalne raspodele Hardy-Weinberg ekvilibrijuma kod bolesnika ( $\chi^2=0.098$ ,  $p=0.952$ ) i kontrolne grupe ( $\chi^2=0.019$ ,  $p=0.991$ ). U obe grupe najčešći je homozigotni -308 G/G genotip (52.3% u SI i 62.9% u KG), sledi heterozigotni -308 G/A (47.7% u SI i 35.5% u KG), a najmanje je zastupljen homozigotni A/A genotip (0% u SI i 1.6% u KG). Nema statistički značajne razlike u distribuciji genotipova između SI i KG grupe ( $\chi^2=1.035$ ,  $p=0.596$ ).



Grafikon 2. Učestalost genotipova polimorfizma -308 G/A za TNF- $\alpha$  u ispitivanim grupama

Nije bilo statistički značajne razlike u distribuciji frekvencija genotipova prema polu u ispitivanoj grupi pacijenata ( $\chi^2= 2.460$ ,  $p= 0.169$ ). Iako je frekvencija A alela bila manja kod žena (14%) u odnosu na muškarce (28%), ta razlika nije bila statistički značajna ( $\chi^2=1.022$ ,  $p=0.312$ ). Rezultati su prikazani u tabeli 7.

Tabela 7. Distribucija genotipa i alela -308 G/A polimorfizma gena za TNF- $\alpha$  kod pacijenata u odnosu na pol

	<b>Muškarci</b> N (%)	<b>Žene</b> N (%)
<b>Frekvencija genotipova</b>		
GG	15 (45%)	8 (73%)
GA	18 (55%)	3 (23%)
AA	0 (0)	0
<b>Frekvencija alela</b>		
G	48 (72%)	18 (86%)
A	19 (28%)	3 (14%)

U tabeli 8 prikazana je starosna struktura podgrupa A i G. Nema statistički značajne razlike između A i G grupe u odnosu na pol i starost ( $t=0.442$ ,  $p=0.661$ ).

Tabela 8. Starost (godine) ispitanika A i G grupe.

Grupa	Starost $X \pm SD$	Md	95% CI
Grupa A N=21	59.71 $\pm$ 10.33	59.0	55.01-64.42
Grupa G N=23	61.13 $\pm$ 10.87	60.0	56.43-65.83

### **6.1.2 Polimorfizam -308 G/A gena za TNF- $\alpha$ : distribucija genotipova i alela prema kliničkim karakteristikama**

Da bismo utvrdili da li prisustvo određenog TNF-308G/A genotipa određuje kliničku prezentaciju bolesti, ispitivali smo razliku u distribuciji genotipova i alela unutar kliničkih podgrupa, napravljenih na osnovu težine kliničke slike, kao i primene određenog beta blokatora.

Ispitivanje zastupljenosti genotipova između grupa pacijenata sa različitom težinom bolesti pokazalo je veću učestalost mutiranog A alela i genotipa GA u grupi pacijenata sa

NYHA klasom I-II (58.1%), u poređenju sa grupom pacijenata sa NYHA klasom III (18.2%). Ta razlika bila je statistički značajna, ( $\chi^2=5.177$ ,  $p=0,035$ ).

Tabela 9. Frekvencija genotipa i alela u podgrupima pacijenata sa različitim NYHA klasom

	<b>NYHA I</b> N (%)	<b>NYHA II</b> N (%)	<b>NYHA III</b> N (%)
<b>Frekvencija genotipova</b>			
GG	4 (50.0%)	9 (39.1%)	9 (81.8%)
GA	4 (50.0%)	14 (60.9%)	2 (18.2%)
AA	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
<b>Frekvencija alela</b>			
G	75%	69.6%	
A	25%	30.4%	

Zastupljenost GA genotipa kod muškaraca sa težom kliničkom slikom (NYHA III) takođe je bila značajno veća u odnosu na pacijente muškog pola NYHA klase I-II,  $\chi^2=8.296$ ,  $p=0.010$ . Utvrđeno je da je rizik za razvoj teže forme kliničke slike bio 6.25 puta veći ( $p=0.034$ ) kod nosilaca GG u odnosu na nosioce GA genotipa. Na varijabilnost kliničke slike (pripadnost funkcionalnoj klasi) ispitivani genotip učestvuje između 12.3% (Cox and Snell  $r^2$ ) i 18.1% (Nagelkerke  $r^2$ ).

Tabela 10. Zastupljenost genotipa -308 G/A TNF- $\alpha$  kod pacijenata različite funkcionalne klase i pola

		<b>Muškarci</b> N (%)	<b>Žene</b> N (%)	<b>Ukupno N</b> (%)
<b>NYHA I-II</b>	<b>G/G</b>	7 (29.2)	6 (85.7)	13 (41.9)
	<b>G/A</b>	17 (70.08)	1 (14.3)	18 (58.1)
<b>NYHA III</b>	<b>G/G</b>	7 (87.5)	2 (66.7)	9 (81.8)
	<b>G/A</b>	1 (12.5)	1(33.3)	2 (18.2)

Između bolesnika sa sistolnom i sistolno-dijastolnom SI, u poređenju sa bolesnicima sa dijastolnom SI, nije bilo razlike u distribuciji genotipova -308G/A ( $\chi^2=0.396$ ,  $p=0.685$ ). Rezultati su prikazani u tabeli 11.

Tabela 11. Zastupljenost genotipa -308 G/A TNF- $\alpha$  kod pacijenata sa različitim tipom disfunkcije u odnosu na pol

	genotip	N (%)
<b>Sistolna i sistolno-dijastolna</b>	GG	19 (55.9)
	GA	15 (44.1)
<b>Dijastolna Disfunkcija</b>	GG	3 (42.9)
	GA	4 (57.1)

Kod bolesnika sa sistolnom SI, statistički značajno nižu ejectionu frakciju su imali nosioci GG genotipa ( $29.37 \pm 8.13$ ) u odnosu na nosioce GA genotipa ( $36.00 \pm 5.46$ ).

Tabela 12. Vrednosti ehokardiografskih parametara, srčane frekvence i arterijskog krvnog pritiska kod bolesnika sa različitim genotipom

		N	X	SD	t	p
<b>EF</b>	GG	19	29.37	8.13	-2.835	<b>0.008</b>
	GA	15	36.00	5.46		
<b>EDD</b>	GG	19	63.05	7.14	0.233	0.825
	GA	10	62.45	6.48		
<b>ESD</b>	GG	19	46.74	10.10	-0.582	0.565
	GA	10	48.86	7.59		
<b>LPK</b>	GG	18	46.61	7.27	0.116	0.908
	GA	10	46.30	5.77		
<b>SPDK</b>	GG	10	39.30	11.26	1.255	0.232
	GA	5	28.96	21.21		
<b>SF</b>	GG	19	75.58	14.65	-0.491	0.626
	GA	15	78.20	16.40		
<b>SistolniBP</b>	GG	19	123.68	20.06	0.003	0.998
	GA	15	123.67	14.70		
<b>DijastolniBP</b>	GG	19	74.74	9.35	-0.718	0.478
	GA	15	77.00	8.82		

U grupi pacijenata koji su primali karvedilol uporedili smo maksimalne dnevne doze leka između pacijenata sa različitim genotipom. Nosioci polimorfnog A alela su imali statistički značajno veće dnevne doze u odnosu na "divlji" tip ( $\chi=5.625$ ;  $p=0.048$ ). Kod pacijenata koji su uzimali bisoprolol nije bilo statistički značajne razlike u postignutoj dnevnoj dozi ovog beta blokatora u zavisnosti od genotipova.

### 6.1.3 Polimorfizam -308 G/A gena za TNF- $\alpha$ : uticaj na klinički tok bolesti

Ispitivanje uticaja genotipa na rehospitalizaciju je pokazalo da nema statistički značajne razlike u broju pacijenata koji su bili hospitalizovali u odnosu na genotip. Učestalost G alela u grupi rehospitalizovanih je (86%, u poređenju sa grupom pacijenata kod kojih nije bilo potrebe za ponovnim prijemom u bolnicu 81%. Ta razlika nije bila

statistički značajna,  $\chi^2=0.176$ ,  $p=0,675$ ). Nije bilo razlike ni u frekvenci genotipova između pacijenata sa i bez rehospitalizacije ( $\chi^2=0.216$ ,  $p=0,642$ ) (tabela 13). U ispitivanoj grupi nije bilo nosioca AA genotipa.

Tabela 13. Frekvencija genotipa i alela -308 G/A polimorfizma gena za TNF- $\alpha$  u grupi sa i bez rehospitalizacije

	<b>rehospitalizacija</b> N (%)	<b>Bez rehospitalizacije</b> N (%)
<b>Frekvencija genotipova</b>		
GG	5 (71.4%)	5 (62.5%)
GA	6 (28.6%)	3 (37.5%)
AA		
<b>Frekvencija alela</b>		
G	36 (86%)	13 (81%)
A	6 (14%)	3 (19%)

Među pacijentima koji su tražili hitnu medicinsku pomoć, veći broj bolesnika je bio nosilac GG genotipa (71.4%), ali ova razlika nije bila statistički značajna ( $\chi^2=1.768$ ,  $p=0,245$ ). Rezultati su prikazani u tabeli 14.

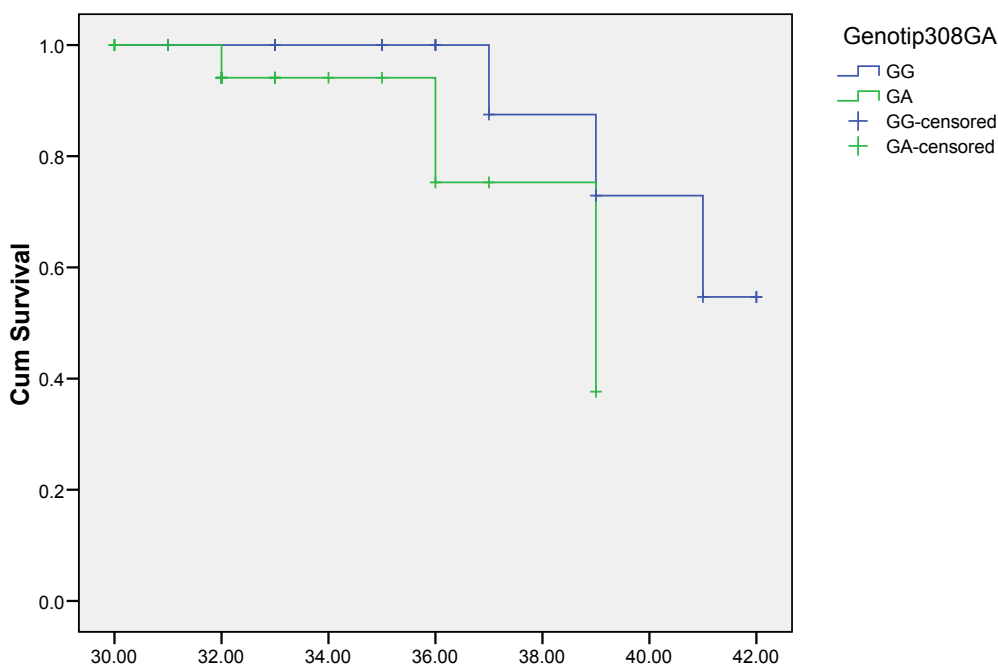
Tabela 14. Potreba za HMP kod nosioca različitog genotipova -308 G/A polimorfizma gena za TNF- $\alpha$

	<b>HMP</b> N (%)	<b>Bez HMP</b> N (%)
<b>Frekvencija genotipova</b>		
GG	8 (57.1)	12 (80.0)
GA	6 (42.9)	3 (20.0)
AA		
<b>Frekvencija alela</b>		
G	22 (78.6%)	27 (90.0%)
A	6 (21.4%)	3 (10.0%)

Pacijenti koji su uključeni u prospektivno istraživanje u proseku su praćeni 34,88 meseci  $\pm$  3.25. Od početka praćenja, ukupno je umrlo po 3 bolesnika sa genotipom GG (13.0%) i genotipom GA (14.3%), bez statistički značajne razlike u preživljavanju među genotipovima ( $\chi^2=2.193$ ,  $p=0,139$ ) (grafikon 3).



### Survival Functions



Grafikon 3. Uticaj polimorfizma -308 G/A gena za TNF  $\alpha$  na preživljavanje kod pacijenta sa SI

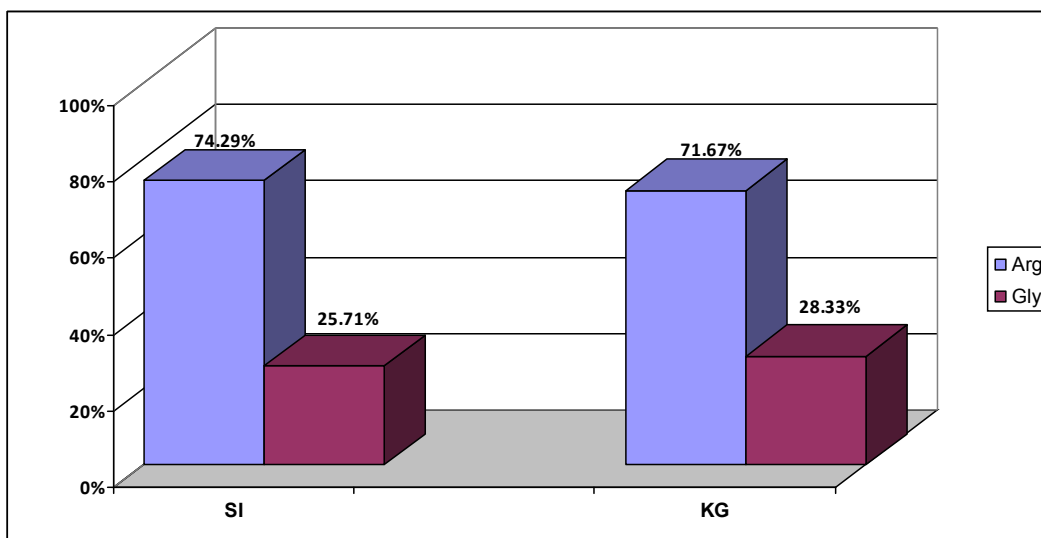
## 6.2 Rezultati ispitivanja Gly<sup>389</sup>Arg polimorfizma gena za $\beta_1$ receptor

### 6.2.1 Gly<sup>389</sup>Arg polimorfizam gena za $\beta_1$ receptor: udruženost sa pojavom srčane insuficijencije

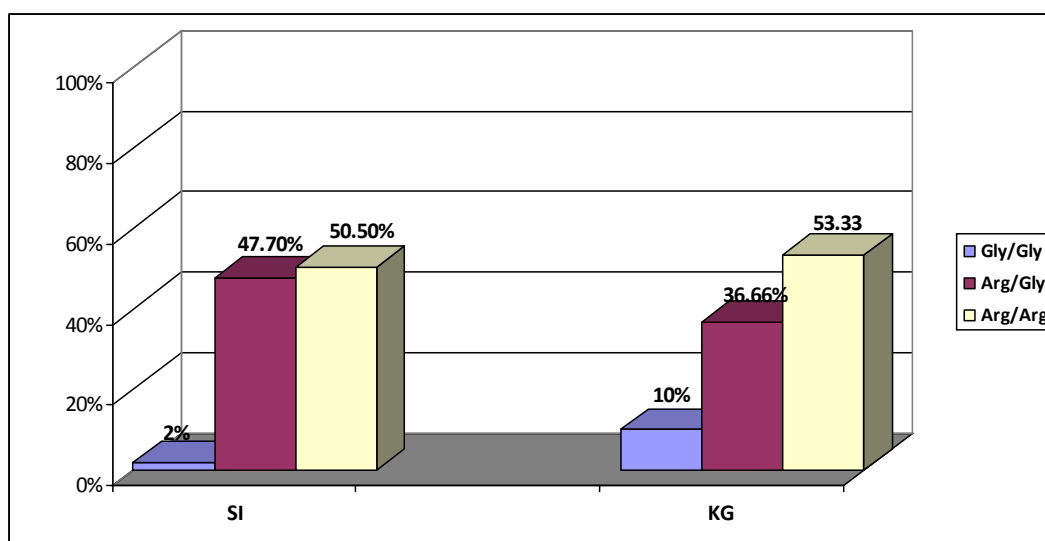
Upoređivanjem zastupljenosti Arg alela između grupe bolesnika sa srčanom insuficijencijom (SI) i ispitanika kontrolne grupe, utvrdili smo da nema značajne razlike u distribuciji ovog alela među grupama, iako je Arg alel zastupljeniji u ispitivanoj SI grupi ( $\chi^2=0.059$ ,  $p=0,808$ ). U grupi obolelih od SI, Arg alel je prisutan kod 74.3% bolesnika, a u KG u 71.7% ispitanika (Grafikon 4).

Učestalost genotipova Gly<sup>389</sup>Arg polimorfizam gena za  $\beta_1$  receptor nije se razlikovala između ispitivane i kontrolne grupe ( $\chi^2=2.718$ ,  $p=0.257$ ) (Grafikon 5)

Nije bilo statistički značajne razlike u distribuciji frekvencija genotipova i alela prema polu u ispitivanoj grupi pacijenata ( $\chi^2=0.690$ ,  $p=0.708$ ). Iako je frekvencija Gly alela bila veća kod žena (75.9%) nego kod muškaraca (73.8%), ta razlika nije bila statistički značajna ( $\chi^2=0.019$ ,  $p=0.890$ ). Rezultati su prikazani u tabeli 15.



Grafikon 4. Prisustvo Arg i Gly alela Gly<sup>389</sup>Arg polimorfizam gena za β<sub>1</sub> receptor u ispitivanim grupama



Grafikon 5. Učestalost genotipova Gly<sup>389</sup>Arg polimorfizma za β<sub>1</sub> receptor u ispitivanim grupama

Tabela 15. Distribucija genotipa i alela gena za TNFα G308A kod pacijenata u odnosu na pol

	<b>Muškarci</b> N (%)	<b>Žene</b> N (%)
<b>Frekvencija genotipova</b>		
Arg/Arg	40 (50.0)	14 (51.9)
Arg/Gly	38 (47.5)	13 (48.1)
Gly/Gly	2 (2.5)	0 (0)
<b>Frekvencija alela</b>		
Gly	118 (73.8%)	41 (75.9%)
Arg	42 (26.2%)	13 (24.1%)

U tabeli 16 prikazana je starosna struktura podgrupa Arg i Gly. Nema statistički značajne razlike između Arg i Gly grupe u odnosu na starost ( $t=0.541$   $p=0.589$ ).

Tabela 16. Starost (godine) ispitanika Arg i Gly grupe.

Grupa	X ± SD
Grupa A (Arg/Arg) N=	64.98±9.92
Grupa G (Gly/Gly+Gly/Arg) N=	6.81±11.82

### 6.2.2 Gly<sup>389</sup>Arg polimorfizam gena za β<sub>1</sub> receptor: distribucija genotipova i alela prema kliničkim karakteristikama

Da bismo utvrdili da li Gly<sup>389</sup>Arg polimorfizam gena za β<sub>1</sub> receptor utiče na kliničku prezentaciju bolesti, ispitivali smo distribuciju genotipova i alela kod različitih podgrupa pacijenata formiranih na osnovu kliničkih karakteristika.

Ispitivanje zastupljenosti genotipova između grupa pacijenata sa različitom težinom bolesti je pokazalo veću učestalost Arg alela u grupi pacijenata sa NYHA klasom III (76.5%), u poređenju sa grupom pacijenata sa NYHA klasom I (66.7%) i NYHA II (77.5%). Međutim, ta razlika nije bila statistički značajna, ( $\chi^2=1.995$ ,  $p=0.369$ ).

Takođe nije bilo statističke značajne razlike u učestalosti Arg/Arg (52.9%) i Arg/Gly genotipa (47.1%) kod pacijenata sa težom kliničkom slikom (NYHA III), u odnosu na grupu pacijenata sa NYHA klasom I (Arg/Gly-66.7%), Arg/Arg- 33.3% i NYHA klasom II pacijenata (Arg/Gly-41.7%), Arg/Arg (56.7%) ( $\chi^2=4.339$ ,  $p=0.362$ ). Rezultati su prikazani u tabeli 17.

Tabela 17. Frekvencija genotipa i alela u podgrupama pacijenata sa različitim NYHA klasom

	NYHA I N (%)	NYHA II N (%)	NYHA III N (%)
<b>Frekvencija genotipova</b>			
Arg/Arg	7 (33.3)	34 (56.7)	9 (52.9)
Arg/Gly	14 (66.7)	25 (41.7)	8 (47.1)
Gly/Gly	0 (0)	1 (1.7)	0 (0)
<b>Frekvencija alela</b>			
Arg	28 (66.7)	93 (77.5)	26 (76.5)
Gly	14 (33.3)	27 (22.5)	8 (23.5)

Nije bilo statistički značajne razlike u distribuciji alela prema težini kliničke slike ni kod žena ( $\chi^2=3.714$ ,  $p=0,156$ ), ni kod muškaraca ( $\chi^2=1.829$ ,  $p=0,401$ ). Međutim, žene koje su nosioci barem jednog Gly alela imale su težu kliničku sliku u odnosu na muškarce ( $\chi^2=8.791$ ,  $p=0,012$ ). (tabeli 18).

Tabela 18. Zastupljenost genotipova polimorfizma Arg<sup>389</sup>Gly na genu za  $\beta_1$  receptor kod pacijenata različite funkcionalne klase i pola

	NYHA I		NYHA II		NYHA III N (%)	
	M N (%)	Ž N (%)	M N (%)	Ž N (%)	M N (%)	Ž N (%)
<b>Frekvencija genotipova</b>						
Arg/Arg	5	2	25	9	7	2
Arg/Gly	9	5	22	3	3	5
Gly/Gly	0	0	1	0	0	0
<b>Frekvencija alela</b>	M N(%)	Ž N (%)	M N (%)	Ž N (%)	M N (%)	Ž N (%)
Arg	19 (67.9)	9(64.3)	72(75.0)	21(87.5)	17(85.0)	9 (64.3)
Gly	9(32,1)	5(35.7)	24(25.0)	3 (12.5)	3(15.0)	5(35.7)

U grupi pacijenata sa sistolnom i sistolno-dijastolnom SI, u poređenju sa bolesnicima sa dijastolnom SI, nije bilo razlike u distribuciji genotipova Arg389Gly ( $\chi^2=1.323$ ,  $p=0.283$ ) (Tabela 19).

Tabela 19. Zastupljenost genotipova polimorfizma Arg<sup>389</sup>Gly na genu za  $\beta_1$  receptor kod pacijenata sa različitim tipom disfunkcije

	genotip	N (%)
<b>Sistolna i sistolno-dijastolna</b>	Arg/Arg	40 (53.3)
	Arg/Gly+ Gly/Gly	35 (46.7)
<b>Dijastolna disfunkcija</b>	Arg/Arg	6 (37.5)
	Arg/Gly+ Gly/Gly	10 (62.5)

Nije bilo genetske uslovljene, statistički značajne razlike u svim merenim ehokardiografskim parametrima, srčanoj frekvenci i sistolnom i dijastolnom pritisku (tabela 20)

Tabela 20 . Vrednosti ehokardiografskih parametara, srčane frekvence i arterijskog krvnog pritiska kod bolesnika sa različitim genotipom

		N	X	SD	t	p
EF	Arg/Arg	46	35.46	8.21	-.081	.935
	Gly/Gly+Gly/Arg	44	35.61	10.04		
EDD	Arg/Arg	30	60.7600	5.54484	-.254	.800
	Gly/Gly+Gly/Arg	29	61.1724	6.87204		
ESD	Arg/Arg	30	45.5567	7.10778	-.010	.992
	Gly/Gly+Gly/Arg	27	45.5778	8.79416		

LPK	Arg/Arg	31	46.8387	5.80285	.686	.496
	Gly/Gly+Gly/Arg	29	45.7655	6.32214		
SPDK	Arg/Arg	23	37.48	14.393	.875	.388
	Gly/Gly+Gly/Arg	13	32.91	16.200		
SF	Arg/Arg	49	73.2449	16.28334	-.201	.841
	Gly/Gly+Gly/Arg	48	73.9375	17.56739		
SistolniBP	Arg/Arg	49	129.18	21.246	.297	.767
	Gly/Gly+Gly/Arg	49	128.02	17.361		
DijastolniBP	Arg/Arg	49	78.37	9.431	-.602	.549
	Gly/Gly+Gly/Arg	49	79.49	9.028		

U grupi pacijenta koji su nosioci Arg/Arg genotipa u odnosu na nosioce barem jednog Gly alela nije postojala statistički značajna razlika u dnevnoj dozi karvedilola ( $\chi=0.389$ ,  $p=6.27$ ). Kod pacijenata koji su uzimali bisoprolol nije bilo statistički značajne razlike u postignutoj dnevnoj dozi ovog beta blokatora u zavisnosti od genotipova ( $\chi=0.027$ ,  $p=0.871$ )

### 6.2.3 Gly<sup>389</sup>Arg polimorfizam gena za $\beta_1$ receptor:

#### Uticaj na klinički tok bolesti

Ispitivanje uticaja genotipa na rehospitalizaciju pokazalo je da nema razlike u distribuciji alela u grupi rehospitalizovanih, u poređenju sa grupom pacijenata kod kojih nije bilo potrebe za ponovnim prijemom u bolnicu ( $\chi^2= 01.616$ ,  $p=0.204$ ).

U ovoj grupi rehospitalizovanih nije bilo razlike u distribuciji genotipova ( $\chi^2=0.776$ ,  $p=0.514$ ). Rezultati su prikazani u tabeli 21.

Tabela 21. Frekvencija genotipova i alela polimorfizma Arg<sup>389</sup>Gly na genu za  $\beta_1$  receptor kod pacijenata sa SI u odnosu na rehospitalizaciju

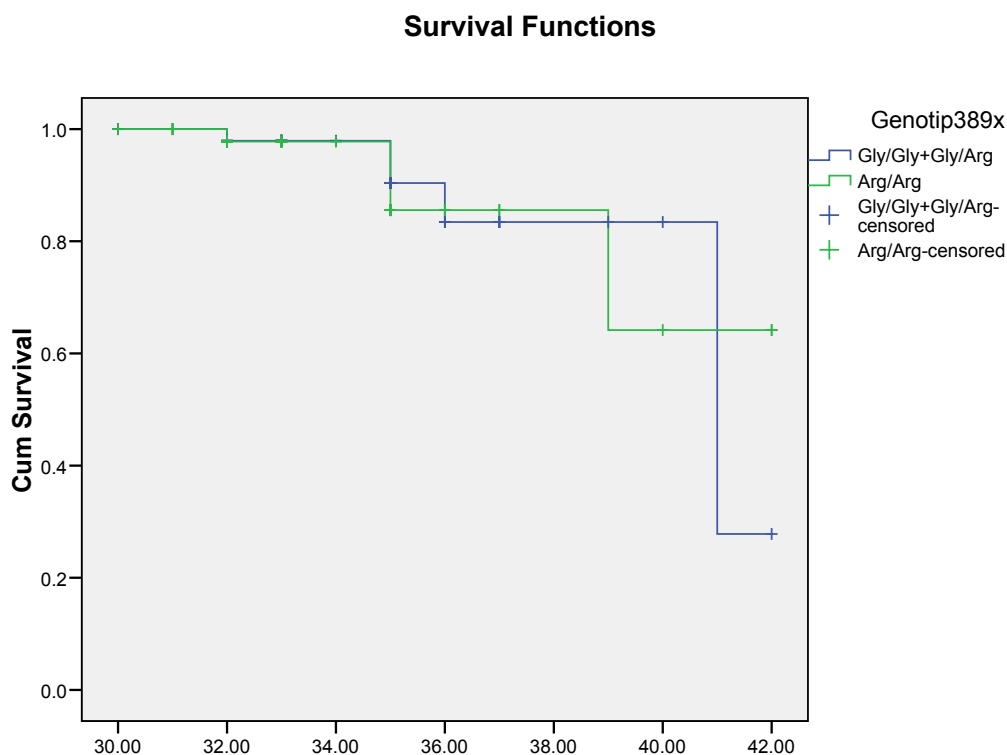
		rehospitalizacija N (%)	Bez rehospitalizacije N (%)
<b>Frekvencija genotipova</b>	Arg/Arg	23 (56.1)	5 (41.7)
	Arg/Gly + Gly/Gly	18 (43.9)	7 (58.3)
<b>Frekvencija alela</b>	Arg	64 (78.0)	15 (62.5)
	Gly	18 (22.0)	9 (37.5)

Nije bilo statistički značajne razlike u distribuciji alela ( $\chi^2= 0.013$ ,  $p=0.909$ ) između pacijenata koji su tražili hitnu medicinsku pomoć u odnosu na ostale pacijente kao ni u učestalosti genotipova ( $\chi^2= 0.484$ ,  $p=0.586$ ). Rezultati su prikazani u tabeli 22.

Tabela 22. Distribucija genotipova polimorfizma Arg<sup>389</sup>Gly na genu za  $\beta_1$  receptor kod pacijenata sa SI u odnosu na pruženu HMP

	HMP N (%)	Bez HMP N (%)
<b>Frekvencija genotipova</b>		
Arg/Arg	13 (48.1)	15 (57.7)
Arg/Gly + Gly/Gly	14 (51.9)	11 (42.3)
<b>Frekvencija alela</b>		
Arg	40 (74.1)	39 (75.0)
Gly	14 (25.9)	13 (25.0)

Uticaj ovog polimorfizma na ishod bolesti kod pacijenata sa SI koji su dobijali beta blokator je ispitivan u grupi pacijenata koji su praćeni u proseku 34,37 meseci  $\pm$  2.66. Od početka praćenja, ukupno je umrlo po 5 bolesnika sa genotipom Arg/Arg (9.3%) i 6 nosioca barem jednog Gly alela (11.3%), bez statistički značajne razlike u preživljavanju među genotipovima ( $\chi^2=0.123$ ,  $p=0,761$ ) (Grafikon 6).

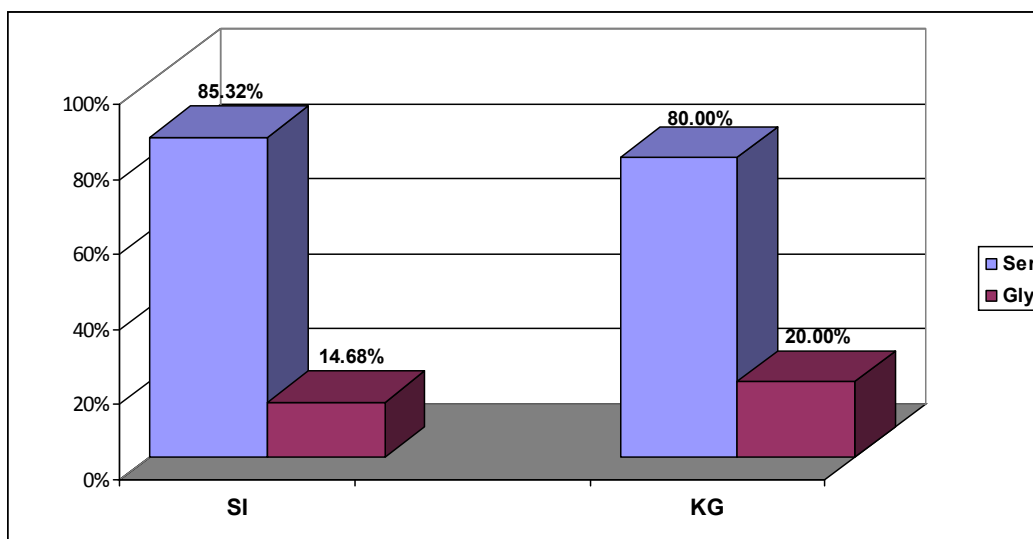


Grafikon 6. Uticaj Arg<sup>389</sup>Gly polimorfizam gena za  $\beta_1$  adrenergičke receptore na preživljavanje kod obolelih od SI

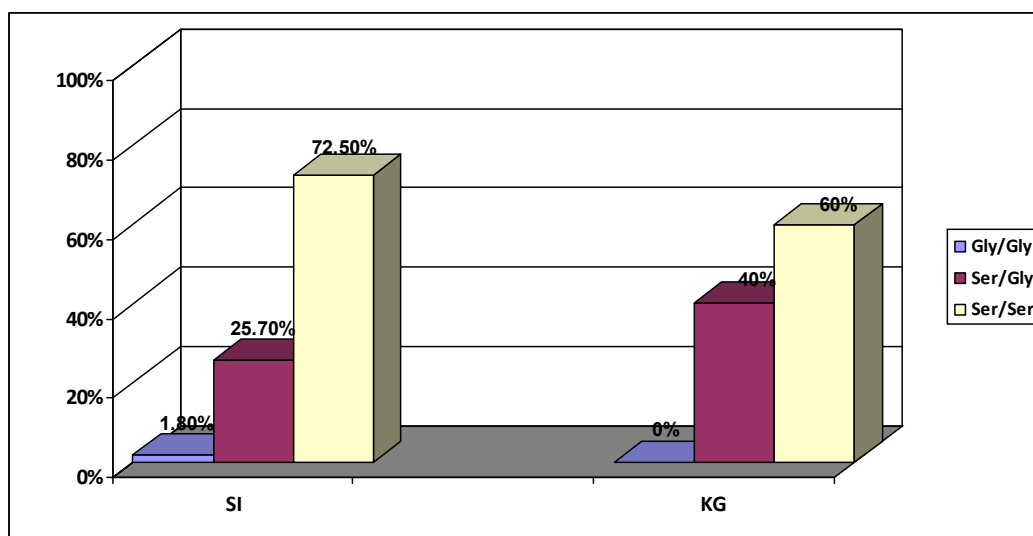
## 6.3 Rezultati ispitivanja Ser<sup>49</sup>Gly polimorfizma gena za $\beta_1$ receptor

### 6.3.1 Ser<sup>49</sup>Gly polimorfizam gena za $\beta_1$ receptor: udruženost sa pojavom srčane insuficijencije

Upoređivanjem zastupljenosti Ser alela između grupe bolesnika sa srčanom insuficijencijom (SI) i ispitanika kontrolne grupe (KG), utvrdili smo da nema značajne razlike u distribuciji ovog alela među grupama, iako je Ser alel zastupljeniji u ispitivanoj SI grupi. U grupi obolelih od SI, učestalost Ser alela je bila 85.32 % u ispitivanoj grupi a u kontrolnoj 80.00%. Učestalost Ser i Gly alela kod bolesnika sa SI ne pokazuje statistički značajnu razliku u odnosu na učestalost tih alela u KG ( $\chi^2=0.640$ ,  $p=0,424$ ) (Grafikon 7).



Grafikon 7. Prisustvo Ser i Gly alela Ser<sup>49</sup>Gly polimorfizam gena za  $\beta_1$  receptor u ispitivanim grupama



Grafikon 8. Učestalost genotipova Ser<sup>49</sup>Gly polimorfizma za  $\beta_1$  receptor u ispitivanim grupama

Učestalost genotipova Ser<sup>49</sup>Gly polimorfizam gena za  $\beta_1$  receptor nije se razlikovala između ispitivane i kontrolne grupe ( $\chi^2=2.750$ ,  $p=0.253$ ). Ser<sup>49</sup>Ser genotip je najčešći u obe grupe (Grafikon 8).

Nije bilo statistički značajne razlike u distribuciji frekvencija genotipova ( $\chi^2=0.966$ ,  $p=0.617$ ). Iako je frekvencija Ser alela bila veća kod žena (88.9%) nego kod muškaraca (84.1%), ta razlika nije bila statistički značajna ( $\chi^2=0.400$ ,  $p=0.527$ ). Rezultati su prikazani u tabeli 23.

Tabela 23. Distribucija genotipa i alela gena za Ser<sup>49</sup>Gly kod pacijenata u odnosu na

Pol		<b>Muškarci</b> N (%)	<b>Žene</b> N (%)
<b>Frekvencija genotipova</b>	Ser/Ser	58 (70.7)	21 (77.8)
	Ser/Gly	22 (26.8)	6 (22.2)
	Gly/Gly	2 (2.4)	0 (0)
<b>Frekvencija alela</b>	Ser	138 (84.1)	48 (88.9)
	Gly	26 (15.9)	6 (11.1)

U tabeli 24 prikazana je starosna struktura podgrupa Ser i Gly. Nema statistički značajne razlike u starosti između S i G grupe ( $t=-0.152$ ,  $p=0.880$ ).

Tabela 24. Starost (godine) ispitanika S i G grupe.

Grupa	X $\pm$ SD
Grupa S N=76	64.54 $\pm$ 10.78
Grupa G N=29	64.90 $\pm$ 10.84

### 6.3.2 Ser<sup>49</sup>Gly polimorfizam gena za $\beta_1$ receptor: distribucija genotipova i alela prema kliničkim karakteristikama

Da bismo utvrdili da li Ser<sup>49</sup>Gly polimorfizam gena za  $\beta_1$  receptor utiče na kliničku prezentaciju bolesti, ispitivali smo distribuciju genotipova i alela kod različitih podgrupa pacijenata formiranih na osnovu kliničkih karakteristika.

Ispitivanje zastupljenosti alela između grupa pacijenata sa različitim težinom bolesti nije pokazalo statistički značajnu razliku ( $\chi^2=1.530$ ,  $p=0.465$ ). Takođe nije bilo statističke značajne razlike u učestalosti genotipova kod pacijenata sa težom kliničkom



slikom, u odnosu na grupu pacijenata sa NYHA klasom I i II pacijenata ( $\chi^2=4.863$ ,  $p=0,302$ ). Rezultati su prikazani u tabeli 25.

Tabela 25 . Učestalost genotipova i alela Ser<sup>49</sup>Gly polimorfizma gena za  $\beta_1$  receptor kod pacijenata sa SI u odnosu na NYHA klasifikaciju

	<b>NYHA I</b> N (%)	<b>NYHA II</b> N (%)	<b>NYHA III</b> N (%)
<b>Frekvencija genotipova</b>			
Ser/Ser	17 (73.9)	38 (65.5)	16 (84.2)
Ser/Gly	6 (26.2)	19 (32.8)	2 (10.5)
Gly/Gly	0 (0)	1 (1.7)	1 (5.3)
<b>Frekvencija alela</b>			
Ser	40 (87.0)	95 (81.9%)	34 (89.5)
Gly	6 (13)	21 (18.1)	4 (10.5)

Nije bilo statistički značajne razlike u distribuciji frekvencija genotipova prema težini kliničke slike prema polovima u ispitivanoj grupi pacijenata (muškarci:  $\chi^2=3.487$ ,  $p=0.175$  žene:  $\chi^2=0.507$ ,  $p=0.776$ ). Iako je frekvencija Ser alela bila veća kod žena (%) nego kod muškaraca (%), ta razlika nije bila statistički značajna (muškarci:  $\chi^2=1.642$ ,  $p=0.440$  žene:  $\chi^2=0.438$ ,  $p=0.803$ ). Rezultati su prikazani u tabeli 26.

Tabela 26. Distribucija genotipova i alela Ser<sup>49</sup>Gly polimorfizma gena za  $\beta_1$  receptor između pacijenata različite NYHA klasifikacije prema polu

	<b>NYHA I</b>		<b>NYHA II</b>		<b>NYHA III</b> N (%)	
	M N (%)	Ž N (%)	M N (%)	Ž N (%)	M N (%)	Ž N (%)
<b>Frekvencija genotipova</b>						
Ser/Ser	11 (68.8)	6 (85.7)	30 (63.8)	8 (72.7)	11 (91.7)	5 (71.4)
Ser/Gly + Gly/Gly	5 (31.3)	1 (14.3)	17 (36.2)	3 (27.3)	1 (8.3)	2 (28.6)
<b>Frekvencija alela</b>	M N(%)	Ž N (%)	M N (%)	Ž N (%)	M N (%)	Ž N (%)
Ser	27 (84.4)	13 (92.9)	76 (80.9)	19 (86.4)	22 (91.7)	12 (85.7)
Gly	5 (15.6)	1 (7.1)	18 (19.1)	3 (13.6)	2 (8.3)	2 (14.3)

Između bolesnika sa sistolnom i sistolno-dijastolnom disfunkcijom, u poređenju sa bolesnicima sa dijastolnom SI, nije bilo razlike u distribuciji genotipova Ser<sup>49</sup>Gly ( $\chi^2=2.069$ ,  $p=0.222$ ). Rezultati ovog upoređivanja prikazani su u tabeli 27.

Tabela 27. Distribucija genotipova i alela Ser<sup>49</sup>Gly polimorfizma gena za  $\beta_1$  receptor kod pacijenata sa različitim tipom disfunkcije u odnosu na pol

	genotip	N (%)
<b>Sistolna i sistolno-dijastolna</b>	Ser/Ser	50 (71.4)
	Ser /Gly+ Gly/Gly	22 (28.6)
<b>Dijastolna disfunkcija</b>	Ser/Ser	15 (88.2)
	Ser/Gly+ Gly/Gly	2 (11.8)

Nije bilo genetski uslovljene statistički značajne razlike u svim merenim ehokardiografskim parametrima, srčanoj frekvenci i sistolnom i dijastolnom pritisku osim u dijametru LPK (tabela 28).

Tabela 28. Vrednosti ehokardiografskih parametara, srčane frekvence i arterijskog krvnog pritiska kod bolesnika sa različitim genotipom Ser<sup>49</sup>Gly polimorfizma gena za  $\beta_1$  receptor

		N	X	SD	t	p
<b>EF</b>	Ser/Ser	24	33.71	8.14	-1.272	.207
	Gly/Gly+Gly/Ser	69	36.48	9.52		
<b>EDD</b>	Ser/Ser	47	62.25	6.86	1.387	.171
	Gly/Gly+Gly/Ser	15	59.54	5.60		
<b>ESD</b>	Ser/Ser	45	46.85	8.89	.786	.435
	Gly/Gly+Gly/Ser	15	44.87	6.76		
<b>LPK</b>	Ser/Ser	49*	47.11	6.37	2.081	<b>.043</b>
	Gly/Gly+Gly/Ser	15	44.47	3.42		
<b>SPDK</b>	Ser/Ser	31	37.41	17.00	.339	.737
	Gly/Gly+Gly/Ser	8	36.13	6.40		
<b>SF</b>	Ser/Ser	70	73.79	16.52	.053	.957
	Gly/Gly+Gly/Ser	29	73.59	17.77		
<b>SistolniBP</b>	Ser/Ser	71	129.97	20.38	.806	.422
	Gly/Gly+Gly/Ser	29	126.38	19.82		
<b>DijastolniBP</b>	Ser/Ser	71	79.37	9.52	1.528	.130
	Gly/Gly+Gly/Ser	29	76.21	9.03		

\* $p<0.05$

U grupi pacijenata koji su nosioci Ser/Ser genotipa u odnosu na nosioce barem jednog Gly alela nije postojala statistički značajna razlika u dnevnoj dozi karvedilola ( $\chi=2.861$ ,  $p=0.145$ ). Kod pacijenata koji su uzimali bisoprolol nije bilo statistički značajne razlike u postignutoj dnevnoj dozi ovog beta blokatora u zavisnosti od genotipova ( $\chi=0.485$ ,  $p=0.486$ ).

### 6.3.3 Ser<sup>49</sup>Gly polimorfizam gena za $\beta_1$ receptor: uticaj na klinički tok bolesti

Ispitivanje uticaja genotipa na rehospitalizaciju pokazalo je manju učestalost Ser alela u grupi rehospitalizovanih (84.5 %), u poređenju sa grupom pacijenata kod kojih nije bilo potrebe za ponovnim prijemom u bolnicu (92.9%). Ta razlika nije statistički značajna,  $\chi^2=0.641$ ,  $p=0.423$ ). U ovoj grupi je utvrđena i manja učestalost Ser/Ser genotipa (73.8%) bez statističke značajnosti,  $\chi^2=1.133$ ,  $p=0.567$ . Rezultati su prikazani u tabeli 29.

Tabela 29. Frekvencija genotipa i alela polimorfizma Ser<sup>49</sup>Gly na genu za  $\beta_1$  receptor u grupi sa i bez rehospitalizacije.

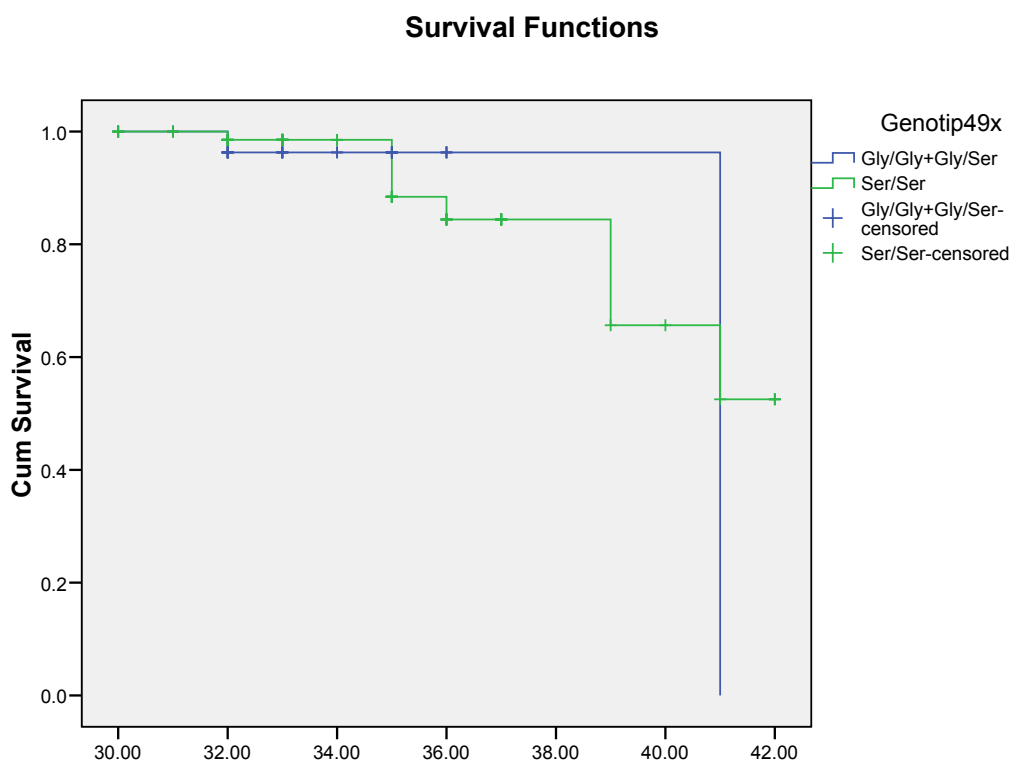
<b>Frekvencija genotipova</b>	<b>Rehospitalizacija N (%)</b>	<b>Bez rehospitalizacije N (%)</b>
Ser/Ser	31 (73.8)	12 (85.7)
Ser/Gly	9 (21.4)	2 (14.3)
Gly/Gly	2 (4.8)	0 (0)
<b>Frekvencija alela</b>		
Ser	71 (84.5)	26 (92.9)
Gly	13 (15.5)	2 (7.1)

U grupi pacijenata koji su tražili hitnu medicinsku pomoć registrovana je veća učestalost Ser alela (87,5%), u odnosu na pacijente sa hroničnom formom bolesti (85,7 %), ali ta razlika nije bila statistički značajna ( $\chi^2=0.077$ ,  $p=0.781$ ). Takođe, nije bilo ni statistički značajne razlike u distribuciji genotipova između dve posmatrane grupe ( $\chi^2=0.114$ ,  $p=0.945$ ). Rezultati su prikazani u tabeli 30.

Tabela 30: Distribucija genotipova i alela polimorfizma Ser<sup>49</sup>Gly na genu za  $\beta_1$  receptor kod pacijenata sa SI u odnosu na pruženu HMP

	<b>HMP N (%)</b>	<b>Bez HMP N (%)</b>
<b>Frekvencija genotipova</b>		
Ser/Ser	22 (78.6)	21 (75.0)
Ser/Gly	5 (17.9)	6 (21.4)
Gly/Gly	1 (3.6)	1 (3.6)
<b>Frekvencija alela</b>		
Ser	49 (87.5)	48 (85.7)
Gly	7 (12.5)	8 (14.3)

Uticaj ovog polimorfizma na ishod bolesti kod pacijenata sa SI koji su dobijali beta blokator je ispitivan u grupi pacijenata koji su praćeni u proseku 34,41 meseci  $\pm$  2,73. Od početka praćenja, ukupno je umrlo po 9 bolesnika sa genotipom Ser/Ser (11,4%) i 2 nosioca barem jednog Gly alela (6,7%), bez statistički značajne razlike u preživljavanju među genotipovima ( $\chi^2=0.640$ ,  $p=0,726$ ) (Grafikon 9).

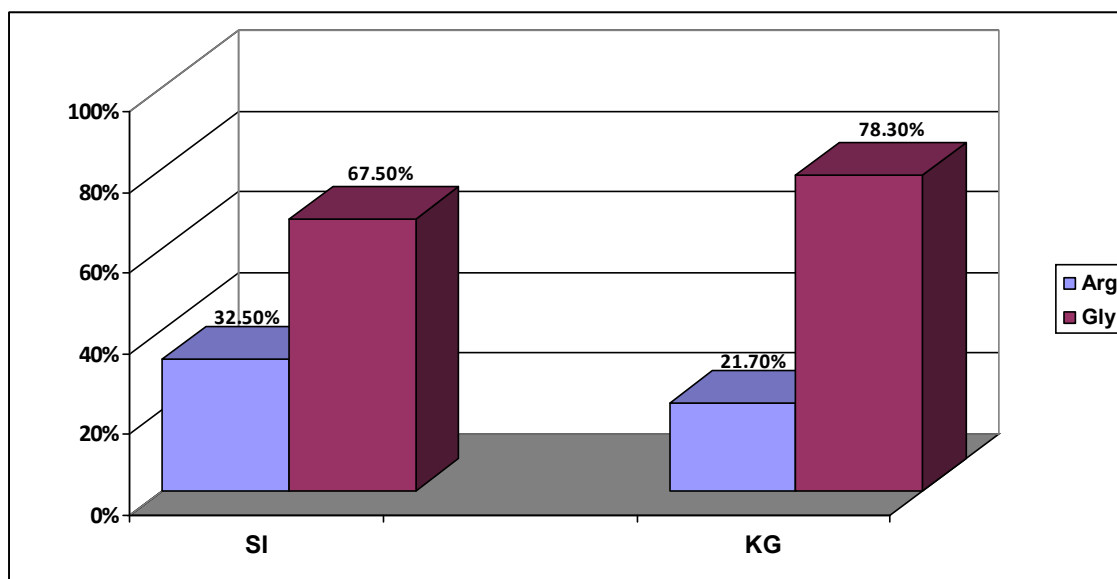


Grafikon 9. Uticaj Ser<sup>49</sup>Gly polimorfizam gena za  $\beta_1$  adrenergičke receptore na preživljavanje kod pacijenata sa SI

## 6.4 Rezultati ispitivanja Arg<sup>16</sup>Gly polimorfizma gena za $\beta_2$ receptor

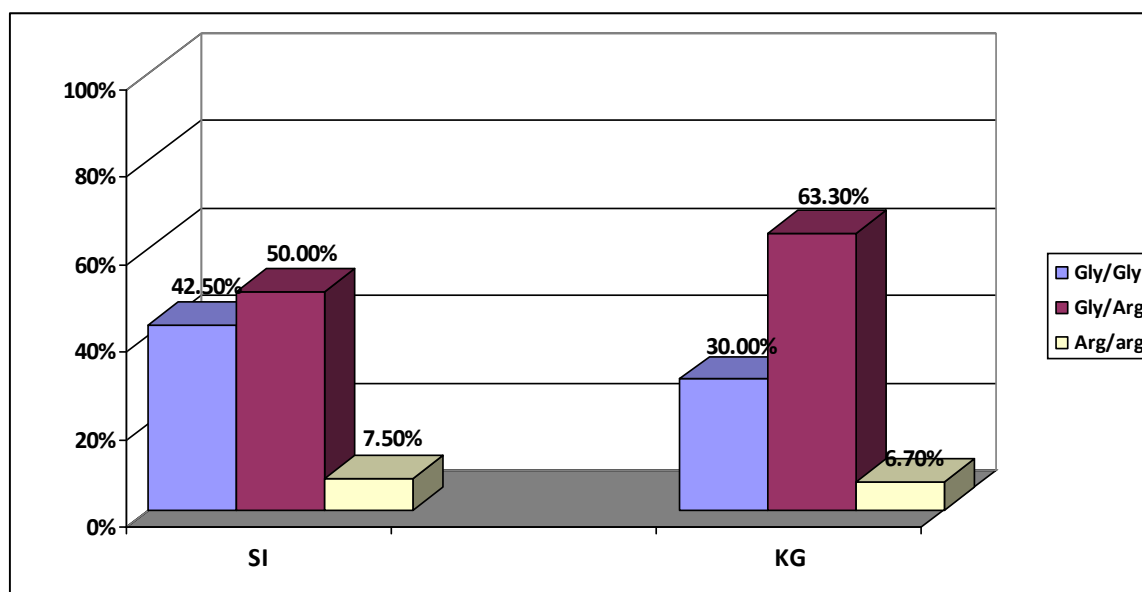
### 6.4.1 Arg<sup>16</sup>Gly polimorfizam gena za $\beta_2$ receptor: udruženost sa pojavom srčane insuficijencije

Upoređivanjem zastupljenosti Arg alela između grupe bolesnika sa srčanom insuficijencijom i ispitanika kontrolne grupe, utvrdili smo da nema značajne razlike u distribuciji ovog alela među grupama, iako je Arg alel zastupljeniji u ispitivanoj SI grupi ( $\chi^2=0.465$ ,  $p=0,495$ ). U grupi obolelih od SI, Arg alel je prisutan kod 32,5% bolesnika, a u KG kod 21,7% ispitanika. (Grafikon 10).



Grafikon 10. Učestalost Arg i Gly alela Arg<sup>16</sup>Gly polimorfizam gena za β<sub>2</sub> receptor u ispitivanim grupama

Učestalost genotipova Arg<sup>16</sup>Gly polimorfizam gena za β<sub>2</sub> receptor (Arg/Arg, Arg/Gly, Gly/Gly) nije se razlikovala između ispitivane i kontrolne grupe ( $\chi^2=1.723$ ,  $p=0.423$ ). Na grafikonu 11 se može videti da je Arg<sup>16</sup>Gly genotip najčešći u obe grupe.



Grafikon 11. Učestalost genotipova Arg<sup>16</sup>Gly polimorfizma za β<sub>2</sub> receptor u ispitivanim grupama

Nije bilo statistički značajne razlike u distribuciji frekvencija genotipova prema polu u ispitivanoj grupi pacijenata ( $\chi^2=3.858$ ,  $p=0.145$ ). Iako je frekvenca Gly alela bila veća kod žena (72,4%) nego kod muškaraca (65,6%), ta razlika nije bila statistički značajna ( $\chi^2=0.611$ ,  $p=0.434$ ). Rezultati su prikazani u tabeli 31.

Tabela 31. Distribucija genotipa i alela Arg<sup>16</sup>Gly polimorfizma gena za  $\beta_2$  receptor kod pacijenata sa SI u odnosu na pol

	<b>Muškarci</b> N (%)	<b>Žene</b> N (%)
<b>Frekvencija genotipova</b>		
Arg/Arg	5 (6.5)	3 (10.3)
Arg/Gly	43 (55.8)	10 (34.5)
Gly/Gly	29 (37.7)	16 (55.2)
<b>Frekvencija alela</b>		
Gly	101 (65.6)	42 (72.4)
Arg	53 (34.4)	16 (27.6)

U tabeli 32 prikazana je starosna struktura podgrupa Arg i Gly. Nema statistički značajne razlike između Arg i Gly grupe u odnosu na pol ( $t=1.44$ ,  $p=0.152$ ).

Tabela 32. Starost (godine) ispitanika A i G grupe.

Grupa	X $\pm$ SD
Grupa A N=59	62.73 $\pm$ 11.43
Grupa G N= 42	65.86 $\pm$ 9.65

#### 6.4.2 Arg<sup>16</sup>Gly polimorfizam gena za $\beta_2$ receptor: distribucija genotipova i alela prema kliničkim karakteristikama

Da bismo utvrdili da li Arg<sup>16</sup>Gly polimorfizam gena za  $\beta_2$  receptor utiče na kliničku prezentaciju bolesti, ispitivali smo distribuciju genotipova i alela kod različitih podgrupa pacijenata formiranih na osnovu kliničkih karakteristika.

Ispitivanje zastupljenosti Arg i Gly alela između grupa pacijenata sa različitom težinom bolesti nije pokazalo statistički značajnu razliku ( $\chi^2=2.242$ ,  $p=0,326$ ). Takođe nije bilo statističke značajne razlike u učestalosti genotipova kod pacijenata sa težom kliničkom slikom, u odnosu na grupu pacijenata sa NYHA klasom I i II pacijenata ( $\chi^2=4.374$ ,  $p=0,358$ ). Rezultati su prikazani u tabeli 33.

Tabela 33. Učestalost genotipova i alela Arg<sup>16</sup>Gly polimorfizma gena za β<sub>2</sub> receptor kod pacijenata sa SI u odnosu na NYHA klasifikaciju

	NYHA I N (%)	NYHA II	NYHA III N (%)
<b>Frekvencija genotipova</b>			
Gly/Gly	10 (50.0)	26 (42.26)	4 (23.5)
Arg/Gly	10(50.0)	30 (49.2)	11 (64.7)
Arg/ Arg	0 (0)	5 (8.2)	2 (11.8)
<b>Frekvencija alela</b>			
Gly	30 (75.0)	82..(67.2)	19 (55.9)
Arg	10 (25.0)	40 (32.8)	15 (44.1)

U ispitivanog grupi pacijenata nije bilo statistički značajne razlike u distribuciji frekvencija genotipova prema težini kliničke slike po polovima (muškarci:  $\chi^2=0.688$ ,  $p=0.709$  žene:  $\chi^2=5.418$ ,  $p=0.067$ ). U podgrupi žena sa lakšom kliničkom slikom (NYHAI-II) bila je veća učestalost genotipa Gly/Gly ( $\chi^2=5.379$ ,  $p=0.020$ )

Nije bilo statistički značajne razlike u učestalosti alela između pacijenata različite težine bolesti po polovima (muškarci:  $\chi^2=0.961$ ,  $p=0.618$  žene:  $\chi^2=5.206$ ,  $p=0.074$ ). Rezultati su prikazani u tabeli 34.

Tabela 34. Distribucija genotipova i alela Arg<sup>16</sup>Gly polimorfizma gena za β<sub>2</sub> receptor između pacijenata različite NYHA klase prema polu

	NYHA I		NYHA II		NYHA III N (%)	
	M N (%)	Ž N (%)	M N (%)	Ž N (%)	M N (%)	Ž N (%)
<b>Frekvencija genotipova</b>						
Gly/Gly	6 (42.9)	4 (66.7)*	16 (34.0)	10 (71.4)*	3 (27.3)	1 (7116.7)
Arg/Gly + Arg/Arg	8 (57.1)	2 (33.3)	31 (66.0)	4 (28.6)	8 (72.7)	5 (83.3)
<b>Frekvencija alela</b>	M N(%)	Ž N (%)	M N (%)	Ž N (%)	M N (%)	Ž N (%)
Arg	8 (28.6)	2 (16.7)	35 (37.2)	5 (17.9)	9 (40.9)	6 (50.0)
Gly	20 (71.4)	10 (83.3)	59 (62.8)	23 (82.1)	13 (59.1)	6 (50.0)

\* $p<0.05$

Između bolesnika sa sistolnom i sistolno-dijastolnom SI, u poređenju sa bolesnicima sa dijastolnom SI, nije bilo razlike u distribuciji genotipova Arg<sup>16</sup>Gly ( $\chi^2=0.008$ ,  $p=0.929$ ) (tabela 35).

Tabela 35. Distribucija genotipova i alela Arg<sup>16</sup>Gly polimorfizma gena za  $\beta_2$  receptor kod pacijenata sa različitim tipom disfunkcije

	genotip	N (%)
<b>Sistolna i sistolno-dijastolna</b>	Gly/Gly	30 (40.0)
	Arg/Gly+ Arg/Arg	45 (60.0)
<b>Dijastolna disfunkcija</b>	Gly/Gly	7 (41.2)
	Arg/Gly+ Arg/Arg	10 (58.8)

Nije bilo genetski uslovljene statistički značajne razlike u svim merenim ehokardiografskim parametrima, srčanoj frekvenci i sistolnom i dijastolnom pritisku (tabela 36)

Tabela 36 . Vrednosti ehokardiografskih parametara, srčane frekvence i arterijskog krvnog pritiska kod bolesnika sa različitim genotipom Arg<sup>16</sup>Gly polimorfizma gena za  $\beta_2$  receptor

		N	X	SD	t	p
<b>EF</b>	GG	37	37.24	9.73	.965	.337
	GA+AA	55	35.36	8.76		
<b>EDD</b>	GG	20	60.29	5.65	-.911	.366
	GA+AA	43	61.88	6.78		
<b>ESD</b>	GG	20	44.90	6.61	-.820	.416
	GA+AA	42	46.74	8.93		
<b>LPK</b>	GG	21	46.51	5.98	-.176	.861
	GA+AA	43	46.81	6.74		
<b>SPDK</b>	GG	13	37.15	14.86	.586	.561
	GA+AA	26	34.53	12.28		
<b>SF</b>	GG	38	70.37	14.89	-1.598	.114
	GA+AA	56	75.77	16.83		
<b>Sistolni BP</b>	GG	39	126.79	21.57	-1.483	.141
	GA+AA	57	133.42	21.45		
<b>Dijastolni BP</b>	GG	39	78.21	9.56	-.936	.351
	GA+AA	57	80.09	9.75		

Kod bolesnika sa sistolnom disfunkcijom leve komore, statistički značajno nižu srčanu frekvencu imali su pacijenti homozigoti za Gly (69,75±16,22) u odnosu na nosioce bar jednog Arg alela (78.26±17.73) ( $t=2.035$ ,  $p=0.046$ ).

U grupi pacijenta koji su nosioci Gly/Gly u odnosu na nosioce barem jednog Arg alela nije postojala statistički značajna razlika u dnevnoj dozi karvedilola ( $\chi=1.250$ ,  $p=0.580$ ). Kod pacijenata koji su uzimali bisoprolol nije bilo statistički značajne razlike u



postignutoj dnevnoj dozi ovog beta blokatora u zavisnosti od genotipova ( $\chi^2=0.166$ ,  $p=0.684$ ).

### 6.4.3 Arg<sup>16</sup>Gly polimorfizam gena za $\beta_2$ receptor: uticaj na klinički tok bolesti

Ispitivanje uticaja genotipa na rehospitalizaciju pokazalo je veću učestalost Gly alela u grupi rehospitalizovanih (68.8%), u poređenju sa grupom pacijenata kod kojih nije bilo potrebe za ponovnim prijemom u bolnicu (34.60%). Ta razlika nije statistički značajna,  $\chi^2=2.094$ ,  $p=0.148$ ). Pored toga, nije bilo statistički značajne razlike u distribuciji genotipova ( $\chi^2=0.193$ ,  $p=0.749$ ). Rezultati su prikazani u tabeli 37.

Tabela 37. Frekvencija genotipa i alela Arg<sup>16</sup>Gly polimorfizma gena za  $\beta_2$  receptor u grupi sa i bez rehospitalizacije

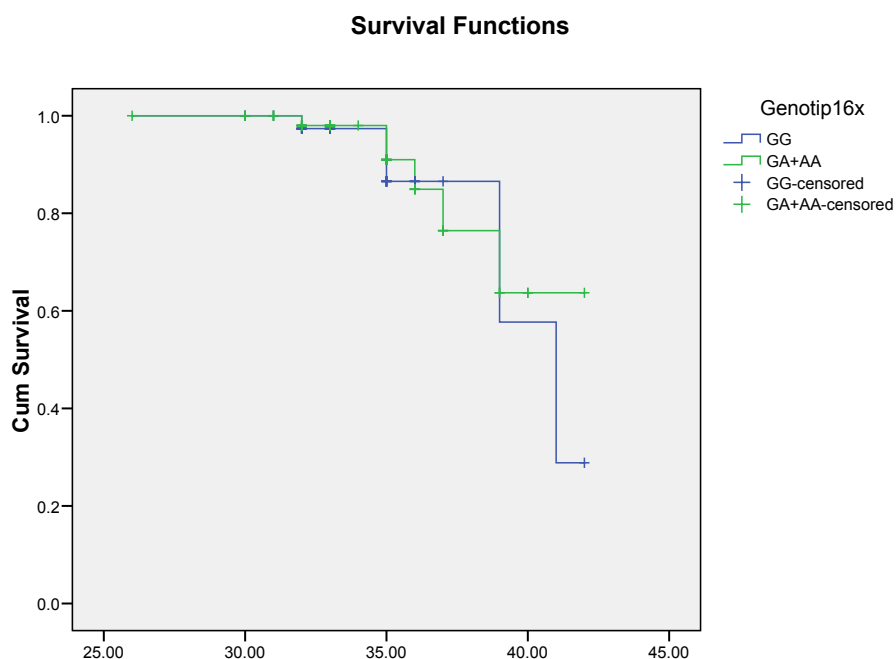
	rehospitalizacija N (%)	Bez rehospitalizacije N (%)
<b>Frekvencija genotipova</b>		
Gly/Gly	15 (37.5)	4 (30.8)
Arg/Gly + Arg/Arg	25 (62.5)	9 (69.2)
<b>Frekvencija alela</b>		
Arg	25 (31.2)	17 (65.4)
Gly	55 (68.8)	19 (34.6)

Između grupa pacijenata koji su tražili HMP u odnosu na one koji nisu nije bilo statistički značajnih geneskih uslovljenih razlika (distribucija alela:  $\chi^2=0.006$ ,  $p=0.938$ ; distribucija genotipova  $\chi^2=0.034$ ,  $p=0.854$ ). Rezultati su prikazani u tabeli 38.

Tabela 38. Distribucija alela i genotipova Arg<sup>16</sup>Gly polimorfizma gena za  $\beta_2$  receptor kod pacijenata sa SI u odnosu na pruženu HMP

	HMP N (%)	Bez HMP N (%)
<b>Frekvencija genotipova</b>		
Gly/Gly	9 (34.6)	10 (37.0)
Arg/Gly + Arg/Arg	17 (65.4)	17 (63.0)
<b>Frekvencija alela</b>		
Arg	17 (32.7)	17 (31.5)
Gly	35 (67.3)	37 (68.5)

Pacijenti koji su uključeni u prospektivno istraživanje u proseku su praćeni 34,13 meseci  $\pm$  2,74. Od početka praćenja, ukupno je umrlo po 5 bolesnika sa genotipom Gly/Gly (11,4%) i 6 nosioca barem jednog Arg alela (10.2%), bez statistički značajne razlike u preživljavanju među genotipovima ( $\chi^2=0.0380$ ,  $p=0,846$ ) (Grafikon 12).



Grafikon 12. Preživljavanje pacijenata sa SI u odnosu na distribuciju alela i genotipova Arg16Gly polimorfizma gena za  $\beta_2$  adrenergički receptor

## 6.5 Rezultati ispitivanja CYP2D6\*4 polimorfizma

Polimorfizam CYP2D6\*4 ispitivan je u grupi od 176 pacijenata sa SI, prosečne starosti  $63,44 \pm 11,49$  god i telesne mase  $78,98 \pm 14,7$ kg. U ispitivanoj grupi bilo je 46 žena (26.1%) i 130 muškaraca (73.9%). Većina pacijenata u našem ispitivanju je bila NYHA klase II i to 77 (52%). Sistolnu ili sistolno-dijastolnu disfunkciju je imalo 113 (77.4%) a dijastolnu 33 (22.6%) pacijenta.

Distribucija genotipova i alela je bila u Hardy-Weinberg ravnoteži ( $\chi^2=0.009$ ,  $p=0.996$ ). Homozigotni genotip CYP2D6 wild tip (wt/wt) je nađen kod 91 (70.0%) muškaraca i kod 33 (71.7%) žena, bez statistički značajne razlike u distribuciji genotipova među polovima ( $\chi^2=0.723$ ,  $p=0.697$ ). Nije bilo statistički značajne razlike ni u frekvenciji alela među polovima ( $\chi^2=0.043$ ,  $p=0.836$ ).

Nosioci različitih CYP2D6 genotipova se nisu razlikovali po prosečnoj starosti, ali je bilo statistički značajnih razlika u pojedinim ehokardiografskim karakteristikama.

Homozigoti za CYP2D6 wt su imali veću EF ( $t=2.270$ ,  $p=0.025$ ), manji EDD ( $t=2.402$ ,  $p=0.018$ ) i manji ESD ( $t=2.210$ ,  $p=0.032$ ). Međutim, nije zabeležena genski uslovljena, statistički značajna razlika u zastupljenosti sistolne/sistolno-dijastolne i dijastolne disfunkcije ( $\chi^2=3.195$ ,  $p=0.088$ ). Rezultati su prikazani u tabelama 39 i 40.

Tabela 39 . Vrednosti ehokardiografskih parametara, srčane frekvence i arterijskog krvnog pritiska kod bolesnika sa različitim genotipom

		N	X	SD	t	p
<b>EF</b>	wt/wt	120	63.41	11.551	0.063	0.950
	wt/*4+*4/*4	51	63.53	11.458		
<b>EDD</b>	wt/wt	99	37.14	9.507	2.270	<b>0.025</b>
	wt/*4+*4/*4	44	33.32	8.800		
<b>ESD</b>	wt/wt	105	2.10	.664	0.094	0.925
	wt/*4+*4/*4	43	2.09	.750		
<b>LPK</b>	wt/wt	63	59.8143	7.20627	2.402	<b>0.018</b>
	wt/*4+*4/*4	34	64.1206	10.32980		
<b>SPDK</b>	wt/wt	73	45.2205	8.16580	2.210	<b>0.032</b>
	wt/*4+*4/*4	36	50.4306	12.92954		
<b>SF</b>	wt/wt	73	46.9068	7.93831	1.503	0.136
	wt/*4+*4/*4	35	49.3914	8.25100		
<b>SistolniBP</b>	wt/wt	54	35.85	14.468	1.869	0.065
	wt/*4+*4/*4	25	42.12	12.454		
<b>DijastolniBP</b>	wt/wt	100	74.1300	13.90854	1.101	0.276
	wt/*4+*4/*4	43	78.4884	24.30302		

Tabela 40. Distribucija genotipova polimorfizma CYP2D6\*4 kod pacijenata sa različitim tipom disfunkcije

	genotip	N (%)
<b>Sistolna/sistolno-dijastolna disfunkcija</b>	wt/wt	74 (65.5%)
	wt/*4+*4/*4	39 (34.5%)
<b>Dijastolna disfunkcija</b>	wt/wt	27 (81.8%)
	wt/*4+*4/*4	6 (18.2%)

Svi pacijenti su bili na terapiji beta blokatora, uglavnom karvedilola (43,2%) i bisoprolola (41,5%), bez značajnih razlika između ove dve grupe po distribuciji genotipova ( $\chi^2=2.250$ ,  $p=0.279$ ). Karvedilol je primenjen u prosečnoj dnevnoj dozi od 12.5mg (3.125-25mg), dok se doza bisoprolola kretala od 1.25 do 10mg, u proseku iznosila 2.5mg. Pacijenati koji su primali karvedilol su bili više funkcionalne klase ( $\chi^2=11.009$ ,  $p=0.004$ ). Rezultati prikazani u tabeli 38. U ovoj grupi pacijenata nije bilo statistički značajne razlike

u dnevnoj dozi karvedilola u odnosu na genotip: medijana u obe grupe bolesnika prema genotipu bila 12.50mg (6.25-12.50) (p=0.947).

Metodom standarne višestruke regresije ispitivan je uticaj pola, polimorfizma CYP2D6 i klirensa kreatinina na korigovanu koncentraciju karvedilola u plazmi (koncentracija u plazmi/dnevna doza/TM). Ispitivani model objašnjava 23,3% varijanse korigovane koncentracije karvedilola (korigovano  $r^2=0,19$ ). Ovaj pokazatelj je statistički značajan (F= 5,377; p=0.003). Sve tri nezavisne promenljive daju statistički značajan jedinstven doprinos. Najznačajniji doprinos ima polimorfizam CYP – prisustvo jednog ili više CYP\*4 povećava koncentraciju leka u krvi i objašnjava 8.2% varijanse. Smanjenje klirensa kreatinina (7.1% varijanse) i ženski pol (7.0% varijanse) u nešto manjoj meri povećavaju korigovanu koncentraciju karvedilola.

Tabela 41. Uticaj pola, polimorfizma i klirensa kreatinina na korigovanu koncentraciju karvedilola

Model	Nestandardizovani koeficijenti		Standardizovani koeficijenti	P
	B	SD	Beta	
1 (Constant)	.031	.005		0.000
Pol	-.008	.004	-0.265	0.033
Genotip CYPx	-.008	.004	-0.289	0.021
KlirensKreatinina	.000	.000	-0.268	0.031

Kada je ovom metodom ispitivan uticaj korigovane koncentracije karvedilola, polimorfizma CYP2D6, NYHA klase, sistolnog krvnog pritiska, komedikacije digoksinom na srčanu frekvencu utvrđeno je da ispitivani model objašnjava 34.5% varijanse (korigovano  $r^2=0.248$ ). Ovaj model je statistički značajan (F=3.575; p=0.011). Od ovih pet parametara statistički značajan pojedinačan doprinos od 11.3% ima samo korigovana koncentracija karvedilola.

Tabela 42. Uticaj korigovane koncentracije karvedilola, polimorfizma CYP2D6, sistolnog krvnog pritiska, komedikacije digoksinom na srčanu frekvencu

Model	Nestandardizovani koeficijenti		Standardizovani koeficijenti	P
	B	SD	Beta	
1 (Constant)	97.953	16.795		0.000
Korigovana doza	339.947	140.564	0.416	0.021
NYHA	3.482	3.068	0.177	0.264

	GenotipCYPx	-5.835	4.938	-0.201	0.246
	SistolniBP	-.144	.081	-0.249	0.084
	Kardiotonik	-6.971	4.106	-0.260	0.099

U grupi pacijenata koji su primali bisoprolol ispitivani model predviđanja korigovane koncentracije bisoprolola na osnovu polimorfizma CYP2D6, nije bio statistički značajan ( $F= 3.431$ ;  $p=0.07$ ). Međutim, u izdvojenoj grupi pacijenata sa sistolnom/sistolno-dijastolnom disfunkcijom ispitivani model objašnjava 11.5% varijanse korigovane koncentracije bisoprolola (korigovano  $r^2=8.80\%$ ). Ovaj pokazatelj je statistički značajan ( $F= 4.276$ ;  $p=0.047$ ).

Tabela 43. Uticaj polimorfizma CYP2D6 na korigovanu koncentraciju bisoprolola kod pacijenata sa  $EF<40\%$

Model		Nestandardizovani koeficijenti		Standardizovani koeficijenti	p
		B	Std. Error	Beta	
1	(Constant)	.177	.030		0.000
	GenotipCYPx	-.046	.022	-.339	0.047

Kada je metodom standarne višestruke regresije ispitivan uticaj korigovane koncentracije bisoprolola, polimorfizma CYP2D6, NYHA klase, dijastolnog krvnog pritiska, EF i komedikacija digoksinom na srčanu frekvencu utvrđeno je da ispitivani model objašnjava 59.3% varijanse (korigovano  $r^2=0.481$ ). Ovaj model je statistički značajan ( $F= 5.331$ ;  $p=0.002$ ). Od ovih šest parametara statistički značajan pojedinačan doprinos imaju korigovana koncentracija bisoprolola, (8.4%) i dijastolni pritisak, od 17.4%.

Tabela 44. Uticaj korigovane koncentracije bisoprolola, polimorfizma CYP2D6, NYHA funkcionalne klase, dijastolnog krvnog pritiska, komedikacije digoksinom na srčanu frekvencu

Model		Nestandardizovani koeficijenti		Standardizovani koeficijenti	p
		B	Std. Error	Beta	
1	(Constant)	45.650	15.047		.006
	Korigovana doza	-48.859	22.947	-.365	.045
	NYHA	4.667	2.749	.334	.104
	GenotipCYPx	7.090	3.966	.262	.088
	Kardiotonik	-7.878	4.181	-.319	.073
	EF	-.199	.233	-.168	.404
	Dijastolni pritisak	.461	.150	.520	.006

## 6.6 Korelacija između parametara varijabilnosti srčane frekvence (HRV) i nivoa TNF- $\alpha$

Prvi cilj ovog istraživanja je bio da se utvrdi postojanje korelacije između nivoa TNF- $\alpha$  i, sa druge strane, ehokardiografskih i parametara varijabilnosti srčane frekvence (HRV). Vrednosti Pirsonovog koeficijenta korelacije, zajedno sa odgovarajućim stepenima verovatnoće, za korelacije između različitih parametara HRV i nivoa TNF- $\alpha$  su prikazni u Tabeli X. Koncentracija TNF- $\alpha$  je bila u statistički značajnoj negativnoj korelaciji sa SDNN ( $r=-0.542$ ,  $p<0.05$ ). Sličan rezultat je dobijen i za HRVi, geometrijske mere HRV ( $r=-0.556$ ,  $p<0.05$ ). Međutim, nije bilo statistički značajne korelacije između nivoa TNF- $\alpha$  i srčane frekvence (HR) ( $p=0.828$ ). Jača korelacija je dobijena u grupi bolesnika ženskog pola (SDNN:  $r=-0.940$ ,  $p<0.01$ ; SDANN:  $r=-0.826$ ,  $p<0.05$ ) i sa dijabetes melitusom (DM) (SDNN:  $r=-0.961$ ,  $p<0.001$ ). Indirektni marker srčane vagalne aktivnosti pNN50 nije bio u statistički značajnoj korelaciji sa koncentracijom TNF- $\alpha$  u plazmi.

Prosečan nivo TNF- $\alpha$  u plazmi je bio  $5.82\pm 1.65$ pg/mL. Bolesnike smo podelili u dve grupe: sa visokim vrednostima TNF- $\alpha$  ( $\geq 5.50$ pg/mL) i niskim vrednostima TNF- $\alpha$  ( $< 5.50$ pg/mL), a zatim smo uporedili ove dve grupe (Tabela 45). Nije bilo statistički značajne razlike između pacijenata ove dve grupe po starosti, srednjem arterijskom pritisku (BP), srčanoj frekvenci (HR), koncentraciji natrijuma i nivou kreatinina. Ali nakon poređenja parametara HRV, utvrdili smo da su statistički značajno niže vrednosti skoro svih varijabli HRV (SDNN, NightSDNN, SDANN, TINN i HRVi) su izmerene kod bolesnika sa niskim vrednostima TNF- $\alpha$ . Poređene dve podgrupe bolesnika na osnovu koncentracije TNF- $\alpha$  se nisu razlikovale značajno po NYHA funkcionalnoj klasi, niti po učestalosti uzimanja lekova kao što su  $\beta$ -blokatori, ACE inhibitori, digoksin, spironolakton i amjodaron. Kao što je i prikazano, koncentracija TNF- $\alpha$  je bila viša kod oboelih od dijabetes melitusa.

### 6.6.1 Distribucija alela i genotipa TNF- $\alpha$

Prevalenca polimorfizma promotera za TNF- $\alpha$  gen G/A na poziciji -308 u našoj studiji je bila slična prevalenci dobijenoj u drugim studijama (432, 433) (Tabela 45). Distribucija posmatranog genotipa se nije razlikovala između obolelih od srčane insuficijencije i kontrolne zdrave grupe nasumično izabranih nesrodnih osoba:

TNFA1/TNFA2=0.67/0.33 (SI), odnosno 0.62/0.38 (kontrola), kao što je već objavljeno (400, 434).

Koncentracija TNF- $\alpha$  u plazmi je bila povišena kod obolelih od CHF, u odnosu na kontrolne ispitanike ( $5.82 \pm 1.65$  pg/ml vs.  $4.30 \pm 2.72$  pg/ml,  $p < 0.01$ ). Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima drugih studija (400, 435). Po uključivanju genotipa TNF- $\alpha$  -308 kao diskriminatora, dobijeno je da je genotip TNFA2 povezan sa višim koncentracijama odgovarajućeg proteina u plazmi (TNFA1 vs. TNFA2) u obe grupe ispitanika, pacijenata ( $4.62 \pm 0.58$  pg/ml vs.  $6.42 \pm 1.70$  pg/ml,  $p < 0.01$ ) i zdravih ( $2.05 \pm 1.35$  pg/ml vs.  $5.66 \pm 2.43$  pg/ml,  $p < 0.05$ ).

Indeksi HRV su se značajno razlikovali između nosilaca TNFA1 i TNFA2 (Grafikon 13). U skladu sa prethodnim rezultatima da je koncentracija TNF- $\alpha$  u negativnoj korelaciji sa merama HRV, i da je niža kod nosilaca TNFA1 genotipa, dobijeno je da nosioci polimorfizma G/A na poziciji -308 promotora TNF- $\alpha$  gena imaju niži SDNN ( $p < 0.01$ ), NightSDNN ( $p < 0.01$ ), i SDNN indeks ( $p < 0.05$ ).

Tabela 45. Korelacija između nivoa TNF- $\alpha$  i parametara HRV

	SDNN	DaySDNN (8–21h)	NightSDNN (23–6h)	SDANN (ms)	SDNNindeks (bpm)	HRVi	pNN50 (%)	SDSD (ms)	TINN (ms)
r	-0.542	-0.444	-0.529	-0.426	-0.365	-0.556	-0.177	-0.079	-0.510
p	0.011*	0.065	0.024*	0.069	0.113	0.011*	0.483	0.756	0.031*

\*  $p < 0.05$

Tabela 46. Razlike u karakteristikama bolesnika sa niskim i visokim koncentracijama TNF- $\alpha$  (ispod i iznad srednje vrednosti za TNF- $\alpha$ )

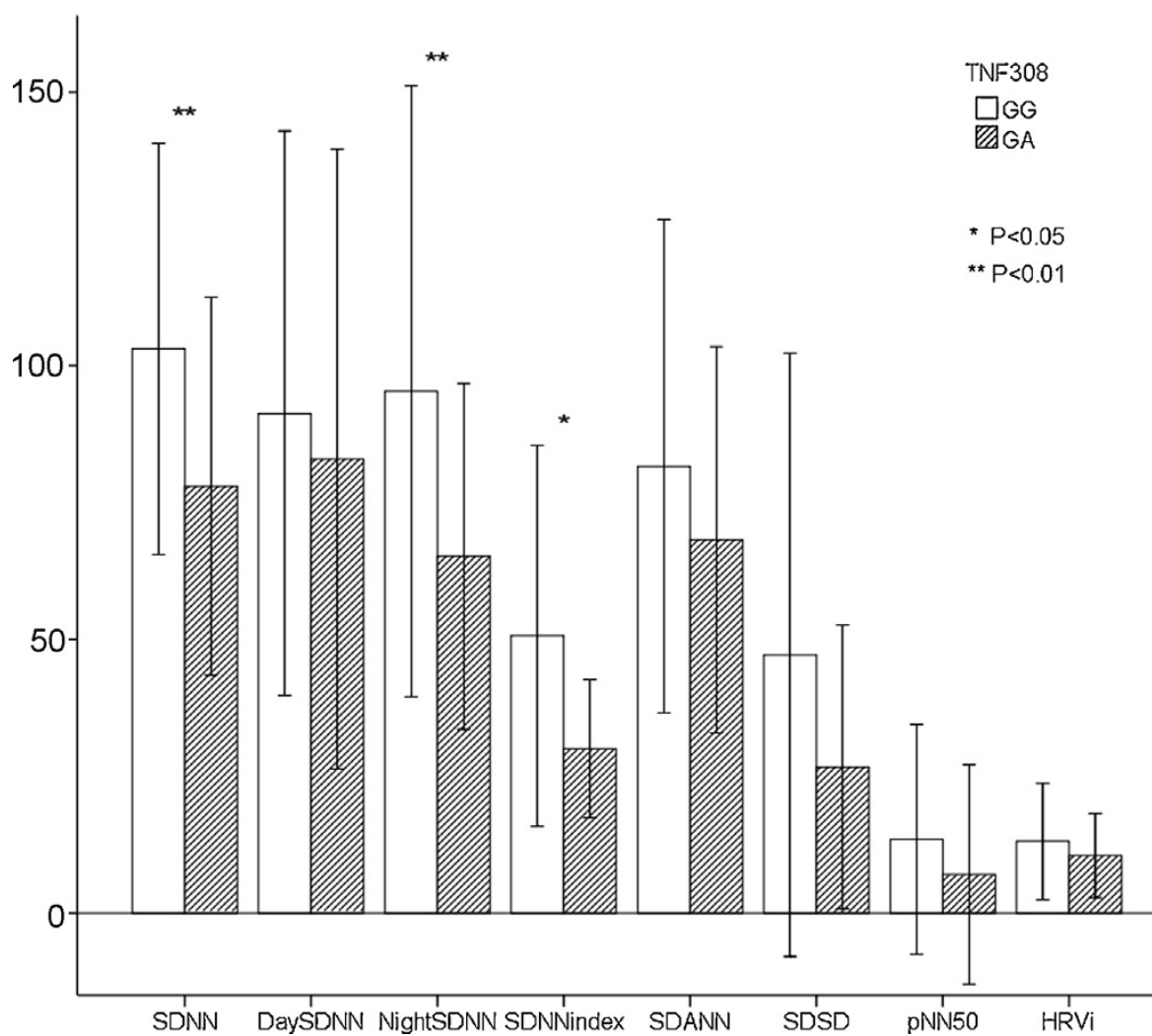
	Low TNF- $\alpha$	High TNF- $\alpha$	p
Broj bolesnika (%)	12 (57.1%)	9 (42.9%)	
Starost	$62.67 \pm 11.87$	$67.78 \pm 11.70$	0.338
Sistolni KP (mmHg)	$134.83 \pm 22.67$	$130.00 \pm 14.14$	0.565
Dijastolni KP (mmHg)	$78.75 \pm 11.10$	$84.38 \pm 10.50$	0.272
EF	$0.31 \pm 0.10$	$0.34 \pm 0.07$	0.465
EDD (mm)	$65.00 \pm 9.17$	$60.28 \pm 4.07$	0.132
ESD (mm)	$50.67 \pm 13.23$	$43.89 \pm 4.40$	0.120
LA (mm)	$45.25 \pm 8.20$	$44.11 \pm 3.89$	0.679

RVSP (mmHg)	31.67±6.60	34.89±10.81	0.407
HR holter (bpm)	69.25±12.08	69.89±8.13	0.893
Natrijum (mmol/L)	140.09±3.73	139.44±5.68	0.763
SDNN	91.52±25.92	67.88±20.97	0.032*
DaySDNN (8–21h)	88.93±33.78	70.51±21.49	0.200
NightSDNN (23–6h)	82.87±31.35	58.32±12.44	0.042*
SDSD (ms)	29.29±20.51	35.12±23.37	0.581
TINN (ms)	406.27±158.49	257.84±91.49	0.028*
SDANN (ms)	76.74±21.37	57.71±20.00	0.032*
SDNNindex (bpm)	36.74±16.93	31.17±14.11	0.441
HRVi	12.49±4.65	8.09±3.22	0.027*
pNN50 (%)	7.48±6.49	9.60±13.11	0.671
Holesterol (mmol/L)	5.10±1.84	3.51±0.67	0.047*
LDL (mmol/L)	3.53±2.45	1.78±0.45	0.207
HDL (mmol/L)	1.19±0.20	1.02±0.09	0.113
Trigliceridi (mmol/L)	1.25±0.50	1.06±0.26	0.371
Kreatinin (µmol/L)	77.42±17.78	126.45±101.19	0.216
Urea (mmol/L)	6.10±1.63	12.86±12.65	0.176
ACE/ARB	7 (58.3%)	7 (77.8%)	0.510
Digoksin	5 (41.7%)	1 (11.1%)	0.125
Spirolakton	7 (58.3%)	5 (55.6%)	0.899
Amiodaron	5 (41.7%)	3 (33.3%)	0.697
NYHA			
I-II	5 (41.7%)	5 (55.6%)	0.528
III	7 (58.3%)	4 (44.4%)	
TNF308			
GG	6 (50.0%)	1 (11.1%)	0.061
GA	6 (50.0%)	8 (88.9%)	
By pass	1 (8.3%)	2 (22.2%)	0.368
Perkutana koronarna intervencija	2 (16.7%)	1 (11.1%)	0.719



Angina pectoris	5 (41.7%)	6 (66.7%)	0.256
Prethodni infarkt miokarda	7 (58.3%)	5 (55.6%)	0.899
Diabetes melitus	2 (16.7%)	6 (66.7%)	0.020*
Hipertenzija	6 (50.0%)	8 (88.9%)	0.095
Dislipidemija	10 (83.3%)	6 (66.7%)	0.375
Pušenje	5 (41.7%)	1 (22.2%)	0.125
Nasleđe	3 (25.0%)	4 (44.4%)	0.350
Gojaznost	3 (25.0%)	2 (22.2%)	0.882

\*  $p < 0.05$



Grafikon 13. Parametri HRV kod bolesnika sa različitim genotipom za TNF- $\alpha$  -308

## 6.7 Rezultati populacione farmakokinetske analize bisoprolola

Za izgradnju modela populacione farmakokinetske analize bisoprolola obrađeni su podaci dobijeni od 61 pacijenta, prosečne starosti  $66,21 \pm 9,49$  godina i telesne mase  $78,9 \pm 12,26$  kg. Svi pacijenti su bili na terapiji bisoprololom, u dnevnim dozama od 1,25 do 10 mg. Kod većine pacijenata uzorkovanje krvi je vršeno pri isteku doznog intervala, a pre davanja sledeće doze, tek pošto su uvedeni u ravnotežno stanje. Iz uzorka krvi izdvojena je plazma, zatim je u plazmi merena koncentracija bisoprolola pomoću pomoću HPLC-a. Zabeležene koncentracije bisoprolola su bile u opsegu od 1 do 73.51 ngml<sup>-1</sup>. Dermografske karakteristike ispitivanih pacijenata date su u tabeli 47.

Table 47. Dermografske, laboratorijske analize i terapija pacijenata uključenih u populacionu analizu i validacioni set. Podaci su prikazani kao prosečne vrednosti  $\pm$  SD

Karakteristike	Grupa pacijenata za izgradnju modela	Opseg vrednosti grupe	Validation set	Opseg validacione grupe
Broj pacijenata	61		17	
Broj uzoraka	62		17	
Pol (muškarci/žene)	47/14		11/6	
TM (kg)	78.90 $\pm$ 12.26	52-102	77.35 $\pm$ 13.28	50-90
Starost (godine)	66.21 $\pm$ 9.49	39-83	63.71 $\pm$ 9.74	45-81
Dnevna doza bisoprolola (mg)	3.75 $\pm$ 2.15	1.25-10	3.60 $\pm$ 2.02	1.25-7.5
Koncentracija bisoprolola u plazmi (ngml-1)	24.29 $\pm$ 19.69	1-73.52	37.16 $\pm$ 26.95	7.33-103.47
BIS + amjodaron	18		2	
BIS + ACEi	45		9	
BIS + spirinolakton	24		3	
BIS + furosemide	31		6	
Broj pacijenta sa CYP2D6*4 -wt/*4	13		7	

Broj pacijenata sa CYP2D6*4 -*4/*4	3		0	
Holesterol (mmol/l <sup>-1</sup> )	4.19±1	2.8-6.8	4.52±1.49	2.54-7.39
CL cr (l h <sup>-1</sup> )	5.12±1.76	1.49-10.75	3.65±1.78	0.59-6.45
EF (%)	34.81±7.76	15-45	38.24±5.58	21-44

Prva faza populacionog FK modelovanja sastojala se u definisanju baznog modela. Za PFK analizu karvedilola izabrana je ADNVAN1 subrutina koja opisuje model sa jednim odeljkom, bez apsorpcije. Prvi rezultat PFK analize je određen bazni model i prosečna populaciona vrednost klirensa koja iznosi 11,4Lh<sup>-1</sup>. Rezultati ispitivanja inter i intraindividualne varijabilnosti klirensa leka pokazali su da je eksponencijalni model greške za obe varijabilnosti bio bolji od aditivnog modela. Vrednosti interidivuidualne i rezidualne varijabilnosti bile su 39,87 % i 27,17 %.

Tabela 48. Vrednost MOF u osnovnom modelu, univarijantni modeli i završni model PFK bisoprolola

Clearance models	MOF	Razlike u MOF	P	Zaključak
<b>OSNOVNI MODEL</b>				
CL= $\theta_1$ *EXP(ETA(1))	432.171			
<b>UNIVARIJANTNI MODELS</b>				
CL= $\theta_1$ *EXP(ETA(1)) + $\theta_3$ * TM	430.569	1.602	>0.05	NS ‡
CL= $\theta_1$ *EXP(ETA(1)) + $\theta_4$ * STAROST	432.171	0	>0.05	NS ‡
CL= $\theta_1$ *EXP(ETA(1)) $\theta_5$ * POL	432.171	0	>0.05	NS ‡
CL= $\theta_1$ *EXP(ETA(1)) + $\theta_6$ * DD	416.607	15.564	<0.05	YES
CL= $\theta_1$ *EXP(ETA(1)) $\theta_7$ * CL cr	426.115	6.056	<0.05	YES
CL= $\theta_1$ *EXP(ETA(1)) $\theta_8$ * EF	431.073	1.098	>0.05	NS ‡

CL = $\theta_1$ *EXP(ETA(1)) $\theta_9$ * AMJODARON	432.171	0	>0.05	NS ‡
CL = $\theta_1$ *EXP(ETA(1)) $\theta_{10}$ * ACEi	430.681	1.49	>0.05	NS ‡
CL = $\theta_1$ *EXP(ETA(1)) $\theta_{11}$ * SPIRINOLAKTON	432.171	0	>0.05	NS ‡
CL = $\theta_1$ *EXP(ETA(1)) $\theta_{12}$ * FUROSEMID	432.171	0	>0.05	NS ‡
CL = $\theta_1$ *EXP(ETA(1)) $\theta_{13}$ * PM <sub>1</sub>	427.102	5.069	<0.05	YES
CL = $\theta_1$ *EXP(ETA(1)) $\theta_{14}$ * PM <sub>2</sub>	427.683	4.488	<0.05	YES
<b>PUNI MODEL</b>  CL = $\theta_1$ *EXP(ETA(1)) + $\theta_6$ * DD + $\theta_7$ * CL cr + $\theta_{13}$ * PM <sub>1</sub> $\theta_{14}$ * PM <sub>2</sub>	411.306			

CL –klirens (L/h);  $\theta_1$  -tipična, populaciona vrednost klirensa; ETA- interindividualna varijabilnost u klirensu;  $\theta_3$  -  $\theta_{14}$  izabrane varijable; TM- telesna masa (kg); POL-1 za muškarce, 0 za žene; DD- dnevna doza bisoprolola; AMJODARON, ACEi VAR, SPIRINOLAKTON i FUR- komedikacija sa amiodaronom, ACE inhibitorom, spiroinolaktonom i furosemidom, 1 ukoliko pacijent uzima lek a 0 ako ne uzima; PM<sub>1</sub> koji su heterozigoti za CYP2D6\*4 (wt/\*4); PM<sub>2</sub> pacijenti koji su homozidoti za CYP2D6\*4 -\*4/\*4

\*\*P-nivo MOF razlike između baznog i testiranog modela; ‡NS: bez statističkog značaja SZ: statistički značajno

U sledećoj fazi ispitivali smo uticaj svake kovarijante. Dodavanje dnevne doze bisoprolola, klirensa kreatinina i genetskog polimorfizma CYP2D6\*4 (heterozigoti- wt/\*4 I homozigoti -\*4/\*4) u bazalni model rezultiralo je statistički značajnom redukcijom u minimumu objektivne funkcije (MOF). Sve ostale kovarijante (telesna masa, starost, pol, holesterol, EF, komedikacija amjodaronom, ACE inhibitorom, spiroinolaktonom i furosemidom) nakon ove faze su isključene. Brojni, sukcesivno testirani, univarijantni modeli su prikazani u tabeli XXXX. Vrednost MOF u punom modelu je bila 411.306.

Finalni populacioni farmakokinetički model klirensa bisoprolola, razvijen uz zahtev ispunjenja strogih statističkih kriterijumima za redukciju u MOF-u, potvrdio je značaj samo dnevne doze bisoprolola kao glavne determinante finalnog modela. Matematički oblik finalnog modela predstavljen je jednačinom klirensa bisoprolola:

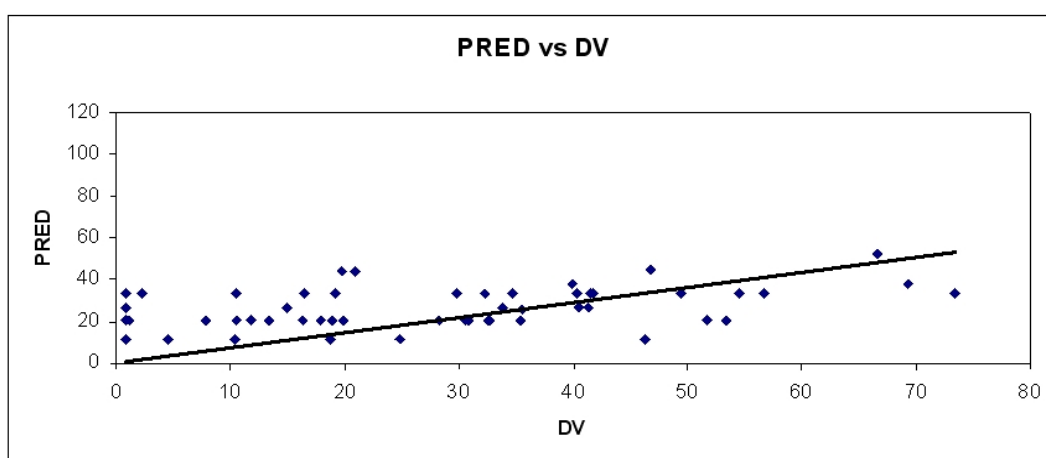
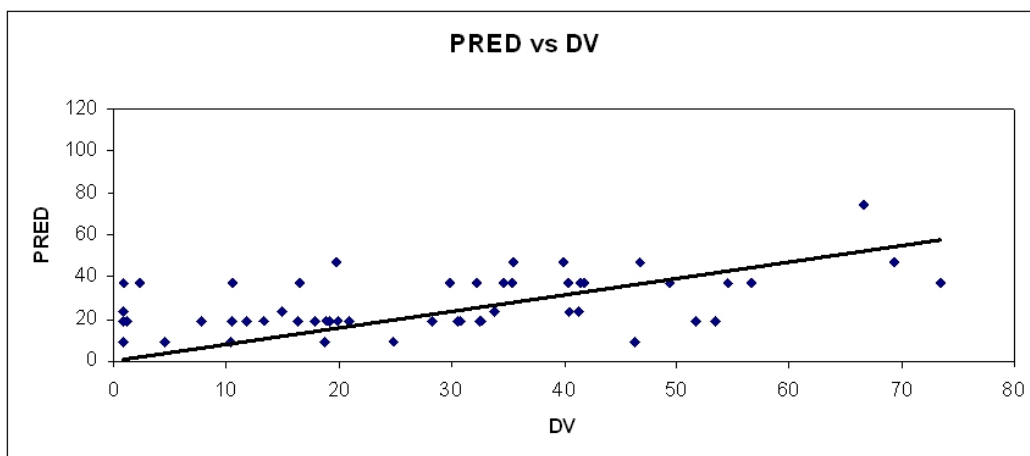
$$CL (l h^{-1}) = 4.68 + 0.859 * DD$$

FK parametri finalnog modela prikazani su u tabeli 49.

Tabela 49. Parametri utvrđeni za završni model

Parametri modela	Procenjena vrednost	Standardna greška (95% interval pouzdanosti)
Klirens ( $l h^{-1}$ ) - $\theta_1$	4.68	1.92 0.92 – 8.44
Volumen distribucije (l) - $\theta_2$	191	17.19 157.31 – 224.69
Efekat DD – $\theta_3$	0.859	0.2148 0.438 – 1.28
Interindividualna varijabilnost CL - $\omega^2_{CL}$	0.0635	0.0141 0.0359 – 0.0911
Residual error variance - $\sigma^2$	0.0145	0.0029 0.0088 – 0.0202
Greška	Finalni model	
Srednja predviđena greška Eng. Mean prediction error (MPE)	1.80 (-6.57 – 10.17)	
Srednja statistička greška Mean squared prediction error (MSPE)	295.06 (117.48 – 427.64)	
Rezidualna srednja greška predviđanja Root mean squared prediction error (RMSE)	17.18 (10.84 – 26.68)	

Vrednosti interindividualne i rezidualne varijabilnosti u finalnom modelu, prikazane kao koeficijent varijacije, bile su 25,02% i 20,02%. Grafički prikaz smanjenja varijabilnosti predviđenih i izmerenih vrednosti koncentracija bisoprolola tokom matematičkog modelovanja je dat na slici 25.

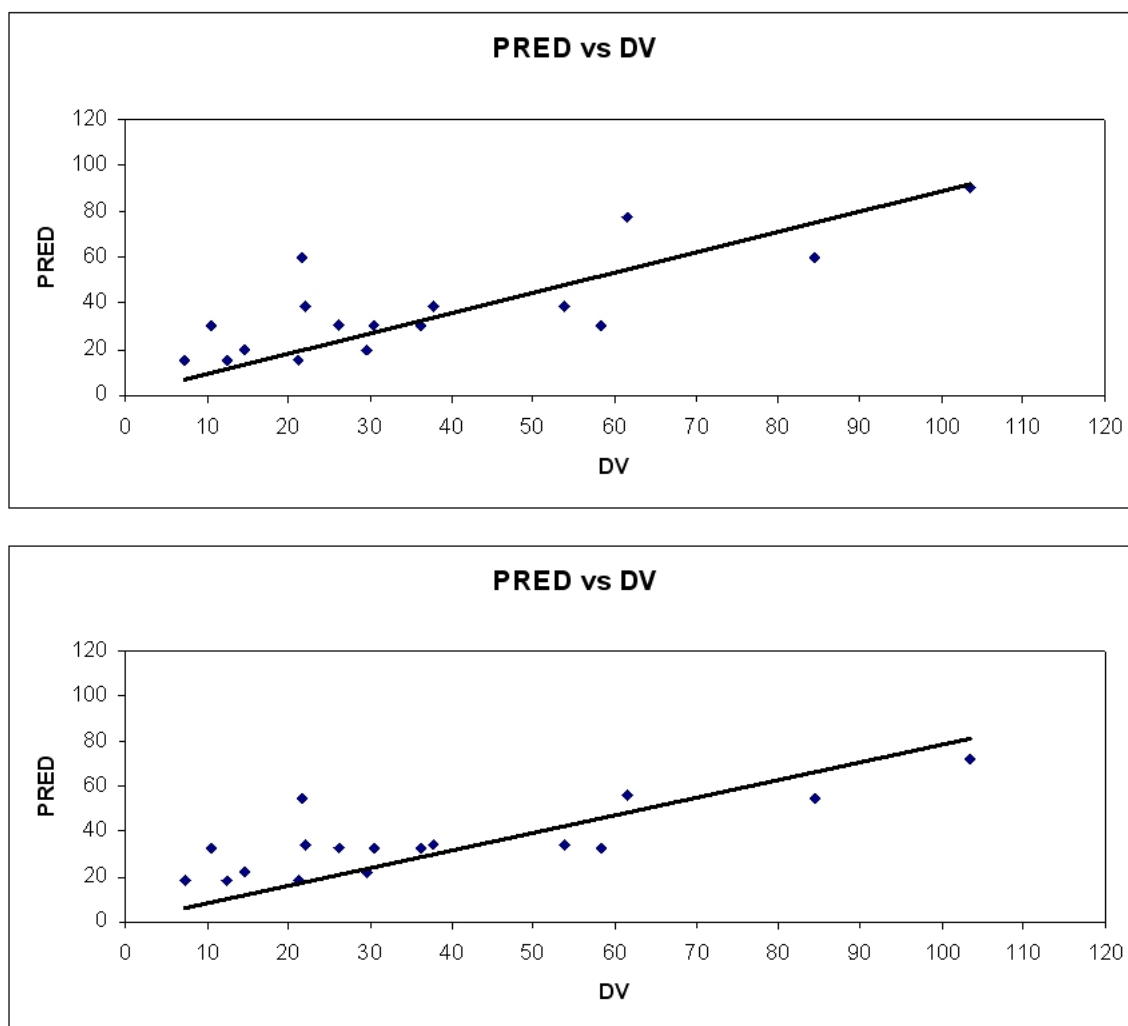


Slika 25. Odnos predviđenih i izmerenih koncentracija bisoprolola u ispitivanoj grupi korišćenjem baznog (a) i finalnog (b) modela iz osnovnog seta

U trećoj fazi populacione FK analize bisoprolola, u kojoj je procenu predvidljivosti FK parametara dobijenih korišćenjem finalnog modela izvršena uključivanjem podataka nove grupe pacijenata od 17 pacijenata, prosečne mase 77,35 kg, starosti 63,71 godina. Predviđene greške finalnog modela koje su utvrđene validacionim setom prikazane su u tabeli 50, dok je na slici 26 prikazan odnos predviđenih i izmerenih koncentracija bisoprolola.

Tabela 50. Predviđene greške završnog modela utvrđene na validacionom setu

Greška	Finalni model
Šrednja predviđena greška (MPE)	1.80 (-6.57 – 10.17)
Srednja statistička greška Mean squared prediction error (MSPE)	295.06 (117.48 – 427.64)
Rezidualna srednja greška predviđanja Root mean squared prediction error (RMSE)	17.18 (10.84 – 26.68)



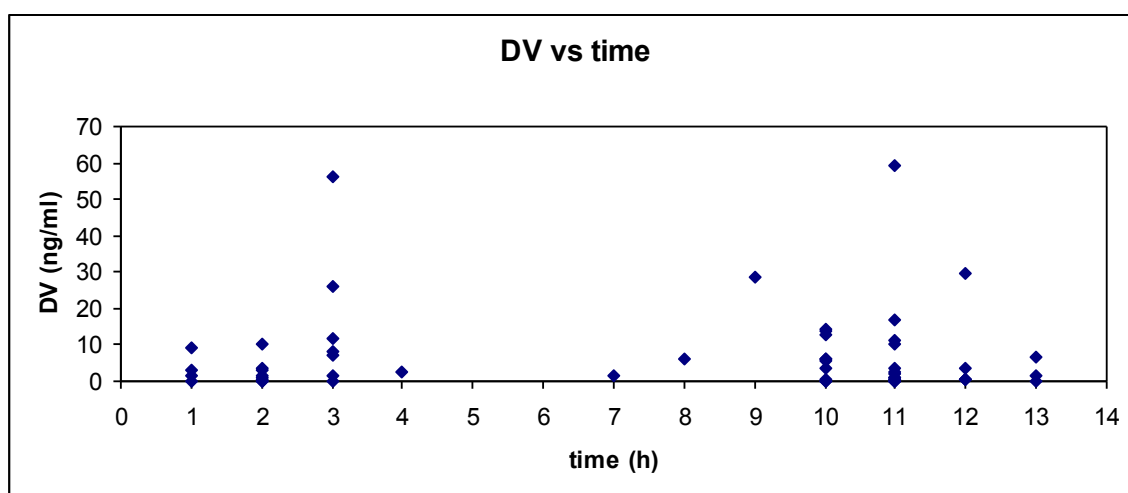
Slika 26. Odnos predviđenih i izmerenih koncentracija bisoprolola u validacionoj grupi korišćenjem baznog (a) i finalnog (b) modela

## 6.8 Rezultati populacione farmakokinetičke analize karvedilola

U populacionu farmakokinetičku studiju je uključeno 52 pacijenta, a u 55 uzoraka plazme određena je koncentracija karvedilola. U populaciji pacijenta sa SI bilo je 40 muškaraca i 12 žena, prosečne starosti  $63,02 \pm 11,95$  godina i telesne mase  $77,96 \pm 13,46$  kg. Svi pacijenti su bili na terapiji karvedilolom, u dnevnim dozama od 6,25 do 50 mg. Kod većine pacijenata uzorkovanje krvi je vršeno pri isteku doznog intervala, a pre davanja sledeće doze, tek pošto su uvedeni u ravnotežno stanje. Iz uzorka krvi izdvajena je plazma, zatim je u plazmi merena koncentracija karvedilola pomoću HPLC-a. Zabeležene koncentracije karvedilola su bile u opsegu od 1 do  $59,07 \text{ ngml}^{-1}$ . Demografske karakteristike ispitivanih pacijenata date su u tabeli 51.

Tabela 51. Karakteristike ispitivanih pacijenata

Karakteristike	Grupa pacijenata za izgradnju modela	Opseg vrednosti grupe	Validation set	Opseg validacione grupe
Broj pacijenata	52		14	
Broj uzoraka	55		15	
Pol (muškarci/žene)	40/12		9/5	
TM(kg)	77.96±13.46	49-118	71.27±9.20	49-82
Starost (godine)	63.02±11.95	30-83	60.4±16.53	28-80
Dnevna doza karvedilola (mg)	12.33±7.55	6.25-50	15.63±11.63	6.25-50
Koncentracija karvedilola u plazmi (ngml <sup>-1</sup> )	7.47±11.99	1-59.07	13.14±11.92	1-35.61
EF (%)	37.76±6.16	23-43	37.97±5.13	26-41
Pušači	16		2	
Broj pacijenata sa CYP2D6*4 (wt/*4)	17		3	
Karvedilol + amjodaron	7		1	
Karvedilol + digoksin	18		2	
Karvedilol + varfarin	25		3	
Karvedilol + aminopfilin	9		2	
Karvedilol + inhibitor protonske pumpe	13		2	



Slika 27. Odnos izmerenih koncentracija karvedilola u ispitivanoj grupi I vremena primene poslednje doze karvedilola (Scatter-plot of observed concentrations (DV) versus time of last dose of carvedilol)



Prva faza populacionog FK modelovanja sastojala se u definisanju baznog modela. Za FK analizu karvedilola izabrana je ADVAN2 subrutina koja opisuje model sa jednim odeljkom, sa apsorpcijom prvog reda. Naš bazni model je odredio tipičnu populacionu vrednost klirensa (populacioni parametar  $\theta_1$ ) koja iznosi  $43,8\text{Lh}^{-1}$ . Rezultati ispitivanja inter i intraindividualne varijabilnosti klirensa leka pokazali su da je eksponencijalni model greške za obe varijabilnosti bio bolji od aditivnog modela. Vrednosti interidivuidualne i rezidualne varijabilnosti bile su 43,24% i 31,05%. MOF baznog modela iznosila je 306,632.

Tabela 52. Vrednost MOF u osnovnom modelu, univarijantni modeli I završni model FK karvedilola

	MOF	Razlike u MOF	p**	Zaključak n
<b>OSNOVNI MODEL</b>				
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1))$	306.632			
<b>UNIOVARIJANTNI MODELI</b>				
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_3 * TM$	292.405	14.227	<0.05	SZ
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_4 * STAROST$	306.570	0.062	>0.05	NS ‡
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_5 * POL$	302.865	3.767	>0.05	NS ‡
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_6 * DD$	293.206	13.426	<0.05	SZ
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_7 * PM$	305.232	1.4	>0.05	NS ‡
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_8 * TOB$	290.911	15.721	<0.05	SZ
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_9 * EF$	305.982	0.65	>0.05	NS ‡
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{10} * DIG$	297.082	9.55	<0.05	SZ
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{11} * AMIO$	305.121	1.511	>0.05	NS ‡
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{12} * VAR$	305.740	0.892	>0.05	NS ‡
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{13} * AMINO$	305.810	0.822	>0.05	NS ‡

CL = $\theta_1 * \text{EXP}(\text{ETA}(1)) + \theta_{14} * \text{PPI}$	301.509	5.13	<0.05	SZ
<b>ZAVRŠNI MODEL FULL MODEL</b>  CL = $\theta_1 * \text{EXP}(\text{ETA}(1)) + \theta_3 * \text{TT} +$  $\theta_6 * \text{DD} + \theta_8 * \text{TOB} + \theta_{10} * \text{DIG} +$  $\theta_{14} * \text{PPI}$	269.483			

CL –klirens (L/h);  $\theta_1$  -tipična, populaciona vrednost klirensa; ETA- interindividualna varijabilnost u klirensu;  $\theta_4 - \theta_{14}$  izabrane varijable; TM- telesna masa (kg); POL-1 za muškarce, 0 za žene; DD- dnevna doza karvedilola; DIG, AMIO, VAR, AMINO and IPP komedikacija sa digoksinom, amiodaronom, varfarinom, aminofilinom i inhibitorom protonске pumpe, 1 ukoliko pacijent uzima lek a 0 ako ne uzima; \*\*P-nivo MOF razlike između baznog i testiranog modela; NS: bez statističkog značaja SZ: statistički značajno

Druga faza je predstavljala složeni proces modelovanja uz uključivanje izabranih varijabli i jednačina regresione analize. Testirano je dvanaest varijabli. Brojni, sukcesivno testirani, univarijantni modeli su prikazani u tabeli 2. Univarijantnom selekcijom je određen statistički značaj izabranih varijabli. Kriterijum statističke značajnosti prikazan je kroz redukciju u minimumu objektivne funkcije (MOF) između pojedinih univarijantnih modela. Simultanim ubacivanjem varijabli koje ispunjavaju kriterijum statističke značajnosti u bazni matematički model dobijen je puni populacioni model karvedilola. Univarijantni modeli ispitivanih kovarijanti prikazani su u tabeli 2. Statistički značajne kovarijante punog modela su: dnevna doza karvedilola, telesna masa pacijenta, komedikacija digoksinom ili inhibitorom protonске pumpe i pušenje. Ostale kovarijante (starost, pol, EF, polimorfizam *CYP2D6 -wt/\*4*), kao i komedikacija amiodaronom, varfarinom ili aminofilinom nisu imale statistički značajnu redukciju u minimum objektivne funkcije (MOF).

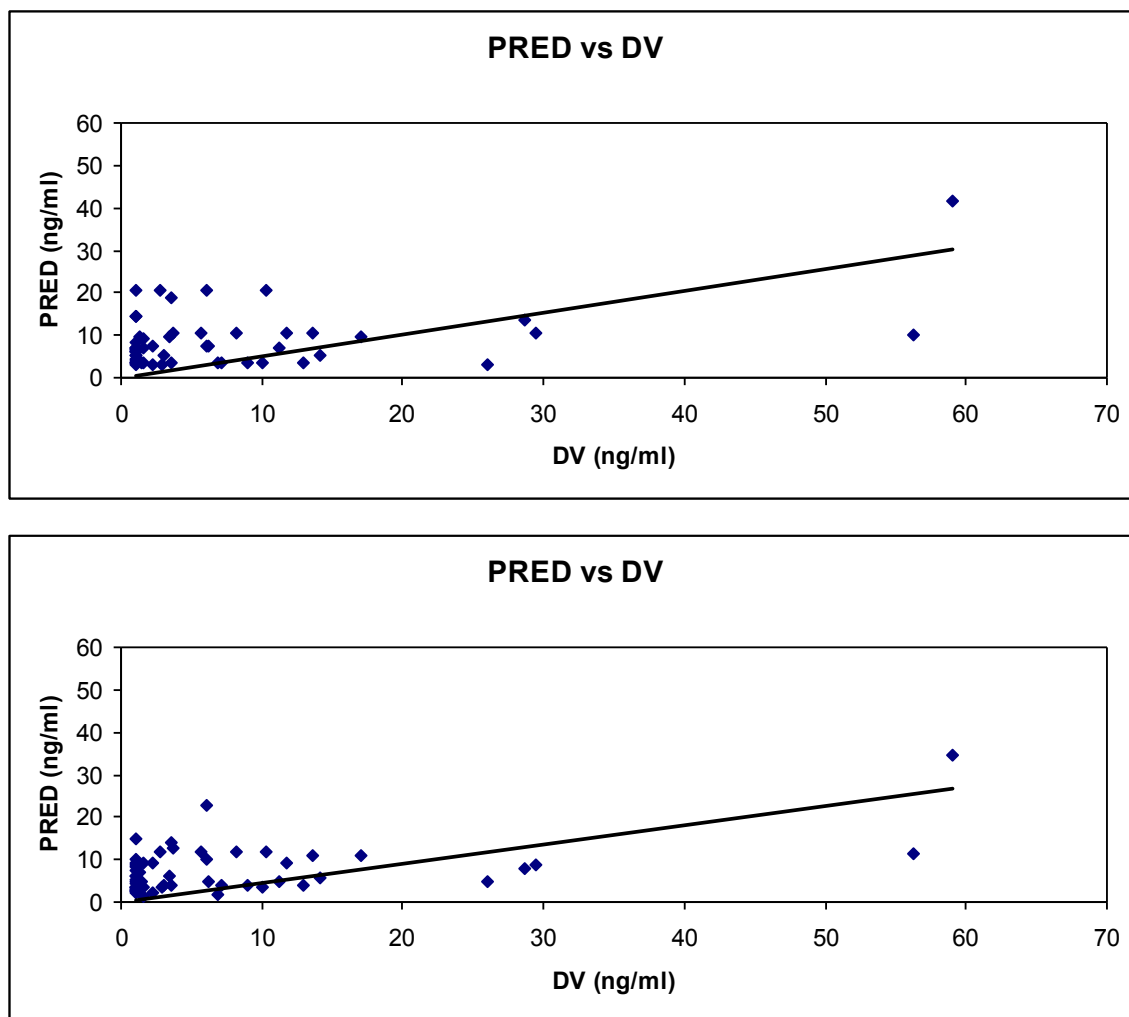
U finalnom modelu koji je razvijen uz zahtev ispunjenja strogih statističkih kriterijuma za redukciju u MOF-u, glavne determinante su telesna masa, komedikacija digoksinom i pušenje. Matematički oblik finalnog modela predstavljen je jednačinom klirensa karvedilola:

$$CL (Lh^{-1}) = 10 + 0.434 * TBW + 22.5 * DIG + 29.9 * TOB$$

Tabela 53. Predviđene greške završnog modela utvrđene na validacionom setu

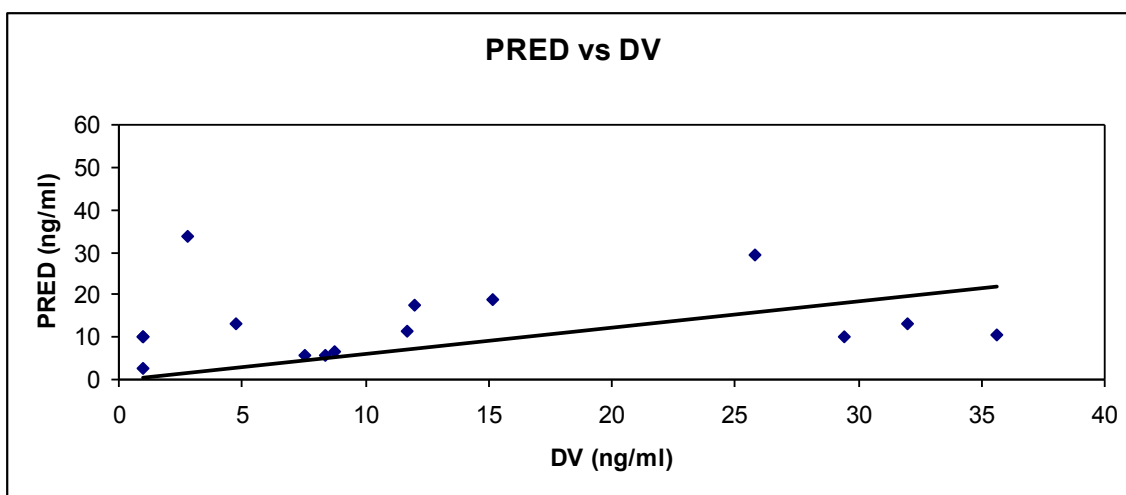
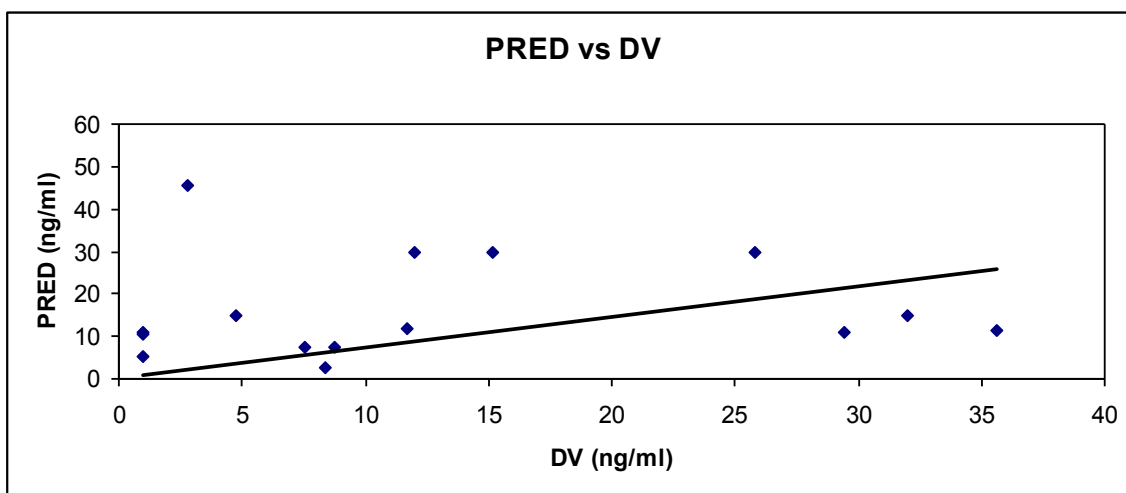
Greška	Finalni model
Srednja greška u predviđanju (MPE)	1.05 (-4.1 – 6.2)
Srednja statistička greška (MSPE)	174.33 (69.66 – 279)
Rezidualna srednja greška predviđanja (RMSE)	13.2 (8.35 – 16.7)

FK parametri finalnog modela prikazani su u tabeli 53. Na slici 28 prikazan je značaj redukcije rezidualne varijabilnosti FK parametara, koja se postiže modelovanjem od baznog do finalnog modela, uz postignutu bolju raspodelu rezultata na regresionoj pravnoj. Vrednosti interindividulane i rezidualne varijabilnosti u finalnom modelu, prikazane kao koeficijent varijacije, bile su 25,02 % i 20,02 %. Grafički prikaz smanjenja varijabilnosti predviđenih i izmerenih vrednosti koncentracija karvedilola tokom matematičkog modelovanja je dat na slici 28.



Slika 28. Odnos predviđenih i izmerenih koncentracija karvedilola u ispitivanoj grupi za svakog pacijenta korišćenjem baznog (a) i finalnog (b) modela

U trećoj fazi populacione FK analize karvedilola izvršena je provera uključivanjem podataka nove grupe pacijenata od 14 pacijenata (9 muškaraca i 5 žena), prosečne telesne mase  $71,27 \pm 9,20$  kg, starosti  $60,4 \pm 16,53$ g. Predviđene greške finalnog modela koje su utvrđene validacionim setom prikazane su u tabeli 54, dok je na slici 29 prikazan odnos predviđenih i izmerenih koncentracija karvedilola.



Slika 29. Odnos predviđenih i izmerenih koncentracija karvedilola u validacionoj grupi korišćenjem baznog (a) i finalnog (b) modela

Tabela 54. Parametri finalnog modela

Parametri modela	Vrednost	Standarna greška (95% Interval pouzdanosti)
Klirens		3.71
Clearance ( $L h^{-1}$ ) - $\theta_1$	10	2.73 – 17.27
Volumen distribucije		132.06
Volume of Distribution (L) – $\theta_2$	832	573.16 – 1090.84
Efekat telesna težina-		0.096
Effect of TBW – $\theta_3$	0.434	0.246 – 0.622

Effect of TOB – $\theta_4$	29.9	5.29 19.53 – 40.27
Effect of DIG – $\theta_5$	22.5	5.23 12.25 – 32.75
Interindividualna varijansa Interindividual variance of CL - $\omega^2_{CL}$	0.0626	0.013 0.0371 – 0.0881
Re Residual error variance - $\sigma^2$	0.0401	0.0072 0.26 – 0.0542

## 7 DISKUSIJA

### 7.1 Značaj polimorfizma $\beta_1$ receptora u srčanoj insuficijenciji

Dobro je poznato da se štetni efekti hronične adrenergičke hiperaktivnosti u SI odvijaju posredstvom  $\beta_1$  adrenergičkih receptora. Imajući u vidu tu činjenicu brojna istraživanja su testirale hipotezu da li polimorfizmi gena za ovaj receptor utiču na njegovu funkciju i doprinose razvoju SI i težini kliničke slike. Polimorfizam čiji je značaj analiziran u najvećem broju studija je zamena guanina citozinom u položaju 1165 koja rezultira zamenom aminokiseline arginina glicinom u položaju 389 ( $\beta_1$  Arg389Gly). Da je zamena pozitivno naelektrisanog arginina reziduom neutralnog glicina funkcionalno značajna ukazuju rezultati Mason-a i sar. Ovi autori su u *in vitro* uslovima utvrdili da je nakon stimulacije izoprenalinom Arg<sup>389</sup> varijante  $\beta_1$  receptora, aktivnost adenilat ciklaze tri puta veća u odnosu na Gly<sup>389</sup> (184). Prema tome, za nosioce Gly varijante  $\beta_1$  receptora se može reći da imaju neku vrstu prirodne  $\beta$  blokade. Ako se uz to ima u vidu značaj adrenergičkog sistema u remodelovanju LK, može se pretpostaviti da će u prisustvu Arg alela rizik za razvoj srčane slabosti biti veći (436). Međutim, rezultati našeg istraživanja nisu potvrdili ovu hipotezu. Naime, u grupi pacijenata sa SI nije bilo razlike u distribuciji genotipova Arg389Gly polimorfizma u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika. Slična učestalost ispitivanih varijanti  $\beta_1$  receptora zabeležena je u drugim istraživanjima (437-439). U skladu sa našim rezultatima su rezultati većine studije koje su ispitivale značaj ovog polimorfizma na pojavu srčane slabosti. Naime, uprkos činjenici da je u većini studija potvrđen uticaj polimorfizma na položaju 389 na terapijski odgovor beta blokatora u SI (183, 190, 440) i rezultata eksperimentalnih studija (190), doprinos ove genske varijabilnosti na pojavu i progresiju SI nije u potpunosti jasan, pre svega zbog toga što ovi pozitivni rezultati nisu ponovljeni u kliničkim studijama. Istraživanje Tesson-a i sar. je bila prva velika studija sa negativnim rezultatom (441). Ovi autori su ispitivali značaj genske varijabilnosti na pojavu SI u grupi od 425 pacijenata sa dilatnom kardiomiopatijom. Nakon ovih objavljeni su slični rezultati drugih studija (442, 443, 444-446) u kojima statistički značajna korelacija između ovog polimorfizma i pojave SI nije potvrđena bez obzira na etiologiju srčane slabosti (442, 447; 441).

U nekoliko studija je ispitivan značaj istovremenog prisustva aktivnije Arg389 varijante  $\beta_1$  receptora i polimorfizma  $\alpha_{2c}$  receptora. Ovaj presinaptički receptor je

odgovoran za inhibiciju oslobađanja noradenalina (121, 448) i prevenciju progresije SI (449). Najčešći polimorfizam na ovom genu je delecija 4 AK (Del322-325) koji vodi, u *in vitro* uslovima potvrđenoj, neefikasnosti agoniste da aktivira ovaj receptor (436). Imajući u vidu da prisustvo Del322-325 polimorfizma  $\alpha_{2c}$  receptora može povećati oslobađanje NA, dok Arg389 varijanta  $\beta_1$  receptora posreduje u intenzivnijoj adrenergičkoj transmisiji, može se pretpostaviti da će ova kombinacija polimorfizama dramatično pojačati adrenergičku aktivnost u srcu i rizik od pojave SI. Ovu hipotezu su prvi testirali Small i sar. i dobili očekivane rezultate o većoj zastupljenosti ovih polimorfizama kod pacijenata sa SI (436). Naime, ova grupa autora je u populaciji Afroamerikanaca potvrdila 10 puta veći rizik od pojave SI ukoliko su homozigoti za Del322-325 alel  $\alpha_{2c}$  receptora i Arg389 alel  $\beta_1$  receptora. Ovaj nalaz predstavlja najmoćniji, do sada opisani, genetski faktor rizika za SI koji ukazuje na potrebu za genetskim ispitivanjem u preventivne svrhe. Međutim, ovaj rezultat je dobijen u podgrupi 78 pacijenata crne rase, koji se danas smatra nedovoljnim za relevantan zaključak, te se može smatrati lažno pozitivnim. Osim toga, značajnost ova dva polimorfizma nisu potvrdile druge dve studije studije koje su ispitivale pacijente bele (446), odnosno žute rase (445). U nedavno objavljenoj afričkoj studiji Woodiwiss-a i sar. na relativno velikom uzorku pacijenata (n=403) sa IDC nije potvrđena veza između prisustva Arg<sup>389</sup> i Del322-325 sa pojavom SI (450). Iako nijedan od ovih rezultata nije postigao statističku značajnost, postoji tendencija ka redukciji rizika za pojavu SI kod nosioca Del322-325 alel, odnosno potpuno obrnuta veza u odnosu na rezultate Small-a i sar (436). Međutim, na osnovu dostupnih podataka jasno je da ovaj polimorfizam nije moguće dovesti u direktnu vezu sa pojavom SI.

Kako rezultati našeg istraživanja ukazuju, ni genska varijabilnost na položaju 49  $\beta_1$  receptora ne utiče na pojavu SI: razlika u distribuciji alela i genotipova između pacijenata sa SI i kontrolne grupe nije dostigla statističku značajnost, što je u skladu sa rezultatima većine objavljenih studija. Iako je u jednoj maloj nemačkoj studiji bilo statistički značajne razlike u distribuciji Ser<sup>49</sup> i Gly<sup>49</sup> alela  $\beta_1$  receptora kod pacijenata sa SI u odnosu na kontrolu (451), ovi rezultati nisu kasnije ponovljeni (176).

Hipotezu o direktnom uticaju Arg389Gly polimorfizma na patogenezu SI testirali su Perez-a i sar. (190). Naime, ovi autori su na eksperimentalnom modelu transgenih životinja sa prekomernom ekspresijom Arg<sup>389</sup> ili Gly<sup>389</sup>  $\beta_1$  receptora u srcu ustanovili da je kod miševa sa Arg<sup>389</sup> varijantom  $\beta_1$  receptora, pri starosti od tri meseca, bazalni i dobutaminom stimulisani kontraktilni odgovor veći u odnosu na miševe koji su imali samo

Gly389  $\beta_1$  receptor (190). Interesanto je da ova varijanta receptora kod šest meseci starih životinja podleže intenzivnijoj desenzitizaciji u odnosu na Gly389, što se može objasniti povećanom aktivnošću kinaze G-receptora (GRK) (185). Pored toga, kod ovih životinja, nosioca Arg alela na položaju 389, u uzrastu od devet meseci, razvija se srčana insuficijencija sa hipertrofijom leve komore, pojačanom fibrozom i smanjenom aktivnošću adenilat ciklaze (190). Uz to, ispitivani polimorfizam uslovljava različit terapijski odgovor beta blokatora. Imajući ovo u vidu, autori zaključuju da kod nosioca Arg 389 alela postoji mogućnost da se predvidi i utiče na klinički tok i terapijski odgovor na primenu beta blokatora. Ovi pacijenti, kako rezultati Mialet Perez-a i sar. sugerišu, na početku razvoja miokardne disfunkcije, imaju lakšu kliničku sliku i veću toleranciju fizičkog opterećenja u odnosu na nosioce Gly389 alela. Iako prisustvo Arg389 varijante  $\beta_1$  receptora predisponira pojavu srčane slabosti, vremenom se prognoza popravljja jer receptor podleže „autoblokadi“ zahvaljujući kontraregulatornim mehanizmima (190). Još jedna studija sa transgenim životinjama i prekomernom ekspresijom Arg389Gly varijanti  $\beta_1$  receptora je dobila interesantne rezultate. Naime, Akhter i sar. su utvrdili da je Arg389 receptoru, osim veće aktivnosti, svojstveno i intezivnije kardioprotektivno dejstvo (192). Ova redukcija oštećenja miokarda u toku ishemije-reperfuzije, je verovatno, kako zaključuju autori, rezultat brže desenzitizacije Arg389 varijante  $\beta_1$  receptora posredstvom G-receptorne kinaze (GRK) jer ima povoljniju konformaciju u odnosu na Gly389 varijantu (452).

Imajući u vidu da su eksperimentalne studije potvrdile veću aktivnost Arg389 varijante  $\beta_1$  receptora nakon vezivanja agoniste, može se pretpostaviti da će kod nosioca Arg389 alela farmakološki odgovor  $\beta$  blokatora biti veći (184; 190). Studije koje su testirale ovu hipotezu mogu se podeliti u dve kategorije: one koje su fokusirane na prognostičke indikatore kao što je e젝ciona frakcija leve komore (EFLK) i one koje su usredsređene na ishod, odnosno, mortalitet ili transplantaciju srca. U nameri da ispitamo uticaj ovog polimorfizma na težinu kliničke slike određivali smo distribuciju genotipova i alela kod pacijenta NYHA klase I, II i III i ustanovili da veću zastupljenost Arg<sup>389</sup> alela kod pacijenata u funkcionalnoj klasi III, ali bez statističke značajnosti. Pored toga, nije bilo razlike u frekvenciji genotipova i alela ovog polimorfizma u grupi pacijenata sa sistolno ili sistolno-dijastolnom SI u odnosu na grupu pacijenata sa dijastolnom SI. Između homozigota za Arg<sup>389</sup> alel i nosioca barem jednog Gly389 alela nije bilo razlike u svim merenim ehokardiografskim parametrima, kao i srčanoj frekvenci i vrednostima krvnog



pritisaka. Prema tome, kod pacijenata sa srčanom slabošću varijabilnost na položaju 389 gena za  $\beta_1$  receptor ne utiče na klinički tok i prezentaciju bolesti.

Nekoliko studija je testiralo vezu između terapijske efikasnosti beta blokatora i polimorfizma  $\beta_1$  adrenergičkih receptora. Prva od četiri studije u kojima je potvrđen značaj genske varijabilnosti  $\beta$  receptora je studija Mialet Perez i sar. u kojoj je ispitan uticaj šestomesečne primene karvedilola na terapijski odgovor, meren promenom EFLK kod 224 pacijenata sa SI (190). Ovi autori su utvrdili da je kod pacijenata sa jednim ili dva Arg<sup>389</sup> alela došlo do značajnijeg povećanja EFLK u odnosu na homozigote za Gly<sup>389</sup>. Slične rezultate dobili su Chen i sar. koji su u grupi od 135 pacijenata sa idiopatskom kardiomiopatijom, lečenih karvedilolom godinu i po dana (453). Dalju potvrdu ovih rezultata dobila je jedna grupa autora u dve studije u kojima je ispitan terapijski odgovor metoprolol sukcinata. Naime, u prvoj studiji je nakon tromesečne terapije zabeleženo statistički značajno povećanje EFLK kod pacijenata koji su postigli najviše doze leka a nosioci su dva Arg<sup>389</sup> alela u odnosu na pacijente sa jednim ili dva Gly<sup>389</sup> alela (183). U ovoj studiji nije potvrđen značaj polimorfizma na položaju 49  $\beta_1$  receptora na terapijski odgovor metoprolola. U drugoj studiji nije bilo genskom varijabilnošću  $\beta_1$  receptora uslovljene razlike u toleranciji na početku terapije, ali su kod nosioca jednog ili dva alela Gly<sup>389</sup> kao i kod homozigota za Ser<sup>49</sup> (236) primenjene veće doze diuretika. Međutim, u nekoliko studija nije bilo genskom varijabilnošću uslovljene razlike u povećanje EFLK. U prospektivnoj studiji de Groote-a i sar. nakon tromesečne primene bisoprolola ili karvedilola, nisu potvrđene genski uslovljene razlike u srčanoj frekvenci i EFLK (454). Ni u nedavno objavljenoj studiji Metra-e i sar. polimorfizam  $\beta_1$  receptora nije uticao na terapijski odgovor karvedilola iako je kod pacijenata koji su postigli veći terapijski odgovor bilo više homozigota za Arg<sup>389</sup>, ali bez statističke značajnosti (455). U skladu sa ovim su rezultati subanalize BEST studije (Beta-Blocker Evaluation of Survival Study) u kojoj kod pacijenata u toku terapije bucindololom porast EFLK nije zavisio od genske varijabilnosti  $\beta_1$  receptora (194). Imajući u vidu da je u pomenute studije uključen relativno mali broj pacijenata, ne može se zaključiti da je ovaj polimorfizam  $\beta_1$  receptora dobar prediktor efikasnosti  $\beta$  blokatora u porastu EFLK. Međutim, tendencija boljih rezultata kod nosioca Arg<sup>389</sup> alela jasno je izražena i nema rezultata drugih studija koje tvrde suprotno. Pored toga, kratak vremenski period u kojem je farmakogenetski efekat primene beta blokatora praćen, svojstven je većini ovih studija i ovaj nedostatak treba uzeti u obzir prilikom tumačenja njihovih rezultata, posebno ako se ima u vidu da je redukcija

remodelovanja pod uticajem beta blokatora potpuna tek posle godinu dana njihove primene (456).

Imajući u vidu da je nishodna regulacija Gly<sup>49</sup> varijante  $\beta_1$  receptora intezivnija u odnosu na Ser<sup>49</sup> (188) i da je proces desensitizacije  $\beta_1$  receptora vrlo važan adaptivni mehanizam na kardiotoksičnost hronične hiperaktivnosti adrenergičkog sistema koja postoji u SI (28), postavljena je hipoteza o protektivnom dejstvu Gly<sup>49</sup> varijante  $\beta_1$  receptora ali sa slabijim terapijskim odgovorom na primenu  $\beta$  blokatora. Međutim, ova očekivanja nisu potvrdili rezultati *in vitro* istraživanja. Naime, Levin i sar. su zabeležili veću senzitivnost Gly<sup>49</sup> varijante u odnosu na Ser<sup>49</sup> varijantu receptora na blokadu metoprololom, dok nishodna regulacija receptora nije potvrđena (188). U našem istraživanju pomenuti polimorfizam se nije razlikovao od SNP rs1801253: između pacijenata koji su nosioci Ser<sup>49</sup> i Gly<sup>49</sup> alela nije bilo razlike u srčanoj frekvenci, sistolnom i dijastolnom krvnom pritisku, izmerenim ehokardiografskim parametrima. Pored toga, nije bilo razlike u distribuciji alela i genotipova u grupi pacijenata sa redukovanom EF u odnosu na pacijente sa dijastolnom SI, kao između funkcionalnih klasa. Po našem saznanju u nekoliko kliničkih studija je ispitivan uticaj Ser<sup>49</sup>Gly genotipa na parametre remodelovanja LK i klinički tok bolesti, a dobijeni su kompleksni, nekada i nekonzistentni rezultati. Interesantni su rezultati studije Terra i sar. u kojoj je bilo uključeno 54 pacijenta sa sistolnom disfunkcijom. Naime, ova grupa autora je utvrdila da kod nosioca Gly<sup>49</sup> u toku primene metoprolol sukcinata duže od tri meseca postignuta statistički značajna redukcija endijastolnog dijametra u odnosu na nosioce Ser<sup>49</sup> (-2 mm vs +2 mm; P = .003) (183). Međutim, nije bilo razlike u promeni EF između ovih grupa. Slične rezultate dobila je druga grupa autora koja je kod pacijenata sa sistolnom SI u toku primene maksimalno tolerisane doze bisoprolola ili karvedilola. U ovoj studiji nisu merene vrednosti EDD (454). Na drugoj strani, u studiji Chen-a i sar. nije potvrđen značaj ovog polimorfizma u remodelovanju LK u toku hronične primene karvedilola kod pacijenta sa neishemijskom kardiomiopatijom (453). Kao i u gore pomenutim studijama, u proceni efikasnosti beta blokatora i ovde treba uzeti u obzir relativno kratku primenu leka, posebno ako se zna da su redukcija mase LK i porast EFLK najintenziviji u periodu od četvrtog do dvanaestog meseca primene beta blokatora (456).

Kako rezultati nedavno objavljene studije Mc Lean-a i sar. ukazuju, u toku hronične primene beta blokatora postoji genski uslovljena razlika u odgovoru na stimulaciju  $\beta_1$  i  $\beta_2$  receptora (457). Naime, ova grupa autora je ispitujući efekat infuzije

dopamina,  $\beta_1$  selektivnog agoniste, na srčanu frekvencu, udarni i minutni volumen, ustanovila da je kod homozigota za Arg<sup>389</sup> alel postignut statistički značajno veći terapijski odgovor u odnosu na nosioce barem jednog Gly<sup>389</sup> alela. Imajući u vidu da nije bilo razlike u srčanoj frekvenci između grupa, autori zaključuju da je različit fiziološki efekat između genotipova posledica različitog inotropnog i vazodilatatornog odgovora. Ovi rezultati, kao i gore pomenuti rezultati eksperimentalnih studija (184, 190), odnosno sličan nalaz kod zdravih dobrovoljaca (196), sugerišu da se radi o funkcionalno značajnom polimorfizmu  $\beta_1$  receptora.

Da varijabilnost  $\beta_1$  receptora može da ima veoma važan prediktivni značaj tolerancije fizičkog napora ukazuju rezultati Wagoner-a i sar. Ova grupa autora je ispitujući potrošnju kiseonika kod pacijenata sa idiopatskom ili ishemijskom kardiomiopatijom u toku fizičkog opterećenja utvrdila postojanje genski uslovljene razlike, odnosno statistički značajno veću potrošnju kiseonika kod homozigota za Arg<sup>389</sup> alel u odnosu na nosioce Gly<sup>389</sup> alela (200). Uključivanjem Ser<sup>49</sup>Gly polimorfizma u analizu, izdvojen je Gly<sup>49</sup>Arg<sup>389</sup> haplotip sa najvećom, a Ser<sup>49</sup>Gly<sup>389</sup> najmanjom potrošnjom kiseonika kod pacijenata sa SI, što je u skladu sa rezultatima Sandilandsa i sar. (458), kao i nešto ranije objavljene, gore pomenute, *in vitro* studije iste grupe autora (459). Značaj ovih rezultata je potenciran saznanjem da je tolerancija fizičkog napora u korelaciji sa preživljavanjem (460), što ukazuje na mogućnost da se na osnovu genotipa može predvideti nepovoljan klinički tok bolesti.

Na osnovu rezultata eksperimentalnih i kliničkih ispitivanja može se pretpostaviti da genotip  $\beta_1$  receptora utiče na ishod terapije beta blokatorima kod pacijenata sa SI. Imajući to u vidu ispitivali smo uticaj ovog polimorfizma na hospitalizaciju, potrebu za hitnom medicinskom pomoći (HMP) i mortalitetom grupe pacijenata sa SI koju smo mogli prospektivno da pratimo. Naši rezultati ukazuju da genska varijabilnost na položaju 389 ne utiče na ishod bolesti. U toku ovog perioda umrlo je 11 pacijenata i to 5 homozigota za Arg<sup>389</sup> i 6 nosioca barem jednog Gly<sup>389</sup> alela. U skladu sa našim rezultatima su nalazi većine studija u kojima je značaj polimorfizma određen u odnosu na mortalitet pacijenata sa dijagnostikovanom SI (444; 454 438). Između malobrojnih studija sa pozitivnim rezultatom izdvaja se subanaliza BEST studije. Kako rezultati Liggetta i sar. ukazuju kod pacijenata sa SI koji su homozigoti za Arg<sup>389</sup> alel, primenu bucindolola prati statistički značajnija redukcija petogodišnjeg mortaliteta u odnosu na pacijenate sa istim genotipom koji su dobijali placebo (HR 0.62; P=0.03) (194). Na drugoj strani, ovako povoljan ishod

lečenja bucindololom nije zabeležen kod nosioca jednog ili dva Gly<sup>389</sup> alela u poređenju sa pacijentima placebo grupe (HR 0.90; P=0.57). Pored toga, u placebo grupi nije zabeležena razlika u preživljavanju između nosioca različitih genetskih varijanti  $\beta_1$  receptora što sugeriše da na klinički tok srčane slabosti ovaj polimorfizam nema uticaj (194). Rezultati ove studije ističu ključne razlike bucindolola kao jedinog beta blokatora čija je terapijska efikasnost u redukciji mortaliteta genski uslovljena. Jedina studija u kojoj je primena beta blokatora, koji se rutinski koriste u SI, imala pozitivne rezultate je istraživanje Biolo-a i sar. Ovi autori su u opservacionoj studiji na 201 brazilskih ispitanika na terapiji visokim dozama karvedilola ili metoprolola (tartarata ili sukcinata) potvrdili višu stopu preživljavanja kod homozigota za Arg<sup>389</sup> alel u odnosu na nosioce Gly<sup>389</sup> alela (437). Delimično pozitivan rezultat zabeležili su autori jedne nedavno objavljene studije. Naime, Fiuzat i sar. su samo kod pacijenata koji su dobijali beta blokator u niskoj dozi uočili genski uslovljenu razliku u mortalitetu, odnosno višu stopu smrtnosti kod homozigota za Arg<sup>389</sup> u odnosu na nosioce barem jednog Gly<sup>389</sup> alela (461). Ovakve genski uslovljene razlike u mortalitetu nema, ukoliko se primenjuju visoke doze beta blokatora. Prema tome, rezultati ove studije sugerišu da bi se statistički značajna redukcija mortaliteta postigla, pacijente koji su homozigoti za Arg<sup>389</sup> treba lečiti visokim dozama beta blokatora, koje je, kako je utvrđeno u CIBIS-ELD studiji, moguće postići kod 31% pacijenata SI (462).

Hipoteza da bucindolol ima jedinstven farmakodinamski profil koji ga razlikuje od drugih beta blokatora, testira se u studiji u kojoj se njegova farmakogenetska efikasnost poredi sa metoprolol sukcinatom u lečenju SI i prevenciji AF. Dok se faza 3 ovog istraživanja ne završi, ideja da ovaj beta blokator ima selektivnu efikasnost kod pacijenata koji su homozigoti za Arg<sup>389</sup> alel u odnosu na nosioce Gly alela snažno podržava tu hipotezu. Svoj doprinos upoznavanju jedinstvenih farmakoloških karakteristika bucindolola dali su Bristow i sar. koji su detaljno analizirali rezultate BEST studije. Ovi autori su najpre utvrdili da su simpatolitička svojstva bucindolola izraženija u prisustvu delecije  $\alpha_{2c}$  receptora na položaju 322-325, kao i da je primena ovog leka kod pacijenata sa SI koji su nosioci Gly<sup>389</sup> alela i Del322-325 polimorfizma praćena povećanim mortalitetom (463). Ukoliko se uzme u obzir da je Gly<sup>389</sup> varijanta  $\beta_1$  receptora hipofunkcionalna (184), sa slabim afinitetom vezivanja NA (193), ovakav ishod primene bucindolola se može objasniti nemogućnošću ove receptorske varijante da u uslovima smanjenog oslobađanja NA (464) obezbedi adekvatnu inotropnu podršku insuficijentom srcu, te na ovaj način poništava efikasnost  $\beta$  blokade (463). Na osnovu ovih rezultata autori zaključuju da kombinacija Gly<sup>389</sup> alela  $\beta_1$  receptora i delecije  $\alpha_{2c}$  receptora na položaju 322-325

predstavlja „nepovoljan“ genotip i da ove pacijente ne treba lečiti bucindololom. Ukoliko su pacijenti nosioci „divljeg tipa“  $\alpha_{2c}$  receptora, redukcija oslobađanja NA bucindololom je blaga, sa neznatnim uticajem na efikasnost blokade Gly<sup>389</sup> varijante  $\beta_1$  receptora i terapijskim odgovorom kao kod primene ostalih beta blokatora (463). Na drugoj strani, kod nosioca Arg<sup>389</sup> alela  $\beta_1$  receptora, prisustvo delecije na položaju 322-325  $\alpha_{2c}$  receptora ne utiče na efikasnost bucindolola jer je povećana aktivnost ove varijante  $\beta_1$  receptora dovoljna da obezbedi kardijalnu podršku i u uslovima redukovanog oslobađanja NA (464). Pored toga, bucindolol na Arg<sup>389</sup> varijantu  $\beta_1$  receptora deluje kao inverzni agonista sa statistički značajnom redukcijom sinteze cAMP-a u ćelijama koje imaju samo ovu varijantu receptora u odnosu na Gly389 (194). Imajući u vidu da kod ovih pacijenata primena bucindolola postigla veću efikasnost u odnosu na druge beta blokatore, ovaj genotip se može smatrati „veoma povoljnim“ za njegovu primenu. Prema tome, autori analizirajući rezultate BEST substudije zaključuju da u celom kohortu pacijenata sa SI ukoliko se primenjuje bucindolol, kod 40% može se očekivati terapijski odgovor koji imaju i drugi beta blokatori, kod 50% efikasnost bucindolola biće veća, dok kod 10% pacijenata nema povoljnog terapijskog odgovora i ne treba ga primenjivati (465).

Kako rezultati nekih studija pokazuju, uticaj genotipa  $\beta_1$  receptora na terapijski značaj beta blokatora u redukciji mortaliteta pacijenata sa SI nije dostigao statističku značajnost. U najvećoj do sada prospektivnoj studiji, objavljenoj 2009. god. razlike u mortalitetu bilo je između nosioca Gly i Arg na položaju 389 u placebo grupi, dok genska varijabilnost  $\beta_1$  receptora nije uticala na mortalitet pacijenata koji su lečeni beta blokatorom (466). Slične rezultate su godinu dana ranije objavili Sehnert i sar. u čijoj je prospektivnoj studiji ukupno 637 pacijenata lečeno beta blokatorom bez genski uslovljene razlike u mortalitetu (467). Ni studija u kojoj je uticaj beta blokatora analiziran nakon 4 godine primene nije potvrdila uticaj genske varijabilnosti na položaju 389  $\beta_1$  receptora na mortalitet (468). Genetska analiza MERIT-HF studije (eng. Metoprolol CR/XL Randomized Intervention Trial in Heart Failure) iako je potvrdila gore navedene rezultate, ne može se uzeti u obzir u proceni uloge polimorfizma  $\beta_1$  receptora u terapijskom odgovoru metoprolol sukcinata jer su pacijenti sa istim genotipom prikazani u jednoj grupi, bez obzira da li su lečeni ovim beta blokatorom ili ne (469). Detaljnom analizom rezultata navedenih studija, može se odbaciti njihova kontradiktornost. Naime, istraživanjima Liggett-a i sar. je pokazano da postoji statistički značajna razlika u preživljavanju kod pacijenata sa istim genotipom u zavisnosti da li su dobijali ili ne beta blokator (194).

Drugim rečima, ovi autori su upoređivali mortalitet pacijenata sa istim genotipom sa i bez beta blokatora u terapiji. Na drugoj strani, dve studije u kojima nije zabeležena statistički značajna razlika u preživljavanju, analiziran je uticaj genotipa u grupi pacijenata na terapiji beta blokatorom (467, 468). Prema tome, ove dve studije nisu imale placebo grupu, što uvodi nezaobilaznu pristrasnost (bias) u tumačenju rezultata. Na drugoj strani, ukoliko se formira placebo grupa, otvaraju se nova pitanja, poput, zašto pacijenti nisu lečeni lekovima potvrđene efikasnosti, da li je netolerancija dobro procenjena, odnosno, da li nestabilnost SI u toj meri izražena da mora da se prekine primena beta blokatora. Osim toga, ove studije karakteriše nemogućnost kontrole primene leka. O primeni leka se zaključuje na osnovu izveštaja lekara ili izjave pacijenta, a ne na osnovu broja tableta. Još jedan problem ovih opservacionih studija je kako označiti pacijente koji su lečeni nekoliko meseci beta blokatorom, njihova primena zatim obustavljena i onda praćeni u dužem vremenskom periodu.

Iako u dostupnoj literaturi ima malo podataka o uticaju polimorfizma Ser<sup>49</sup>Gly na terapijsku efikasnost beta blokatora i remodelovanje LK, testirali smo hipotezu o uticaju ove genske varijabilnosti na mortalitet pacijenata sa SI. U grupi pacijenata koje smo mogli prospektivno da pratimo umrlo je 9 homozigota Ser<sup>49</sup> i 2 nosioca barem jednog Gly<sup>49</sup>. Ni ovaj rezultat nije imao statističku značajnost. Slična ispitivanja uticaja polimorfizma na položaju 49 imala su divergentne rezultate: u tri od pet studija potvrđen je statistički značajno veći mortalitet kod homozigota za Ser<sup>49</sup> β<sub>1</sub> receptora u odnosu na nosioce jednog ili dva Gly<sup>49</sup> alela (176, 438; 444), dok su negativne rezultate zabeležile dve studije. (437, 454). Borjesson i sar. u svojoj retrospektivnoj studiji na 184 pacijenta sa idiopatskom dilatantnom kardiomiopatijom (IDC) ustanovili da nije bilo statistički značajne razlike u preživljavanju homozigota za Ser<sup>49</sup> koji su lečeni beta blokatorima i nelečenih nosioca barem jednog Gly alela na položaju 49 gena za β<sub>1</sub> receptor (470). Slične rezultate iznose i Magnusson i sar. koji su utvrdili statistički značajno veću redukciju mortaliteta kod nosioca Gly<sup>49</sup> alela u odnosu na homozigote za Ser<sup>49</sup> u grupi pacijenata koja je dobijala niske doze beta blokatora (≤50% ciljne doze). Međutim, ukoliko su primenjene visoke doze beta blokatora genskom varijabilnoću β<sub>1</sub> receptora uslovljena razlika u preživljavanju ovih pacijenata se gubi zbog boljeg terapijskog odgovora nosioca Ser<sup>49</sup> alela. Isti autori navode da doza beta blokatora ne menja preživljavanje nosioca Gly<sup>49</sup> alela. Naime, slična redukcija mortaliteta je zabeležena kod nosioca Gly<sup>49</sup> alela koji su dobijali visoke (> 50%) i niske doze (≤50% ciljne doze) beta blokatora (444). Imajući u vidu da se rasna i etnička pripadnost odražava na razlike u distribuciji alela, strukturu haplotipova i mešavinu gena

(471), rezultate ovih studija treba tumačiti oprezno jer svi pacijenti pripadaju jednoj etničkoj grupi. Pored toga, ovi rezultati nisu potvrđeni u brazilskoj studiji Biolo-a i sar. u kojoj su uključeni i pacijenti sa ishemijskom etiologijom srčane slabosti (437). Prema tome, ove razlike ukazuju da treba biti kritičan prema preporuci da se kod homozigota za Ser<sup>49</sup> primenjuju veće doze beta blokatora, kao i da nosioci barem jednog Gly alela podjednaku korist imaju od niskih i visokih doza beta blokatora.

Na osnovu analize predstavljenih rezultata ovih istraživanja, može se zaključiti da genotip  $\beta_1$  receptora utiče na preživljavanje, a da primena beta blokatora umanjuje taj uticaj i vodi negativnom rezultatu. Drugim rečima, efikasnost sada dostupnih beta blokatora umanjuje suptilne razlike koje polimorfizam beta receptora može da ima na preživljavanje.

Razlike u plejotropnim efektima pojedinih beta blokatora takođe mogu biti značajne (472). U prilog činjenici da genski uslovljena razlika u preživljavanju nije karakteristika cele grupe, govore rezultati jedne nedavno objavljene studije u kojoj je preživljavanje homozigota za Arg<sup>389</sup> veće u odnosu na nosioca barem jednog Gly<sup>389</sup> alela ukoliko su dobijali karvedilol. Analizom rezultata grupe pacijenata na metoprololu nije registrovana statistička značajnost. Ovakav nalaz je od posebnog značaja zato što predstavlja prvi nalaz genski uslovljene razlike u ishodu terapije dva beta blokatora (473).

Primenom jedne nove eksperimentalne platforme, saznanja o fenotipskim razlikama Arg<sup>389</sup> i Gly<sup>389</sup> varijante  $\beta_1$  receptora su dopunjuju interesantnim otkrićima (474). Naime, Rochais i sar. su primenom tehnike bazirane na fluorescentnoj rezonanciji energetskeg transfera (eng. fluorescence resonance energy transfer–based (FRET–based) techniques) ispitivali molekularnu konformaciju Arg<sup>389</sup> i Gly<sup>389</sup> receptora nakon vezivanja agonista, noradrenalina i antagonista koji se primenjuju rutinski u lečenju pacijenata sa SI, metoprolola, bisoprolola i karvedilola. Za razliku od metoprolola i bisoprolola, karvedilol ima intezivniju inverznu agonističku aktivnost, koja je 2.5 puta izraženija na nivou Arg<sup>389</sup> varijante  $\beta_1$  receptora o odnosu na Gly<sup>389</sup>. Pored toga, smanjenje koncentracije cAMP-a kao rezultat nishodne regulacije receptora je intezivnija nakon primene karvedilola u odnosu na selektivne  $\beta_1$  blokatore, kao i na nivou  $\beta_1$  receptora sa argininom na položaju 389. Specifičnost ove genskom varijabilnošću uslovljene interakcije karvedilola sa  $\beta_1$  receptorom je potvrđena u prospektivnoj studiji Chen-a i sar. koji su ispitivali efikasnost primene karvedilola kod pacijenata sa neishemijskom kardiomiopatijom (453) i utvrdili veći porast EFLK kod homozigota Arg<sup>389</sup> alela u odnosu na nosioce Gly<sup>389</sup> alela.

Ove rezultate treba da potvrde velike prospektivne kliničke studije. To je najveći izazov za farmakogenetiku beta blokatora u SI. Osim toga, potrebno je ispitati da li postoje drugi geni koji su važni za efikasnost beta blokatora i razliku u njihovoj efikasnosti između rasa. To se, pre svega odnosi na gene iz neposredne okoline, ali i druge, za sada nepoznate gene, koji mogu na neki način modifikovati terapijski odgovor.

Jedno od ograničenja naše studije je relativno mali broj ispitanika. Međutim, to je po našem saznanju, prva studija koja je ispitivala značaj ovih polimorfizama u srpskoj populaciji na pojavu SI. Imajuću u vidu da je kod ispitivanih polimorfizama frekvencija alela bila veća od 10%, prema našim statističkim proračunima, veličina naše ispitivane grupa omogućuje da se otkrije statistički značajna razlika između ispitivane i kontrolne grupe. Međutim, za ispitivanje kombinacije više polimorfizama, odnosno interakcije između gena, potrebna je veća eksperimentalna grupa.

Saznanje da postoji velika interindividualna varijabilnost beta blokatora u terapijskoj efikasnosti i podnošljivosti kod pacijenta sa teškom SI (475, 476), podstaklo je napore da se dobije lek sa boljom antiadrenergičkom aktivnošću, ali nažalost, bez uspeha. Očekivanu efikasnost nisu potvrdile supstance koje imaju parcijalnu agonističku aktivnost (477), zatim koje pored blokade beta receptora aktiviraju  $\beta_3$  receptore (478; 479) ili imaju čistu simpatolitičku aktivnost (480). Osim toga, neefikasna je bila istovremena primena beta blokatora i inhibitora fosfodiesteraze 3 (481). Još neke mogućnosti za efikasniju antiadrenergičku terapiju treba testirati. To su pre svega istovremena primena  $\beta_1$  blokatora i  $\beta_2$  agoniste (482), farmakogenetski modifikovanog simpatolitičkog agensa koji će manje redukovati oslobađanje NA (463), primena beta blokatora sa inhibitorima CaMKII (483) ili supstancijama koje defosforilišu receptore i obnavljaju receptorsku funkciju (484), kao i prospektivno farmakogenetsko ispitivanje beta blokatora sa genotip-zavisnom aktivnošću (194). Iako se veruje da će jedan ili više ovih pristupa biti uspešno, činjenica da se to nije postiglo jednom supstancijom koja blokira  $\beta$  receptore potvrđuje efikasnost ovog vida terapije SI.

## **7.2 Značaj polimorfizma $\beta_2$ receptora u srčanoj insuficijenciji**

Dva najčešće proučavana polimorfizma na genu za  $\beta_2$  receptor su na poziciji 16 i 27, gde se mogu naći arginin (Arg-, „divlji tip“) ili glicin (Gly) na položaju 16, odnosno glutamin (Gln -“divlji tip“) ili glutaminska kiselina (Glu) na položaju 27. Iako ovi polimorfizmi nisu od značaja za aktivaciju adenilat ciklaze nakon vezivanja agonista za  $\beta_2$



receptor, mutant aleli Gly<sup>16</sup> i Glu<sup>27</sup> se razlikuje po intenzitetu nishodne regulacije u poređenju sa divljim tipom receptora (485). Naime, Gly<sup>16</sup> varijanta  $\beta_2$  receptora u prisustvu agoniste podleže intenzivnijoj nishodnoj regulaciji usled veće degradacije nakon internacionalizacije receptora. Ovakve funkcionalne karakteristike potvrđene su i u kulturi glatkomišićnih ćelija bronhijalnog stabla (486). Slični rezultati dobijeni su za Glu<sup>27</sup> varijantu receptora kod koje je homologna desensitizacija oskudna (485). Prema tome, dejstvo endogenih kateholamina može biti različito, te uprkos činjenici da se radi o diskretnom fenotipu, postoji mogućnost da bude potencijalno relevantan u stanjima kao što je srčana slabost, gde bi se u uslovima hronične adrenergičke stimulacije ispoljila genski determinisana različita aktivnost  $\beta_2$  receptora.

Imajući u vidu patofiziološki značaj genskog polimorfizama  $\beta_2$  receptora, izmenjen odnos  $\beta_1$  i  $\beta_2$  u SI, specifičnost signalne kaskade koju pokreće njihova aktivacija (64, 65) kao i oprečne podatke koji postoje u literaturi, želeli smo da ispitamo vezu između polimorfizma ovog receptora i SI. Ispitivana je učestalost Arg i Gly alela za  $\beta_2$  receptora u grupi pacijenata sa SI i u kontrolnoj grupi. Dobijeni rezultati ukazuju da frekvencija alela u ispitivanoj i kontrolnoj grupi nije značajno odstupala od očekivanih frekvencija, tj. bila u Hardy-Weinbergovom ekvilibrijumu. Potvrđeno je da genotip koji se po učestalosti izdvaja u ispitivanoj populaciji pacijenata sa SI je heterozigotni Arg<sup>16</sup>Gly (50,0% obolelih), zatim sledi homozigotni polimorfni (Gly<sup>16</sup>Gly) genotip koji je registrovan kod 42,5% ispitanika, dok je homozigotni genotip (Arg<sup>16</sup>Arg) najređi i prisutan je kod 7,5% pacijenata. Naši rezultati nisu pokazali značajnu razliku u zastupljenosti Arg<sup>16</sup>Gly polimorfizma između ispitivane i kontrolne grupe zdravih (6,7% Arg<sup>16</sup>Arg; 63,3%, Arg<sup>16</sup>Gly i 30,0% Gly<sup>16</sup>Gly). Interetničke razlike u frekvenciji Arg<sup>16</sup> i Gly<sup>16</sup> alela su mnogo manje u odnosu na gensku varijabilnost na položaju 27  $\beta_2$  receptora (487). Po našem saznanju, dve studije koje su ispitivale udruženost ovog polimorfizma sa pojavom SI dobile su slične rezultate. Covolo i sar. su u populaciji italijanskih ispitanika, 256 pacijenata sa SI i 230 zdravih osoba ispitivali distribuciju Arg<sup>16</sup>Gly i/ili Gln<sup>27</sup>Glu polimorfizma (443). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da genska varijabilnost na položaju 16  $\beta_2$  receptora ne utiče na pojavu srčane slabosti. Slične rezultate iznose i Matković i sar. u velikoj populacionoj studiji na ispitanicima u Americi, ispitujući značaj genske varijabilnosti  $\alpha_1$ ,  $\beta_2$  receptora, fosfolambana i HSP-a (eng. Heat Shock Protein) (488). Međutim, u literaturi su dostupni rezultati koji ukazuju na vezu između ispitivanog polimorfizma i pojave SI kod pacijenata sa dilatantnom kardiomiopatijom. Naime, istraživanje Forleo-a i sar. u koje je uključen 171

pacijent, je potvrdilo da kod homozigota za Glu<sup>27</sup>  $\beta_2$ receptor (i zbog vezanog nasleđivanja između SNP kodona 16 i 27, homozigota Gly<sup>16</sup>) postoji statistički značajno veći rizik za razvoj SI u odnosu na pacijente sa Arg<sup>16</sup> i Gln<sup>27</sup> varijantom  $\beta_2$  receptora (438).

Opisano je još osam SNP unutar 5' nekodirajućeg regiona (5' UTR upstream from the ATG start) od kojih su neki u "vezanom disekvilibrijumu" sa polimorfizmima na položaju 16 i 27 gena za  $\beta_2$  receptora. Po svom funkcionalnom značaju, ali i po vezanom nasleđivanju sa polimorfizmima iz kodirajućeg regiona, izdvaja se polimorfizam tj. tranzicija timina u guanin u položaju 47, što ima za posledicu zamenu cisteina u položaju 19 argininom (-47 (T→C) Cys-19Arg). Naime, kako rezultati McGraw i sar. ukazuju, ovaj SNP se nalazi na 102 bp od  $\beta$  kodirajućeg bloka i odgovoran je za regulaciju ekspresije  $\beta_2$  receptora (489). Regulacija se odvija na translacionom nivou i povezuje sa dva puta većom ekspresijom beta receptora ukoliko je prisutan Cys na poziciji 19 (489; 490) u odnosu na Arg. Ukoliko se uzme u obzir da zbog vezanog nasleđivanja nosioci dva alela Arg-19 su skoro uvek homozigoti za Glu<sup>27</sup>Glu (491), ali i za Gly na položaju 16 gena za  $\beta_2$  receptora, kao i da *in vitro* ispoljena smanjena aktivnost receptora nakon vezivanja agoniste (490), može se zaključiti da je haplotip Arg<sup>16</sup>Gln<sup>27</sup>, manje aktivna forma  $\beta_2$  receptora. Na osnovu ovih rezultata može se pretpostaviti da je fenotip ovog receptora deluje kao endogeni beta blokator, dok na drugoj strani mnogo aktivnija forma  $\beta_2$  receptora kod nosioca Gly<sup>16</sup> i Glu<sup>27</sup> alela može se dovesti u vezu sa povećanim rizikom za pojavu SI. Prediktivni značaj genotipa  $\beta_2$  receptora, kako rezultati Foleo i sar. ukazuju, ne zavisi od drugih faktora rizika koji su ranije potvrđeni (492).

Ukoliko se uzme u obzir da u SI postoji izmenjen odnos  $\beta_1$  i  $\beta_2$  receptora, kao i nedovoljno jasan funkcionalni značaj SNP  $\beta_2$  receptora, pretpostavili smo da nepovoljan klinički tok SI može biti, barem delom, genski determinisan. Prethodna saznanja o uticaju varijabilnosti gena za  $\beta_2$  receptor na agonistom-indukovanu nishodnu regulaciju receptora bila su nekonzistentna. Naime, dok je jedna grupa autora, na osnovu rezultata svoje *in vitro* studije, zaključila da Gly<sup>16</sup> varijanta  $\beta_2$  podleže intenzivnijoj nishodnoj regulaciji u odnosu na Arg<sup>16</sup> (485), do potpuno suprotnog rezultata došli su Dishy i sar. (493). Uočena razlika u rezultatima pomenutih studija može se objasniti dinamičkom regulacijom  $\beta_2$  receptora, odnosno činjenicom da osetljivija Gly varijanta receptora je već desenzibilisana pod uticajem endogenih kateholamina i da na egzogene agoniste reaguje samo Arg<sup>16</sup> varijanta (494). Ukoliko se uzme u obzir intenzivnija desenzitizacija varijante receptora sa glicinom na položaju 16, kod nosioca te „genske  $\beta$  blokade“ može se očekivati različit

odgovor na primenu  $\beta$  blokatora u odnosu na „divlji tip“ receptora. Zbog toga predmet našeg interesovanja je bila udruženost ovog polimorfizma sa nepovoljnim ishodom: potrebom za hitnom medicinskom pomoći (HMP), ponovnim prijemom u bolnicu (rehospitalizacija) zbog progresije bolesti i smrtnim ishodom. Najpre smo ispitivali vezu između genske varijabilnosti i preživljavanja pacijenata sa SI koji su dobijali beta blokator. U grupi pacijenata koje smo u proseku pratili 34,13 meseci  $\pm$  2,74 umrlo je 5 pacijenata sa genotipom Gly/Gly (11,4%) i 6 nosioca barem jednog Arg alela (10.2%), bez statistički značajne razlike u preživljavanju među genotipovima. Takođe nije bilo razlike u distribuciji Arg<sup>16</sup> i Gly<sup>16</sup> alela na genu za  $\beta_2$  receptor u grupi pacijenata koja je tražila HMP u odnosu na ostale. Osim toga, ispitivanjem frekvence Arg i Gly alela polimorfizma Arg<sup>16</sup>Gly je utvrđeno da u grupi pacijenata koji su rehospitalizovani nije postojala statistički značajna razlika u poređenju sa grupom pacijenata kod kojih nije bilo potrebe za ponovnim prijemom u bolnicu. Naše istraživanje je pokazalo da genska varijabilnost na položaju 16 gena za  $\beta_2$  receptor ne utiče na težinu kliničke slike. Naime, nije bilo statistički značajne razlike u distribuciji genotipova između pacijenata sa sistolnom i sistolno-dijastolnom SI u odnosu na pacijente sa dijastolnom SI, odnosno da nije bilo genski uslovljene statistički značajne razlike u svim merenim ehokardiografskim parametrima, srčanoj frekvenci i sistolnom i dijastolnom krvnom pritisku. Pored toga, između pacijenata koji su homozigoti za Gly<sup>16</sup> nije postojala statistički značajna razlika u postignutoj dnevnoj dozi karvedilola u odnosu na nosioce barem jednog Arg<sup>16</sup> alela, što ukazuje da ispitivani polimorfizam ne utiče na podnošljivost ovog neselektivnog beta blokatora kod pacijenta sa SI.

Nekoliko studija je istraživalo moguću vezu između Arg<sup>16</sup>Gly i Gln<sup>27</sup>Glu polimorfizama i mortaliteta kod pacijenta sa SI. U skladu sa našim rezultatima su rezultati Liggett-a i sar. (495). Ova grupa autora je, imajući u vidu da genska varijabilnost na položaju 16 i 27 može da utiče na fenotip  $\beta_2$  receptora, ispitivala frekvencu alela u grupi od 259 pacijenta sa SI, uzrokovane ishemijskom ili dilatantnom kardiomiopatijom, u odnosu na 212 ispitanika kontrolne grupe. Dobijeni rezultati nisu potvrdili hipotezu o uticaju ovih polimorfizama na ishod bolesti. Slične rezultate imala je studija De Groote i sar. u kojoj je nakon trogodišnjeg praćenja 444 pacijenta sa SI koji su dobijali bisoprolol ili karvedilol, nije potvrđen uticaj genske varijabilnosti  $\beta_1$  i  $\beta_2$  na preživljavanje (496), ali sa izraženom tendencijom kod pacijenta sa Gly<sup>16</sup>Gln<sup>27</sup> genotipom ka nižoj stopi preživljavanja.

Međutim, prema ranije objavljenim rezultatima, genska varijabilnost  $\beta_2$  receptora se može dovesti u vezu sa povećanim mortalitetom pacijenata sa SI. Naime, kako rezultati studije Shin-a i sar. pokazuju, prisustvo haplotipa Arg<sup>16</sup>Arg/Gln<sup>27</sup>Gln donosi dodatni rizik za fatalan ishod (468). U ovoj studiji multivarijatna regresiona analiza je potvrdila statistički značajnu povezanost između pet varijabla i lošeg ishoda. Ostali negenski faktori, čiji je uticaj na mortalitet potvrđen i u drugim studijama (497, 498), poput muškog pola, klirensa kreatinina, NYHA funkcionalne klase i koncentracije natrijuma u serumu, potvrđuju validnost izgrađenog modela uticaja na ishod bolesti, posebno, kako rezultati subanalize pokazuju, kod nosioca dve kopije ovog haplotipa koji nisu dobijali beta blokator. Prema tome, prisustvo ovog haplotipa povećava rizik koji beta blokatori umanjuju. Slične rezultate dobili su Lanfear i sar. u populaciji pacijenata koji su dobijali beta blokator nakon akutnog koronarnog sindroma (499). Ovi autori su utvrdili da homozigoti za Arg<sup>16</sup>Gln<sup>27</sup> haplotip imaju najveći mortalitet, nosioci barem jednog Gln<sup>27</sup> alela intermedijalni mortalitet, a najniži mortalitet imaju homozigoti za Gly<sup>16</sup>Glu<sup>27</sup> haplotip.

Imajući u vidu da su u našu opservacionu studiju o značaju genske varijabilnosti na položaju 16  $\beta_2$  receptora uključeni pacijenti sa SI koji su već dobijali beta blokator, nismo mogli da analiziramo značaj ovog polimorfizma na efekte beta blokade. U dostupnoj literaturi nalaze se studije koje su ispitivale potencijalnu interakciju između Arg<sup>16</sup>Gly i /ili Glu<sup>27</sup>Gln polimorfizma na genu za  $\beta_2$  receptor i terapijske efikasnosti beta blokatora. U studiji Kaye-a i sar. je potvrđena statistički značajna korelacija između povećanja EFLK i Glu<sup>27</sup>Gln polimorfizma (500). Ova grupa autora je utvrdila da je kod pacijenata sa SI u toku primene karvedilola, poboljšanje miokardne disfunkcije (mereno povećanjem EFLK za 10%) veće kod nosioca jednog ili dva Glu<sup>27</sup> alela u odnosu na homozigote za Gln<sup>27</sup> varijantu  $\beta_2$  receptora. Ukoliko se uzme u obzir činjenica da postoji vezano nasleđivanje između kodona 16 i 27 na genu za  $\beta_2$  receptor, može da se zaključi da će kod pacijenata kod kojih je karvedilol imao slabiji terapijski odgovor makar deo njih biti nosioci Arg<sup>16</sup>Gln<sup>27</sup> haplotipa, dok većina pacijenata koji su dobro reagovali na karvedilol ne nose Arg<sup>16</sup>Gln<sup>27</sup>. Slične rezultate su dobili Metra i sar. u nedavno objavljenom studiji u kojoj je, međutim, multivarijatna regresiona analiza pokazala da polimorfizam ima manji značaj u poređenju sa drugim kliničkim varijabilama kao što su etiologija SI, sistolni krvni pritisak i doza karvedilola (455). Međutim, u slično dizajniranoj američkoj studiji de Groote i sar. su potvrdili korisne efekte karvedilola u vidu statistički značajnog povećanja EFLK ali bez genski uslovljene varijabilnosti (454).

Interesantni su rezultati nedavno objavljene studije Mc Lean-a i sar. o genski uslovljenim razlikama u kardiovaskularnom odgovoru na stimulaciju  $\beta_2$  receptora (457). Naime, ova grupa autora je utvrdila da nakon primene terbutalina,  $\beta_2$  selektivnog agoniste, kod osoba koji su homozigoti za Glu<sup>27</sup> alel i imaju sniženu EFLK registruje se veće povećanje srčane frekvence, udarnog i minutnog volumena u odnosu na nosioce barem jednog Gln<sup>27</sup> alela. Imajući u vidu da se se kod zdravih ne beleži razlika u hronotropnom i inotropnom odgovoru na primenu terbutalina u zavisnosti od Gln<sup>27</sup>Glu genotipa  $\beta_2$  receptora (501, 502), kao i da u SI postoji ushodna regulacija ovih receptora (32), može se pretpostaviti da aktivnost  $\beta_2$  receptora postaje značajna u patološkim stanjima kao što je SI. Dobijeni rezultati su u skladu sa potvrđenom rezistencijom Glu<sup>27</sup> varijante receptora u uslovim konstantne simpatičke stimulacije (485; 503). Ukoliko se pored ovih, uzmu u obzir gore pomenuti rezultati Metra-e i sar. (455), koji su utvrdili značajnije povećanje EFLK u toku terapije karvedilolom kod homozigota za Glu<sup>27</sup>, odnosno Gly<sup>16</sup>, u odnosu nosioce barem jednog Gln<sup>27</sup>/Arg<sup>16</sup> alela, može se zaključiti da će kod ovih pacijenata primena beta blokatora biti najefikasnija, kao i da kod ovih pacijenta treba radi prevencije progresivnog remodlovanja LK što ranije uvesti beta blokatore. U prilog gore navedenih rezultata govori i nalaz našeg istraživanja da u grupi pacijenata sa redukovanom EFLK koji su homozigoti za Gly<sup>16</sup> postoji statistički značajna razlika u srčanoj frekvenci u odnosu na nosioce barem jednog Arg<sup>16</sup> alela.

Nekonzistentnost rezultata moguća je posledica različito dizajniranih studija. Naime, dok je naša grupa ispitanika heterogena, neke studije su uključivale samo pacijente sa sniženom EFLK i/ili SI određene etiologije. Uprkos različitoj etiologiji, kada miokardna disfunkcija postane simptomatska, progresija bolesti se značajno ne razlikuje (504). Ako se ima u vidu da je zadatak našeg istraživanja da ispita uticaj genskog polimorfizma na pojavu, klinički tok i ishod SI kod pacijenata koji dobijaju savremenu farmakoterapiju, isključivanjem jedne grupe (npr. sa dijastolnom SI) možda bi ugrozili taj cilj. U ispitivanoj grupi je dijastolnu SI, odnosno, SI sa očuvanom EFLK, imalo 21.1% pacijenata za koje se sada zna da imaju podjednako lošu prognozu kao i pacijenti sa redukovanom EFLK (505). Prema tome, naši pacijenti predstavljaju reprezentativnu populaciju pacijenata sa SI u pogledu primenjene savremene terapije i ishoda. Vrlo važna razlika analiziranih studija je dužina primene, kao i izbor beta blokatora. Postoje razlike između beta blokatora koje možda utiču na ispitivanu korelaciju između genske varijabilnosti i njihove terapijske efikasnosti. Dobro je poznato da su neka farmakološka dejstva svojstvena samo karvedilolu (472). Naime, karvedilol smanjuje presinaptičko oslobađanje noradrenalina

inhibicijom  $\beta_2$  receptora (446). Osim toga, jače vezivanje za  $\beta_1$  receptor u odnosu na metoprolol, čini njegovu blokadu stabilnijom sa perzistentnom antiadrenergičkom aktivnošću (506). Karvedilol i nebivolol smanjuju štetan efekat endotelina 1 na progresiju hipertrofije LK izazvane noradrenalinom (507). Prema tome, veoma je važno da se u istraživanjima koje ispituju farmakogenetske interakcije primenjuje standardna farmakoterapija, da se zbog farmakodinamskih razlika primenjuje isti beta blokator kod svih pacijenata, da se njegova doza postepeno povećava do maksimalne doze koju pacijent podnosi i doze treba pažljivo evidentirati (508).

Interindividualna varijabilnost SI u progresiji i terapijskom odgovoru primenjenih lekova je delom determinisana intrizičkim genetskim karakteristikama i spoljašnjim patogenetskim faktorima. Naše istraživanje je usmereno ka SNP  $\beta_1$  i  $\beta_2$  receptora, lokalizovanih u njegovom kodirajućem regionu, čije su detaljno proučene signalne fenotipske karakteristike poslužile kao strukturna i funkcionalna osnova kliničkih istraživanja. Na osnovu iznetih činjenica mogu se predvideti potencijalne kliničke implikacije farmakogenetike beta blokatora. Pre svega dosadašnja farmakogenetska saznanja mogu biti od značaja za selekciju pacijenata kod kojih varijabilnost u terapijskom odgovoru beta blokatora je genski determinisana. Naime, kao što je gore navedeno, postoji grupa genotipova koja nezadovoljavajuće reaguje na terapiju beta blokatorima [468; 499]. Uprkos ovom saznanju, a u skladu sa opšteprihvaćenim preporukama za upotrebu beta blokatora, teško je zamisliti da bi se na osnovu ovih genetskih informacija odustalo od primene ovih lekova. Međutim, gore opisani jedinstveni farmakološki profil bucindolola inicirao je da jedna mala farmaceutska kompanija traži od FDA odobrenje za ovaj lek za pacijente određenog genotipa. Ovaj FDA podnesak je prvi zahtev za registraciju nekog leka za specifičnu genetsku grupu, mimo onkološke terapije, i može da označi početak farmakogenetski vođene terapije u kardiologiji. Takođe, najnovija saznanja Rochais-a i sar. o intenzivnijoj blokadi karvedilolom Arg<sup>389</sup> varijante  $\beta_1$  receptora u odnosu na metoprolol i bisoprolol ukazuju na mogućnost primene određenog leka kod pacijenta sa specifičnim genotipom (474). Dalje, najnovija saznanja o farmakogenetici beta blokatora mogu se potencijalno iskoristiti za identifikaciju pacijenata sa genskom predispozicijom za slabiji terapijski odgovor ovih lekova. Kao što rezultati nekih studija ukazuju, to su nosioci Gly<sup>389</sup> varijante receptora koji slabije reaguje na beta blokadu i kod kojih treba insistirati na titraciji do ciljnih doza beta blokatora (190, 454). Na drugoj strani, kod pacijenata sa određenim genotipovima potrebne su veće doze beta blokatora radi kompenzacije većeg rizika koji taj

genotip nosi (509, 510). Ovakva farmakogenetska saznanja su dostupna i najlakše ih je implantirati.

U prošloj dekadi je neuspeh III faze kliničkih ispitivanja nekih lekova, poput blokatora endotelinskih i TNF receptora, inhibitora vazopeptidaza i fosfodiesteraza usledilo u trenutku kada je farmaceutska industrija u tu svrhu investirala milione dolara. Imajući u vidu da nije bilo prethodne selekcije pacijenta koji imaju slabiji terapijski odgovor na standardnu terapiju, može se pretpostaviti da bi farmakogenetska saznanja mogla pomoći da se izdvoji visoko rizična populacija pacijenata kod koje bi se efikasnost nekih od lekova u razvoju mogla lakše dokumentovati. Na osnovu trenutnih podataka, najbolji kandidati su nosioci Arg<sup>16</sup>Gln<sup>27</sup> haplotipa za  $\beta_2$  receptor, koji su pod povećanim rizikom za loš ishod uprkos primeni standardne terapije (468, 499). Ovakav pristup doprinosi smanjenju materijalnih troškova za razvoj leka ali može i da sačuva lekove koji inače ne bi bili u stanju da zadovolje kriterijume efikasnosti po FDA-u.

Prema tome, farmakogenetska saznanja potvrđuju uticaj genske varijabilnosti na dejstvo leka i obezbeđuju uvid u potencijalnu ulogu u korišćenju genetskih informacija radi unapređenja efikasnosti farmakoterapije. Na osnovu dosadašnje literature, može se pretpostaviti da će farmakoterapija SI predstavljati jednu od prvih područja gde će se genska varijabilnost koristiti za kontrolu terapije, posebno kod primene beta blokatora, a naročito kod pacijenata koji slabije reaguju na beta blokadu i potrebna im je dodatna terapija.

### **7.3 Populaciona farmakokinetička analiza**

Postojanje interindividualne varijabilnosti u odgovoru na lek, usled varijabilnosti u dispoziciji leka je veliki problem u terapiji i dosta se napora ulaže da se, tokom procesa razvoja leka, identifikuju faktori varijabilnosti. Imajući u vidu da je u toku kliničke faze razvoja leka, identifikuju faktori varijabilnosti. Imajući u vidu da je u toku kliničke faze razvojnog procesa varijabilnost velika, ne iznenađuje činjenica da individualni podaci ispitivanog leka, analizirani klasičnim pristupom, nisu često dovoljni za opisivanje varijabilnosti farmakokinetičkih (FK) ili farmakodinamskih (FD) parametara. Populacioni pristup analizi podataka omogućio je da se dobijene informacije o FK i FD u široj populaciji bolesnika stave u funkciju razvoja leka. Nelinearno modelovanje kombinovanih efekata, kao široko prihvaćeni pristup, omogućava pouzdanu procenu FK parametara. Pored toga, u cilju bezbedne i efikasne primene leka ovim pristupom se otkrivaju i objašnjavaju varijabilnosti u određenoj populaciji pacijenata. Iako je proces modelovanja kompleksan i zahtevan, ovo je nepravazidjen prisup u analizi podataka. Veruje se da će u

budućnosti otvoriti mogućnost simuliranja individualnog FK profila iz već postojećih populacionih modela.

Ovakav pristup ima poseban značaj u identifikaciji uzroka velike varijabilnosti u terapijskom odgovoru  $\beta$  blokatora, čija se primena u SI komplikuje neophodnošću pažljivog monitoringa i spore titracije. Uprkos pažljivoj titraciji kod 25% pacijenata dolazi do obustave leka zbog neželjenih efekata.

### 7.3.1 Populaciona farmakokinetička analiza bisoprolola

Osnovni cilj našeg istraživanja je da se razvije populacioni farmakokinetički model bisoprolola kod pacijenta sa SI. Kao što rezultati ukazuju, tipična populaciona vrednost klirensa bisoprolola, utvrđena u baznom modelu, iznosi  $11.4 \text{ l h}^{-1}$ . Ova vrednost je niža od ukupnog klirensa bisoprolola kod zdravih dobrovoljaca ( $14.2\text{--}15.6 \text{ l h}^{-1}$ ) (511, 512). Po našem saznanju ovo je prva studija u kojoj je ispitivan klirens bisoprolola kod pacijenta sa SI, tako da nismo u prilici da ove uporedimo sa rezultatima drugih studija. Dnevna doza bisoprolola se izdvaja kao najznačajnija varijabla našeg finalnog modela koji glasi:  $CL (\text{l h}^{-1}) = 4.68 + 0.859 * DD$

U istraživanju koje su sprovedeli Taguschi i sar., u grupi japanskih pacijenata, potvrđen uticaj telesne mase (TM) i klirensa kreatinina (CLcr) na individualni oralni klirens bisoprolola (CL/F). Utvrđena vrednost prosečnog CL/F je  $0.0612 * TM + 1.15 * CLcr$  ( $\text{l h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ ), dok je rezidualna interindividualna varijabilnost CL/F 22.0% (513). Na korelaciju između CLcr i CL/F, kako su rezultati ove studije ukazuju, CYP2D6 i CYP2C19 genotip, pol i starost pacijenta nisu imali statistički značajan uticaj. U našoj populacionoj FK istraživanju nije ispitivan uticaj polimorfizma CYP2D6 na klirens bisoprolola zbog malog broja pacijenta za takvu vrstu analize. Međutim, na osnovu rezultata brojnih studija može se zaključiti da nerenalni (metabolički) klirens ovog leka ne zavisi od CYP2D6 genotipa (514-516). Prema ranije objavljenim rezultatima ovaj genotip ne utiče na koncentraciju bisoprolola u plazmi i stepen adrenergičke inhibicije (516). U prilog ove tvrdnje govore rezultati studije Horokiri-ja i sar. (514), koji su utvrdili da je udeo CYP2D6 relativno mali i iznosi 7%, dok se veći deo hepatičkog klirensa (28%) odvija preko CYP3A4. Za razliku od bisoprolola, koncentracije metoprolola i karvedilola kod nosioca alela sa redukovanom aktivnošću CYP2D6 su veće u odnosu na nosioce funkcionalnih alela (242, 517, 518). Pored toga, u grupi sporih metabolizera metoprolol postiže statistički značajnu veću redukciju srčane frekvence i pad krvnog pritiska (231, 519).



Naše istraživanje je utvrdilo da je dnevna doza bisoprolola jedini značajan faktor koji utiče na klirens bisoprolola kod pacijenata sa SI, što je posebnog značaja kod blago narušene bubrežne ili jetrene funkcije kada je bisoprolol dobar terapijski izbor (520). U prilog ovoj tvrdnji govore rezultati jedne studije u kojoj je potvrđeno da farmakodinamika bisoprolola nije promjenjena u eksperimentalnom modelu akutne bubrežne insuficijencije (521).

Druga važna implikacija povećanja klirensa bisoprolola sa povećanjem dnevne doze je relativno širok terapijski prozor bisoprolola koji njegovu primenu čini lakšom i bezbednijom. Kada se povećava dnevna doza bisoprolola, u nastojanju da se postignu željeni terapijski efekti kod pacijenata sa SI, povećavaće se i klirens, što smanjuje rizik od prekomerenog porasta koncentracije leka u plazmi i njegove toksičnosti.

Ovakav amortizujući efekat nije nađen kod drugih beta blokatora, što daje prednost bisoprololu kada se poredi sa podjednako efikasnim lekovima iz ove grupe. Ovaj naš rezultat je jedinstven i možda specifičan za pacijente sa SI.

U ovom farmakokinetskom istraživanju smo određivali ukupnu koncentraciju bisoprolola jer, po rezultatima nekih studija, nema značajnije razlike u farmakokinetici enantiomera nakon primene racemata (514, 522, 523).

Naš populacioni FK model klirensa bisoprolola, rutinski primenjenog kod pacijenta sa SI, je ukazao da je ukupna dnevna doze bisoprolola jedina značajna kovarijanta. Ovaj podatak doprinosi bezbednoj primeni bisoprolola kao selektivnog,  $\beta_1$  blokatora u SI. Međutim, treba naglasiti da se naš rezultat odnosi na primenu bisoprolola u običajnom doznom opsegu kod pacijenta kod kojih je blago narušena funkcija jetre ili bubrega. Potrebna su dalja istraživanja za utvrđivanje populacionih FK karakteristika bisoprolola kada je prisutna bubrežna ili jetrena insuficijencija.

### **7.3.2 Populaciona farmakokinetska analiza karvedilola**

U drugom populacionom FK istraživanju ispitivali smo uticaj različitih varijabla na klirens karvedilola kod pacijenta sa SI. Dobijeni rezultati ukazuju se kao najznačajnija kovarijanta finalnog modela izdvaja telesna masa pacijenta.

Na početku istraživanja određena je tipična populaciona vrednost klirensa karvedilola kod pacijenata sa SI. Dobijena vrednost je iznosila  $43.8 \text{ Lh}^{-1}$  i bila u skladu sa rezultatima ranijih istraživanja (30 to  $42 \text{ Lh}^{-1}$ ) (1). Osim toga, u ovoj fazi su zabeležena velika interindividualna i rezidualna varijabilnost.

U okviru našeg istraživanja, ispitivana je distribucija CYP2D6\*4, nefunkcionalnog alela CYP2D6 gena, koji je glavni polimorfizam koji uslovljava smanjenje aktivnosti enzima, kao i njegov uticaj na koncentraciju i farmakokinetiku karvedilola u ravnotežnom stanju kod pacijenata sa SI. Kod osoba koje se definišu kao spori metabolizeri (eng. poor metabolisers –PMs), nosioca dva nefunkcionalna alela CYP2D6 gena, CYP2D6\*4 je, kao što je gore navedeno, najčešći alel. Distribucija ultrabrzih metabolizera, odnosno nosioca multiplih kopija funkcionalnih alela, nije ispitivana zbog očekivano niske frekvence, utvrđene u prethodnim istraživanjima (524). Rezultati naših ispitivanja ukazuju da je heterozigotni i homozigotni polimorfni CYP2D6 \*4/ CYP2D6 \*4 genotipovi retki, što je u skladu sa rezultatima drugih studija (524, 525). O uticaju ovog polimorfizma na farmakokinetiku karvedilola dobijeni su kontradiktorni rezultati. Dok su zaključci dve grupe autora u skladu sa našim rezultatima (526, 527), da prisustvo polimorfnog CYP2D6 \*4 alela statistički značajno ne menja farmakokinetiku karvedilola, rezultati Giessmann-a i sar. tvrde suprotno. Naime, ova grupa autora je analizirajući uticaj CYP2D6, CYP2C9 i transportnih proteina ustanovila da je kod osoba sa redukovanom aktivnošću CYP2D6 statistički značajno ( $p < 0.05$ ) manja površina ispod krive (AUC), odnosno količina leka u organizmu (242). Imajući u vidu da u grupi naših pacijenata nije bilo homozigota, već samo heterozigota sa intermedijalnom aktivnošću ovog enzima, kao i da su neki drugi faktori značajni za apsorpciju i eliminaciju karvedilola (241, 242), ne možemo sa sigurnošću isključiti uticaj ovog polimorfizma na klirens karvedilola.

Protok krvi kroz jetru je važna determinanta klirensa karvedilola. Koncentracije leka, izmerene kod pacijenata sa SI su za 30-40% veće nego kod zdravih dobrovoljaca (526). Međutim, uprkos poznatoj korelaciji između kontraktilne sposobnosti LK i EF sa jedne strane i protoka kroz jetru sa druge strane, EF nije imala statistički značaj uticaj na klirens karvedilola. Slične rezultate su dobili i drugi autori (Saito M, Biol Pharm Bull, 2010; 526). Moguće objašnjenje za ovakav rezultat je činjenica da smo u ispitivanoj grupi imali više pacijenta koji su imali dijastolnu disfunkciju i EF veću od 40%, dok je sa EF između 30 i 40% imalo deset, a manje od 30% samo sedam pacijenata. Na osnovu ovih rezultata može se pretpostaviti da značajan uticaj na klirens karvedilola imaju samo vrednosti EF manje od 30%.

Za metabolizam karvedilola u jetri značajni su još CYP2C9 i CYP1A2 i to otvara mogućnost interakcija sa drugim lekovima. Imajući to u vidu očekivali smo da će lekovi koji koriste pomenute metaboličke puteve, kao što su amjodaron, varfarin, aminofilin, inhibitori protonske pumpe i digoksin, uticati na klirens karvedilola ukoliko se primene

istovremeno. Međutim, osim digoksina, nijedan od nabrojanih lekova nije imao statistički značajan uticaj na klirens karvedilola što se može objasniti činjenicom da postoje paralelni metabolički putevi karvedilola u jetri koji nisu nikada u potpunosti blokirani komedikacijom, kao i da je slobodni kapacitet dovoljan za njegovu eliminaciju.

Naše istraživanje je utvrdilo da je na veliku varijabilnost karvedilola kod pacijenta sa SI najveći uticaj imaju telesna masa, komedikacija digoksinom i pušenje. Prema tome, da bi postigla maksimalna terapijska efikasnost uz minimalnu toksičnost, potrebno je doziranje karvedilola uskladiti sa telesnom masom. Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim populacionim FK modelovanjem karvedilola drugih autora (526). Međutim, u našem završnom modelu je kvantifikovan uticaj telesne mase na klirens karvedilola, što može da bude posebno značajno za pacijente bele rase koji nisu obuhvaćeni ranijim populacionim farmakokinteskimi analizama.

Pacijenti ispitivane grupe su imali standardnu terapiju za SI koja uključuje ACEi ili ARA, diuretike, spirinolakton, digoksin, statine i niske doze acetilasalicilne kiseline. Skoro 35% pacijenata je bio na komedikaciji digoksinom. Oba leka, karvedilol i digoksin, su supstrati za P-glikoprotein (P-gp) što vodi, kako rezultati nekih studija ukazuju, povećanju koncentracije digoksina zbog kompetitivne inhibicije P-gp (526). Koncentracija digoksina se povećava za 15%, i to nalaže da se u slučaju istovremene primene prati koncentracija digoksina. Međutim, kako rezultati našeg istraživanja ukazuju, primena digoksina značajno povećava klirens karvedilola, + 22.5 Lh<sup>-1</sup>. Iako mehanizam na koji digoksin povećava klirens karvedilola nije poznat, ukoliko se ova dva leka istovremeno koriste treba pažljivo dozirati i pratiti koncentraciju u plazmi i karvedilola.

Imajući u vidu učestalost pušenja u grupi naših ispitanika, postavili smo hipotezu značajnosti ovog faktora za populacionu vrednost klirensa karvedilola. Rezultati našeg istraživanja su potvrdili navedenu prepostavku i istakli pušenje kao značaj faktor koji povećava klirens karvedilola. Poznato je da kod pušača može biti izmenjen metabolizam lekova koji se najvećim delom metabolišu preko CYP1A2, delimično CYP2E1 i nekih UDP-glukuronoziltransferaza (eng. UDP-glucuronosyltransferases). Ako se ima u vidu da je izoforma CYP1A2 jedna od CYP enzima koji učestvuju u metabolizmu karvedilola, kao i da postoji mogućnost direktne glukurokonjugacije (241), možemo zaključiti da povećana ili smanjena aktivnost bilo kog metaboličkog puta može imati samo ograničeni uticaj na individualni klirens karvedilola.

Prema tome, naš PFK model klirensa karvedilola kod pacijenata sa SI ukazuje na značaj telesne mase, komedikacije digoksinom i pušenja kao najznačajnih faktora za farmakokinetiku varijabilnost karvedilola.

Naši modeli ocenjuju varijabilnost beta blokatora u populaciji pacijenata sa SI. Dobijena je matematička veza između relativnog klirensa i nekih individualnih karakteristika kao što su telesna masa, komedikacija ili dnevna doza leka. Ovim se postiže kvalitativna korekcija predviđanja da li je koncentracija leka pri datom režimu supterijska, terapijska ili toksična (424). Osnovni cilj evaluacija farmakokinetičkih parametara ovih lekova, uz pomoć softverske obrade koju omogućava NONMEM, je da olakša lekarima u kliničkoj praksi da dozne režime individualno prilagode. Ovaj zadatak je posebno važan kada se određuje terapija pacijentu koju će primenjivati do kraja života.

#### **7.4 Značaj polimorfizma CYP2D6 u srčanoj insuficijenciji**

Imajući u vidu da je da su o uticaju polimorfizma CYP2D6 na farmakokinetiku karvedilola dobijeni kontradiktorni rezultati (1-4), ispitivali smo metodom standarne višestruke regresije uticaj pola, polimorfizma CYP2D6 i klirensa kreatinina na korigovanu koncentraciju karvedilola u plazmi (koncentracija u plazmi/dnevna doza/TM). Dobijeni model u kojem ova tri faktora daju statistički značajan jedinstven dopinos objašnjava 23,3% varijanse korigovane koncentracije karvedilola (korigovano  $r^2=0,19$ ). Najznačajniji dopinos, kako naši rezultati ukazuju, u varijabilnosti koncentracije karvedilola ima polimorfizam CYP2D6. U skladu sa našim rezultatima su rezultati Seht-a i sar. koji su utvrdili da 35.7% varijabilnosti ukupnog klirensa R-karvedilola i 15.3% S-karvedilola može se objasniti uticajem CYP2D6 genotipa (528).

Kako bi testirali hipotezu o uticaju polimorfizama CYP2D6 na terapijski odgovor karvedilola izvršili smo farmakokinetičko-farmakodinamsko-farmakogenetsku analizu dobijenih podataka. Naime, metodom standarne višestruke regresije ispitivali smo uticaj korigovane koncentracije karvedilola, polimorfizma CYP2D6, NYHA klase, sistolnog krvnog pritiska, komedikacije digoksinom na srčanu frekvencu pacijenata sa SI. U dobijenom modelu od ovih pet parametara, statistički značajan pojedinačan dopinos od 11.3% ima samo korigovana koncentracija karvedilola. Dobijeni nalaz je u potpunoj saglasnosti sa prethodnom studijom u kojoj je pokazano da je uticaj polimorfizma CYP2D6 ograničen na farmakokinetiku karvedilola (528). Naime, ovom studijom je takođe pokazano da genotip CYP2D6 ne utiče na srčanu frekvencu, arterijski krvni pritisak i pojavu neželjenih dejstava karvedilola. Postoje nekoliko mogućih objašnjenja zbog čega

farmakokinetika, CYP2D6-povezana, varijabilnost ne menja farmakodinamiku leka. Prvo, uticaj polimorfizma na koncentraciju, posebno *S*-karvedilola je mali i odgovoran je za oko 15% varijabilnosti. Drugo, aktivni metabolit, R-OH-karvedilol, je 13 puta aktivniji od primarnog leka i značajno doprinosi njegovoj efikasnosti (243). Na kraju, osim velike interindividualne varijabilnosti afiniteta i maksimalne efikasnosti, kako rezultati Sehart i sar. ukazuju, koncentraciju *S*-karvedilola, pri vrednostima koje su veće od 10nmol/l, treba udvostručiti da bi se frekvencija smanjila za dva otkucaja u minuti (528).

Treba naglasiti da postoje izvesna ograničenja u tumačenju ovih rezultata. Najpre, iako su neke studije koristile uzorake slične veličine (528), broj uključenih pacijenata je bio relativno mali što povećava rizik od lažno negativnih rezultata. Pored toga, na kliničke efekte mogu uticati i drugi nefarmakogenetski faktori, kao što je komorbiditet i primena lekova koji su slabi inhibitori poput amjodarona i diltiazema.

U ovom istraživanju ispitivali smo značaj genskih polimorfizama na genima za  $\beta_1$  i  $\beta_2$  receptore i CYP2D6 u nameri da proverimo da li se pomenuti polimorfizmi mogu iskoristiti kao biomarkeri terapije beta blokatorima. Na putu od funkcionalne genomike do racionalne terapije vrlo značajno mesto zauzima farmakokinetiko-farmakodinamsko-farmakogenetska analiza. Ukoliko se analizira uticaj genske varijabilnosti na farmakokinetiku jednog leka mogu se dobiti samo surogat parametri sa nejasnim kliničkim značajem. Na drugoj strani, ukoliko se analizira farmadinamika ili ishod terapije bez poznavanja farmakokinetike, ostaje nejasno koji i koliko gena mogu uticati na efikasnost leka.

## 7.5 Značaj polimorfizma TNF- $\alpha$ u srčanoj insuficijenciji

Kao što je gore navedeno, TNF- $\alpha$  je proinflamatorni citokin koji posle inicijalnog oštećenja i aktivacije imunog sistema doprinosi progresiji SI (365). Imajući u vidu udruženost -308 G/A polimorfizma sa povećanom endotoksin stimulisanom produkcijom TNF- $\alpha$  u leukocitima (405), koji mogu biti značajan izvor ovog citokina u SI, testirali smo hipotezu o značaju ovog polimorfizma kod pacijenata sa SI.

Dobijeni rezultati našeg ispitivanja pokazali su da je učestalost genotipova -308 G/A (GG, GA, AA) polimorfizma gena za TNF- $\alpha$  u ispitivanoj i kontrolnoj grupi bila u Hardy-Weinbergovom ekvilibrijumu. U obe grupe najčešći je homozigotni -308 G/G genotip (52,3% u SI i 62,9% u KG), sledi heterozigotni -308 G/A (47,7% u SI i 35,5% u

KG), a najmanje je zastupljen homozigotni A/A genotip (0% u SI i 1.6% u KG). Nema statistički značajne razlike u distribuciji genotipova između ispitivane i kontrolne grupe.

Kako rezultati populacionih studija pokazuju postoji velika interetnička i rasna varijabilnost u zastupljenosti ovog polimorfizma u zdravoj populaciji. U većini studija najzastupljeniji je GG genotip i prisutan je kod 60-70% zdravih pripadnika bele rase, GA genotip kod 30-40%, dok je najređi homozigotni A/A genotip prisutan kod 1,5-3% pripadnika bele rase (421). U našim istraživanjima učestalost genotipa u zdravoj populaciji je u saglasnosti sa dosadašnjim istraživanjima (400, 434).

Ispitivanje distribucije polimorfnih alela i genotipa u odnosu na pol nisu pokazala značajne razlike. Iako je frekvencija A alela bila manja kod žena (14%) u odnosu na muškarce (28%), ali ta razlika nije bila statistički značajna.

Do sada su publikovane samo dve studije koje potvrđuju udruženost polimorfizma TNF 308 G→A sa pojavom SI. Kako rezultati ovih studija ukazuju, u grupi pacijenata sa idiopatskom kardiomiopatijom (IDC) postoji veća zastupljenost polimorfniog A alela u odnosu na kontrolu (529, 530). Međutim, u dostupnoj literaturi ima i suprotnih rezultata, najpre kod pacijenata sa IDC (434, 447, 531), ali i kod heterogene grupe pacijenata sa SI (400). Pozitivni rezultati o vezi ovog polimorfizma i pojave SI kod pacijenata sa IDC mogu se barem delimično objasniti posebnim značajem koji ima TNF- $\alpha$  u patogenezi autoimunog miokarditisa nakon virusne infekcije. Naime, kako rezultati nekih studija ukazuju, u eksperimentalnom modelu virusnog encefalomiokarditisa, primena TNF- $\alpha$  povećava koncentraciju virusa u miokardu, nekrozu i celularnu infiltraciju miokarda (532), dok anti-TNF- $\alpha$  terapija smanjuje morbiditet i mortalitet eksperimentalnih životinja (533). Kao što je gore navedeno, brojni su mehanizmi kojim TNF- $\alpha$  može narušiti miokardnu funkciju i uključuju redukciju intracelularnog kalcijuma (329), desenzitizaciju kardiomiocita na kalcijum, izmenu funkcije NO sintetaze, aktivaciju metaloproteinaza, direktni negativni inotropni efekat (328) ili apoptozu kardiomiocita (534). Međutim, u prilog tvrdnji da su povišene vrednosti TNF- $\alpha$ , prisutne kod 35% pacijenata sa IDC (292), ne uzrok, već posledica srčane slabosti ukazuju rezultati studije Anker-a i sar. o povećanoj produkciji TNF- $\alpha$  koju podstiče povećani priliv endotoksina iz tankog creva (286).

Na osnovu naših rezultata o distribuciji polimorfniog alela i genotipa u ispitivanim grupama može se zaključiti da polimorfizam u promotoru TNF gena -308 nema značajnu ulogu u pojavi SI. Mogući uticaj na ovakav ishod našeg istraživanja ima heterogenost grupe u koju su uključeni pacijenti sa različitim trajanjem bolesti. Ako se pretpostavi da su

isti genetski faktori od značaja za morbiditet i mortalitet pacijenata sa SI, u ovako heterogenoj grupi uticaj genetskog faktora može biti maskiran.

Imajući u vidu da aktivacija imunog sistema i proinflammatoryh citokina ima važnu ulogu u patogenezi i progresiji SI (262), kao i da je genski polimorfizam u promotoru TNF gena -308 odgovoran za povećanu sintezu TNF- $\alpha$  i da može doprineti progresiji srčane slabosti povećavajući njegovu plazma ili tkivnu koncentraciju, testirali smo hipotezu da prisustvo A alela ima nepovoljan uticaj na sistolnu funkciju i težinu kliničke slike. Ispitivanje zastupljenosti genotipa između različitih funkcionalnih klasa pokazalo je statistički značajno veću učestalost mutiranog A alela i genotipa GA u grupi pacijenata sa NYHA klasom I-II (58.1%), u poređenju sa grupom pacijenata sa NYHA klasom III (18.2%). Statističku značajnost imala je razlika u distribuciji genotipova zabeležena između funkcionalnih klasa u grupi pacijenata muškog pola. U skladu sa ovim rezultatima je i nalaz statistički značajno niže vrednosti EF koji su imali nosioci GG genotipa ( $29,37 \pm 8,13$ ) u odnosu na nosioce GA genotipa ( $36,00 \pm 5,46$ ). Dobijeni rezultati su jedinstveni budući da u dostupnoj literaturi nema informacija o ovakvom uticaju ispitivanog polimorfizma na klinički tok SI. Manja zastupljenost polimorfnog A alela kod pacijenata sa težom kliničkom slikom nije u saglasnosti sa podacima iz literature. Na osnovu dosadašnjih saznanja možemo pretpostaviti da malobrojni homozigoti za polimorfni A alel imaju maligniji klinički tok i umiru pre javljanja u tercijalnu zdravstvenu ustanovu. Međutim, postoje i rezultati koji pokazuju da polimorfizam na TNF genu u položaju -308 ne utiče na klinički tok SI. Jedina prospektivna studija o uticaju polimorfog A alela na nepovoljan tok remodelovanja LK i miokradnu disfunkciju je istraživanje Brooksbank-a i sar. u kojem, u grupi od 331 pacijenta sa IDC nije potvrđena genski uslovljena razlika u dimenzijama LK i sistolnoj funkciji (531). Potvrdu ovih rezultata dala je i studija preseka Tret-a i sar. (447), kao i malo, slično dizajnirano, istraživanje Ito-a i sar (529). Ove razlike u rezultatima su najverovatnije uslovljene etničkim i rasnim varijacijama, ali i razlikama u izboru pacijenata i veličini ispitivanog uzorka.

Značaj ovog polimorfizma je potvrđen kod pacijenta sa pogoršanjem hronične SI ali ne i kod novonastale akutne dekompenzacije (535). Imajući u vidu da je kod pacijenata sa hroničnom SI vrednost TNF- $\alpha$  u cirkulaciji viša u odnosu na nivo kod novonastale SI, iako nije potvrđena udruženost polimorfizma -308 G/A sa povećanom koncentracijom TNF- $\alpha$ , može se pretpostaviti da su ove razlike delom genetski determinisane. Slični rezultati o značaju ovog polimorfizma dobijeni su kada je ishemijska bolest srca u pitanju. Kako rezultati brojnih studija o uticaju polimorfizma na promotoru gena za TNF- $\alpha$  na

pojavu ishemijske bolesti srca (IBS) pokazuju, ne postoji razlika u distribuciji alela između bolesnika i zdravih nosioca, kao i između bolesnika sa ili bez infarkta miokarda (536, 537). Pored toga, nije potvrđen uticaj ovog polimorfizma na angiografski i autopsijski nalaz prisustva i broja stenoza koronarnih arterija (537). Bez obzira što su rezultati jedne nedavne studije utvrdili statistički značajnu razliku između nosioca različitih alela kod pacijenta sa akutnim infarktom miokarda u produkciji TNF- $\alpha$ , TACE, kao i nivou TNF- $\alpha$  u cirkulaciji (538), potrebna su nova prospektivna ispitivanja o značaju polimorfizma gena za TNF- $\alpha$  -308 G/A u pojavi IBS, posebno ukoliko se ima u vidu da opsežna eksperimentalna istraživanja nisu doprinela da se različiti efekti TNF- $\alpha$  u ishemiji mogu u potpunosti shvatiti. Naime, dok na jednoj strani rezultati nekih studija ističu značajnu ulogu TNF- $\alpha$  u povećanju infarktne zone (539,540) i stepena miokardne disfunkcije (541), na drugoj strani je potvrđeno, TNFR2 posredovano, kardioprotektivno dejstvo TNF- $\alpha$  (311, 542).

Naši rezultati nisu pokazali statistički značajnu razliku u potrebi za hitnom medicinskom pomoći, rehospitalizaciji i mortalitetu između nosilaca GG, GA i AA genotipa. Budući da u ispitivanoj grupi nije bilo homozigota za polimorfni A alel, nismo u mogućnosti da procenimo njegov uticaj klinički tok i ishod. Iako ne možemo da isključimo mogućnost da su i drugi faktori važni za razvoj SI, potrebna su dodatna ispitivanja da se razjasni prognostički značaj polimorfizma TNF gena, posebno kod pacijenata kod kojih se miokardna disfunkcija razvija posle infarkta miokarda. Prema tome, genotipizacija nije neophodna za lečenje SI, ali je potrebna za procenu rizika kod pacijenata koji imaju pridružena kliničkih stanja poput IBS i diabetesa (543).

Budući da se imuna aktivacija i vegetativna disregulacija, dve važne karakteristike SI, gotovo istovremeno javljaju u ranoj fazi razvoja miokardne disfunkcije, ispitali smo njihovu povezanost, analizirajući korelaciju između različitih indeksa varijabilnosti srčane frekvence (eng. heart rate variability- HRV) i koncentracije TNF- $\alpha$  u serumu. Pored toga, ispitali smo uticaj polimorfizma na promotoru gena na poziciji -308 na neke indekse HRV i koncentraciju TNF- $\alpha$  u serumu.

Ovim smo istraživanjem potvrdili ranija zapažanja koja su ukazivala na obrnutu korelaciju između koncentracije TNF- $\alpha$  i indeksa varijabilnosti srčane frekvence kod bolesnika sa SI. U našoj studiji, SDNN, SDANN i HRVi su značajno i inverzno korelirali sa nivoom TNF- $\alpha$  u plazmi, što ukazuje da je viši nivo TNF- $\alpha$  u korelaciji sa nižom varijabilnošću srčane frekvence. Jača korelacija je nađena kod osoba ženskog pola, pacijanata sa dijabetes melitusom i nosioca polimorfnog A alela.



Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima Malave i sar. (544) koji su ukazali na obrnutu vezu između povišenog nivoa TNF- $\alpha$  u plazmi i indeksa smanjene varijabilnosti srčane frekvence kod pacijenata sa blagom-do-umerenom SI. Isti autori su pokazala i da je koncentracija cirkulišućeg TNF- $\alpha$  u plazmi bolji nezavisni prediktor smanjene HRV od koncentracije noradrenalina u cirkulaciji, što ukazuje na direktnu povezanost ovih varijabli. U drugoj studiji je potvrđena značajna korelacija između nekih indeksa varijabilnosti srčane frekvence i koncentracije solubilnih receptora za TNF- $\alpha$  (sTNF-RI, sTNF-RII) i IL-6 (545). Međutim, slično istraživanje kod pacijenata sa dekompenzovanom SI imalo je suprotne rezultate: jaka negativna korelacija je dokazana između HRV i nivoa IL-6 u sistemskoj cirkulaciji, ali ne i između nivoa TNF- $\alpha$  i bilo kog indeksa varijabilnosti srčane frekvence (546).

Dobro je poznato da u SI postoji pozitivna korelacija između nivoa inflamatornih citokina, kao što su TNF- $\alpha$ , IL-1b, IL-6 i IL-18, i težine i prognoze bolesti (309, 547, 547). Uprkos činjenici da mehanizmi imune aktivacije u SI nisu u potpunosti definisani, nesporno je da je autonomni disbalans povezan, i prema našim rezultatima, može biti delimično posledica imune aktivacije.

TNF- $\alpha$  je snažan proinflamatorni citokin čije su povišene vrednosti u snažnoj korelaciji sa progresijom SI (28, 365) koja nastaje usled hipertrofije kardiomiocita (323), kontraktilne disfunkcije (331) i remodelovanja leve komore (309). Međutim, neka nova saznanja, pre svega o njegovoj brznoj biosintezi TNF- $\alpha$  u kardiomiocitima i drugim ćelijama u miokardu, kao i nekim njegovim protektivnim efektima u akutnom ishemijskom oštećenju, ukazuju na to da TNF- $\alpha$  ima kompleksnu funkciju koja još uvek u potpunosti nije definisana (354).

Budući da su rezultati nekih studija ukazali da se sinteza TNF- $\alpha$  u miokardu ne može povezati sa povišenom koncentracijom ovog citokina u plazmi, naročito kod bolesnika sa blagom i umerenom HSI (549, 550 kao i da na bioaktivnost TNF- $\alpha$  u serumu utiče koncentracija solubilnih TNF- $\alpha$  receptora (551-553) može se pretpostaviti da je indukcija citokina u miokardu relativno kasni događaj u patogenezi SI, što delimično objašnjava postojanje kontradiktornih rezultata u humanim studijama. Na osnovu rezultata nekih studija, pre svega koji potvrđuju korelaciju između koncentracije TNF- $\alpha$  u plazmi i ekspresije iRNK u miokardu, može se pretpostaviti da je koncentracija ovog citokina adekvatan marker miokardne citokinske aktivacije, nezavisno od uticaja drugih faktora kao što su klirens i stvaranje TNF- $\alpha$  u nemiokardnim tkivima (549).

Izmenjena HRV ukazuje na smanjenu parasimpatičku i povećanu simpatičku aktivnost, praćena je povećanjem nekih markera inflamacije kod bolesnika sa dijabetes melitusom (554) ali i sa smanjenom tolerancijom na glukozu (555), hipertenzijom (556), mentalnom depresijom (557), ili ishemijskom bolešću srca (558). Framingham studija je pokazala da je SDNN značajan prediktor mortaliteta bilo kog uzroka, po isključivanju drugih faktora rizika (559). Neki indeksi HRV, kao što su SDNN i SDANN, odražavaju simpatički i parasimpatički uticaj na srčanu frekvencu, sa potvrđenom vezom između nižih vrednosti i relativnom dominacijom simpatikusa (560).

Imajući u vidu da se autonomni disbalans u SI, naročito promene u vagusnoj kontroli srčane frekvence, javlja već u ranoj fazi razvoja disfunkcije leve komore (561), može se pretpostaviti da bi mogao da posluži kao zanimljiva potencijalna meta u farmakoterapiji SI. Ohrabrujuće rezultate u tome dala je jedna mala pilot studija koja je na uzorku od 32 ispitanika pokazala da električnu stimulaciju vagusa prati značajno poboljšanje NYHA funkcionalne klase, kvaliteta života, 6-minutnog testa hodanja, EF leve komore i sistolne zapremine leve komore (562). Ovu studiju je podstakla dokazana efikasnost električne stimulacije vagusa u eksperimentalnim modelima SI (563). Za potvrdu potencijalne terapijske strategije u SI neophodne su randomizirane kontrolisane kliničke studije na adekvatnom broju ispitanika. Naši rezultati ukazuju da hronična sistemska inflamacija niskog stepena, koja prati autonomni disbalans u SI, može biti dobar marker neinvazivne selekcije bolesnika koji bi imali koristi od vagalne stimulacije ili imunološke terapije, kao što je nespecifična imunomodulacija ili primena intravenskih imunoglobulina.

Treba istaći da postoje značajna ograničenja pri interapretaciji prikazanih rezultata. Prvo, broj kontrolnih ispitanika je relativno mali u odnosu na grupu bolesnika sa SI. Ipak, uprkos tome, sigurni smo da restriktivni kriterijumi uključivanja, određena homogenost varijanse pre analize i homogenost dobijenih rezultata za kontrolne ispitanike, su dovoljni za validno statističko poređenje kontrolne grupe sa grupom bolesnika sa SI. Osim toga, slične studije su (544) u svojim analizama koristile uzorke slične veličine. Drugo ograničenje studije je da je analiziran samo jedan citokin. Iako postoji interesovanje za ispitivanjem većeg broja različitih proinflamatornih citokina kod bolesnika sa SI kao biomarkera težine i prognoze bolesti, TNF- $\alpha$  se smatra jednim od osnovnih prediktora pogoršanja SI i povećanja mortaliteta. U nedavno objavljenom preglednom članku (564), autori su obradili veliki broj značajnih istraživanja o funkciji različitih inflamatornih biomarkera u SI. Većina studija ističe da je TNF- $\alpha$  jedan od najspecifičnijih citokina

povezanih sa prognozom i predviđanjem prognoze bolesti. U skladu sa tim je i činjenica da davanje TNF- $\alpha$  eksperimentalnim životinjama, kao i da prekomerna ekspresija TNF- $\alpha$  kod transgenih životinja, replikuje fenotip SI (324), što dodatno ide u prilog značajnosti uloge TNF- $\alpha$  u patogenezi ove bolesti. Uzimajući u obzir sve prethodno izloženo, izabrali smo ovaj citokin za analizu i utvrđivanje njegove veze sa HRV. Ipak, naše istraživanje ne umanjuje značaj drugih citokina, niti isključuje njihovu ulogu u patofiziologiji SI.

Tokom ovog istraživanja smo došli do novih saznanja koja se tiču uticaja polimorfizma -308G/A. Iako smo pronašli značajnu vezu između kako stepena autonomnog disbalansa, posredstvom analize HRV, tako i nivoa TNF- $\alpha$  sa polimorfizmom -308G/A, dobijene rezultate bi trebalo uzeti sa rezervom zbog relativno male veličine uzorka.

Na kraju, možemo zaključiti na osnovu prezentovanih rezultata da je povišen serumski nivo TNF- $\alpha$  u značajnoj vezi sa smanjenjem indeksa varijabilnosti srčane frekvence, što ukazuje da je aktivacija imunog sistema kod bolesnika sa SI u vezi sa autonomnim disbalansom.

## 8 ZAKLJUČCI

### **Značaj polimorfizma -389 Arg/Gly gena za $\beta_1$ adrenergički receptor u srčanoj insuficijenciji**

- Distribucija genotipova i učestalost 389 Arg i Gly varijante  $\beta_1$  adrenergičkog receptora slična je kod bolesnika sa SI i kod zdravih ispitanika: ređa Gly varijanta ispitivanog polimorfizma nije udružena sa pojavom SI.
- Kod pacijenata sa SI, koji su nosioci Arg<sup>389</sup> alela, ne postoji razlika u težini bolesti u odnosu na nosioce Gly<sup>389</sup> alela.

### **Značaj polimorfizma 49 Ser/Gly gena za $\beta_1$ adrenergički receptor u srčanoj insuficijenciji**

- Učestalost Ser i Gly alela na položaju 49 gena za  $\beta_1$  adrenergički receptora slična je kod bolesnika sa SI i kod zdravih ispitanika
- Kod pacijenata sa SI, nema statistički značajnog uticaja Ser<sup>49</sup>Gly polimorfizam gena za  $\beta_1$  receptor na težinu bolesti, klinički tok i ishodu bolesti

### **Značaj polimorfizma 16 Arg/Gly gena za $\beta_2$ adrenergički receptor u srčanoj insuficijenciji**

- Nema statistički značajne razlike u varijabilnosti na položaju 16 gena za  $\beta_2$  receptor između ispitivane i kontrolne grupe
- U ispitivanoj grupi nije bilo statistički značajne razlike u distribuciji alela i genotipova Arg<sup>16</sup>Gly polimorfizma na težinu kliničke slike, rehospitalizaciju i mortalitet pacijenata
- Kod pacijenata sa sistolnom SI koji su homozigoti za Gly na položaju 16 gena za  $\beta_2$  receptor postoji statistički značajna razlika u srčanoj frekvenci u odnosu na nosioce bar jednog Arg alela

### **Značaj polimorfizma CYP2D6 u metabolizmu karvedilola i bisoprolola u srčanoj insuficijenciji**

- Polimorfizam CYP2D6 ima statistički značajan uticaj na korigovanu koncentraciju karvedilola, ali ne i na srčanu frekvencu
- Polimorfizam CYP2D6 ima značajan uticaj na korigovanu koncentraciju bisoprolola kod pacijenata sa EF nižom od 40%

### **Značaj polimorfizma -308 G/A gena za TNF alfa u srčanoj insuficijenciji**

- Distribucija genotipova i učestalost G i A alela polimorfizama -308 G/A gena za TNF- $\alpha$  slična je kod bolesnika sa SI i kod zdravih ispitanika: retki A alel ispitivanog polimorfizma nije udružen sa pojavom SI
- Kod pacijenata sa SI NYHA I-II funkcionalne klase postoji veća učestalost polimorfnog A alela
- Postoji značajna korelacije između polimorfizama -308 G/A gena za TNF- $\alpha$  sa indeksima varijabilnosti srčane frekvence, što ukazuje da je aktivacija imunog sistema kod bolesnika sa SI u vezi sa autonomnim disbalansom

### **Populacioni farmakokinetički modeli beta blokatora**

- Populacionom farmakokinetičkom analizom utvrđeno je da ukupna dnevna doza jedina značajna kovarijanta klirensa bisoprolola
- U populacionoj farmakokinetičkoj analizi karvedilola utvrđeno je da telesna masa, komedikacija digoksinom i pušenje imaju najveći uticaj na klirens karvedilola kod pacijenata sa SI

## 9 LITERATURA

- 1 Bristow MR, Ginsburg R, Minobe WA, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB. Decreased catecholamine sensitivity and b-adrenergic receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 1982;307:205–211.
- 2 Fowler MB, Bristow MR. Rationale for beta-adrenergic blocking drugs in cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1985;55:D120–D124.
- 3 Bristow MR. Pathophysiologic and pharmacologic rationales for clinical management of chronic heart failure with beta-blocking agents. *Am J Cardiol* 1993; 71:12C–22C.
- 4 Eichhorn EJ, Bristow MR. Medical therapy can improve the biologic properties of the chronically failing heart: a new era in the treatment of heart failure. *Circulation* 1996;94:2285–2296.
- 5 Chidsey CA, Braunwald E, Morrow AG. Catecholamine excretion and cardiac stores of norepinephrine in congestive heart failure. *Am J Med* 1965;39: 442– 51.
- 6 Levine TB, Francis GS, Goldsmith SR, Simon AB, Cohn JN. Activity of the sympathetic nervous system and renin-angiotensin system assessed by plasma hormone levels and their relation to hemodynamic abnormalities in congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1982; 49:1659-1666.
- 7 Hasking GJ, Esler MD, Jennings GL, Burton D, Johns JA, Korner PI. Norepinephrine spillover to plasma in patients with congestive heart failure: evidence of increased overall and cardiorenal sympathetic nervous activity. *Circulation*. 1986; 73:615-2
- 8 Esler M, Kaye D. Measurement of sympathetic nervous system activity in heart failure: the role of norepinephrine kinetics. *Heart Fail Rev.* 2000; 5:17-25.
- 9 Kaye DM, Lefkowitz J, Jennings GL, Bergin P, Broughton A, Esler D. Adverse consequences of high sympathetic nervous activity in the failing human heart. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26:1257–1263
- 10 Kaye DM, Lambert GW, Lefkowitz J, Morris M, Jennings G, Esler MD. Neurochemical evidence of cardiac sympathetic activation and increased central nervous system norepinephrine turnover in severe congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1994; 23:570-8.
- 11 Gupta R, Tang WH, Young JB. Patterns of betablocker utilization in patients with chronic heart failure: experience from a specialized outpatient heart failure clinic. *Am Heart J* 2004;147:79– 83.
- 12 Bristow MR, Minobe W, Rasmussen R, Larrabee P, Skerl L, Klein JW, Anderson FL, Murray J, Mestroni L, Karwande SV, Fowler M, Ginsburg R. b-adrenergic neuroeffector abnormalities in the failing human heart are produced by local, rather than systemic mechanisms. *J Clin Invest* 1992; 89: 803– 815.
- 13 Rundquist B, Elam M, Bermann-Sverrisdottir Y, Eisenhofer G, Friberg P. Increased cardiac adrenergic drive precedes generalized sympathetic activation in human heart failure. *Circulation* 1997;95:169 – 175.
- 14 Francis GS, Benedict C, Johnstone DE, Kirlin PC, Nicklas J, Liang CS, Kubo SH, Rudin-Toretzky E, Yusuf S. Comparison of neuroendocrine activation in patients with left ventricular dysfunction with and without congestive heart failure. A substudy of the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *Circulation*. 1990; 82: 1724-9.
- 15 Watson AM, Hood SG, May CN. Mechanisms of sympathetic activation in heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006; 33: 1269– 1274
- 16 Walsh RA. Sympathetic control of diastolic function in congestive heart failure. *Circulation* 1990;82 (suppl.2): 152-158.
- 17 Lamba S, Abraham WT. Alterations in adrenergic receptor signaling in heart failure. *Heart Fail Rev.* 2000; 5:7-16.
- 18 Ginsburg R, Esserman LJ, Bristow MR. Myocardial performance and extracellular ionized calcium in a severely failing human heart. *Ann Intern Med* 1983;98:603– 606.
- 19 Ungerer M, Böhm M, Elce JS, Erdmann E, Lohse MJ. Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation.* 1993;87:454-63.
- 20 Bristow MR, Hershberger RE, Port JD, et al. Betaadrenergic pathways in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Circulation* 1990;82:112– 25.
- 21 Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ: Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 1997; 390: 88–91.
- 22 Bristow MR, Anderson FL, Port JD, Skerl L, Hershberger RE, Larrabee P, O'Connell JB, Renlund DG, Volkman K, Murray J, et al. Differences in beta-adrenergic neuroeffector mechanisms in ischemic versus idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 1991; 84: 1024-39.

- 23 Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature*. 2002; 415:206-12.
- 24 Fowler MB, Laser JA, Hopkins GL, Minobe W, Bristow MR. Assessment of the b-adrenergic receptor pathway in the intact failing human heart: progressive receptor down-regulation and subsensitivity to agonist response. *Circulation* 1986;74: 1290–1302.
- 25 Colucci WS, Denniss AR, Leatherman GF, Quigg RG, Ludmer PL, Marsh JD, Gauthier DF. Intracoronary infusion of dobutamine to patients with and without severe congestive heart failure. *J Clin Invest* 1988; 81:1103–1110.
- 26 White M, Yanowitz F, Gilbert EM, Larrabee P, O’Connell JB, Anderson JL, Renlund D, Mealey P, Abraham WT, Bristow MR. Role of beta-adrenergic receptor downregulation in the peak exercise response of patients with heart failure due to idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1995;76:1271– 1276.
- 27 Bristow MR. Mechanism of action of beta-blocking agents in heart failure. *Am J Cardiol* 1997; 80:26-40.
- 28 Mann DL, Kent RL, Parsons B, Cooper G. 4th. Adrenergic effects on the biology of the adult mammalian cardiocyte. *Circulation* 1992;85: 790-804.
- 29 Heilbrunn SM, Shah P, Bristow MR, Valentine HA, Ginsburg R, Fowler MB. Increased b-receptor density and improved hemodynamic response to catecholamine stimulation during long-term metoprolol therapy in heart failure from dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1989;79:483– 490.
- 30 Waagstein F, Caidahl K, Wallentin I, Bergh CH, Hjalmarson Å. Long-term b-blockade in dilated cardiomyopathy. Effects of short- and long-term metoprolol treatment followed by withdrawal and readministration of metoprolol. *Circulation* 1989; 80:551–563.
- 31 Hall JA, Kaumann AJ, Brown MJ. Selective b1-adrenoceptor blockade enhances positive inotropic responses to endogenous catecholamines mediated through b2-adrenoceptors in human atrial myocardium. *Circ Res* 1990;66:1610– 1623.
- 32 Bristow MR, Ginsburg R, Umans V, Fowler M, Minobe W, Rasmussen R, et al. Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res* 1986; 59:297-309.
- 33 El-Armouche A, Pamminger T, Ditz D, Zolk O, Eschenhagen T. Decreased protein and phosphorylation level of the protein phosphatase inhibitor-1 in failing human hearts. *Cardiovasc. Res*. 2004; 61: 87–93
- 34 Huang L, Tholanikunnel BG, Vakalopoulou E, et al. The M(r) 35,000 beta-adrenergic receptor mRNA-binding protein induced by beta agonists requires both an AUUUA pentamer and U-rich domains for RNA recognition. *J Biol Chem* 1993; 268: 25769-25775.
- 35 Port JD, Huang LY, Malbon CC. Beta receptor agonists that downregulate receptor mRNA upregulate a M(r) 35,000 protein(s) that selectively binds to beta adrenergic receptor mRNAs. *J Biol Chem* 1992;267:24103-24108.
- 36 Pende A, Mitchusson KD, DeMaria CT, Blaxall BC, Minobe WA, Sherman JA, Bisognano JD, Bristow MR, Brewer G, Port J.. Regulation of the mRNA-binding protein AUF1 by activation of the beta-adrenergic receptor signal transduction pathway. *J Biol Chem* 1996; 271: 8493-8501.
- 37 Bristow MR, Hershberger RE, Port JD, Minobe W, Rasmussen R. Beta 1- and beta 2-adrenergic receptor-mediated adenylate cyclase stimulation in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Bristow MR, Hershberger RE, Port JD, Minobe W, Rasmussen R. Mol Pharmacol*. 1989; 35:295-303.
- 38 Leineweber K, Rohe P, Beilfuss A, Wolf C, Sporkmann H, Bruck H, Jakob HG, Heusch G, Philipp T, Brodde OE. G-protein-coupled receptor kinase activity in human heart failure: effects of beta-adrenoceptor blockade. *Cardiovasc Res*. 2005; 66:512-9.
- 39 Laccarino G, Barbato E, Cipolletta E, De Amicis V, Margulies KB, Leosco D, Trimarco B, Koch WJ. Elevated myocardial and lymphocyte GRK2 expression and activity in human heart failure. *Eur Heart J*. 2005;26:1752-8
- 40 Brodde OE, Bruck H, Leineweber K. Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance. *J Pharmacol Sci*. 2006; 100:323-37.
- 41 Rengo G, Lymperopoulos A, Leosco D, Koch WJ. GRK2 as a novel gene therapy target in heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;50:785-92
- 42 Grimm M, Gsell S, Mittmann C, Nose M, Scholz H, Weil J, et al. Inactivation of G $\alpha$  proteins increases arrhythmogenic effects of  $\beta$ -adrenergic stimulation in the heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1998; 30:1917–1928.
- 43 Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, Holubarsch C, Posival H, Just H, Drexler H. Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res*. 1994; 75:434-42

- 44 Sabbah HN, Sharov VG. Apoptosis in heart failure. *Prog Cardiovasc Dis*. 1998; 40:549-62
- 45 Reiken S, Gaburjakova M, Guatimosim S, Gomez AM, D'Armiento J, Burkhoff D, Wang J, Vassort G, Lederer WJ, Marks AR. Protein kinase A phosphorylation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) in normal and failing hearts. Role of phosphatases and response to isoproterenol. *J Biol Chem*. 2003; 278:444-53
- 46 Hobai IA, O'Rourke B. Decreased sarcoplasmic reticulum calcium content is responsible for defective excitation-contraction coupling in canine heart failure. *Circulation*. 2001; 103:1577-84.
- 47 Lehnart SE, Schillinger W, Pieske B, Prestle J, Just H, Hasenfuss G. Sarcoplasmic reticulum proteins in heart failure. *Ann N Y Acad Sci*. 1998; 853:220-30
- 48 Bers DM, Pogwizd SM, Schlotthauer K. Upregulated Na/Ca exchange is involved in both contractile dysfunction and arrhythmogenesis in heart failure. *Basic Res Cardiol*. 2002;97 Suppl 1:136-42.
- 49 Beltrami CA, Finato N, Rocco M, Feruglio GA, Puricelli C, Cigola E, Sonnenblick EH, Olivetti G, Anversa P. The cellular basis of dilated cardiomyopathy in humans. *J Mol Cell Cardiol*. 1995; 27:291-305
- 50 Tan LB, Benjamin IJ, Clark WA. Beta-adrenergic receptor desensitization may serve a cardioprotective role. *Cardiovasc Res* 1992; 26:608–614.
- 51 Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G, Nicotera P. Role of Ca<sup>2+</sup> in toxic cell killing. *Trends Pharmacol Sci* 1989; 10:281–285.
- 52 Tanaka M, Ito H, Adachi S, Akimoto H, Nishikawa T, Kasajima T, Marumo F, Hiroe M. Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res* 1994; 75:426–433.
- 53 Communal C, Singh K, Pimentel DR, Colucci WS. Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of beta-adrenergic pathway. *Circulation* 1998; 98:1329–1334.
- 54 Turer AT, Malloy CR, Newgard CB, Podgoreanu MV. Energetics and metabolism in the failing heart: important but poorly understood. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010; 13: 458-65.
- 55 Sabbah HN, Sharov VG, Lesch M, Goldstein S. Progression of heart failure. A role for interstitial fibrosis. *Mol Cell Biochem*. 1995;147:29–34.
- 56 Katz AM. The cardiomyopathy of overload: an unnatural growth response in the hypertrophied heart. *Ann Intern Med*. 1994; 121:363-71.
- 57 Feldman DS, Carnes CA, Abraham WT, Bristow MR. Mechanisms of disease: beta-adrenergic receptors--alterations in signal transduction and pharmacogenomics in heart failure. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2005; 2:475-83.
- 58 Sucharov CC. Beta-adrenergic pathways in human heart failure. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2007; 5:119-24
- 59 Sucharov CC, Mariner PD, Nunley KR, Long C, Leinwand L, Bristow MR. A beta1-adrenergic receptor CaM kinase II-dependent pathway mediates cardiac myocyte fetal gene induction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291:H1299-308
- 60 Brodde OE, Bruck H, Leineweber K, Seyfarth T. Presence, distribution and physiological function of adrenergic and muscarinic receptor subtypes in the human heart. *Basic Res Cardiol*. 2001; 96:528-38
- 61 Gilman AG. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem*. 1987; 56:615-49.
- 62 Gerhardstein BL, Puri TS, Chien AJ, Hosey MM. Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the beta 2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels. *Biochemistry*. 1999;38:10361-70.
- 63 Kaumann AJ, Hall JA, Murray KJ, Wells FC, Brown MJ. A comparison of the effects of adrenaline and noradrenaline on human heart: the role of beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the stimulation of adenylate cyclase and contractile force. *Eur Heart J*. 1989; 10 Suppl B: 29-37.
- 64 Zaccolo M. Spatial control of cAMP signalling in health and disease. *Curr Opin Pharmacol*. 2011; 11:649-55.
- 65 Xiao RP, Ji X, Lakatta EG. Functional coupling of the beta 2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol Pharmacol*. 1995; 47:322-9
- 66 Kilts JD, Gerhardt MA, Richardson MD, Sreeram G, Mackensen GB, Grocott HP, White WD, Davis RD, Newman MF, Reves JG, Schwinn DA, Kwatra MM. Beta2-Adrenergic and several other G protein-coupled receptors in human atrial membranes activate both Gs and Gi. *Circ Res*. 2000; 87, 705– 709.
- 67 Xiao RP, Zhu W, Zheng M, Cao C, Zhang Y, Lakatta EG, Han Q. Subtype-specific alpha1- and beta-adrenoceptor signaling in the heart. *Trends Pharmacol Sci*. 2006; 27:330-7.
- 68 Kenakin T. New concepts in drug discovery: collateral efficacy and permissive antagonism. *Nat Rev Drug Discov*. 2005; 4:919-27.

- 69 Zhu WZ, Wang SQ, Chakir K, et al. Linkage of  $\beta$ 1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin kinase II. *J Clin Invest* 2003; 111:617-25.
- 70 Crespo P, Cachero TG, Xu N, and Gutkind JS. Dual effect of b-adrenergic receptors on mitogen-activated protein kinase: evidence for a bg-dependent activation and a Gas-cAMP-mediated inhibition. *J Biol Chem* 1995; 270:25259-25265.
- 71 Noma T, Lemaire A, Naga Prasad SV, Barki-Harrington L, Tilley DG, Chen J, Le Corvoisier P, Violin JD, Wei H, Lefkowitz RJ, Rockman HA. Beta-arrestin-mediated beta1-adrenergic receptor transactivation of the EGFR confers cardioprotection. *J Clin Invest*. 2007; 117:2445-58.
- 72 Zhang T, Brown JH. Role of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res*. 2004; 63:476-86
- 73 Wang W, Zhu W, Wang S, Yang D, Crow MT, Xiao RP, Cheng H. Sustained beta1-adrenergic stimulation modulates cardiac contractility by  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin kinasesignaling pathway. *Circ Res*. 2004; 95:798-806.
- 74 Olofsson MH, Havelka AM, Brnjic S, Shoshan MC, Linder S. Charting calcium-regulated apoptosis pathways using chemical biology: role of calmodulin kinase II. *BMC Chem Biol*. 2008; 8:2.
- 75 Hoch B, Meyer R, Hetzer R, Krause E-G, Karczewski P. Identification and expression of  $\gamma$ -isoforms of the multifunctional  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 1999; 84:713–21.
- 76 Kirchhefer U, Schmitz W, Scholz H, Neumann J. Activity of cAMPdependent protein kinase and  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc Res* 1999; 42:254–61.
- 77 Zhu W, Zou Y, Shiojima I, et al.  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase II and calcineurin play critical roles in endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 2000; 275:15239–45.
- 78 Singh K, Xiao L, Remondino A, Sawyer DB, Colucci WS. Adrenergic regulation of cardiac myocyte apoptosis. *J Cell Physiol*. 2001; 189:257-65.
- 79 Colucci WS, Sawyer DB, Singh K, Communal C. Adrenergic overload and apoptosis in heart failure: implications for therapy. *J Card Fail*. 2000; 6: 1-7.
- 80 Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002; 3:639-50.
- 81 Wieland T, Lutz S, Chidiac P. Regulators of G protein signalling: a spotlight on emerging functions in the cardiovascular system. *Wieland T, Lutz S, Chidiac P. Curr Opin Pharmacol*. 2007;7:201-7
- 82 Ferguson SS. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev*. 2001;53:1-24
- 83 Hendriks-Balk MC, Peters SL, Michel MC, Alewijnse AE. Regulation of G protein-coupled receptor signalling: focus on the cardiovascular system and regulator of G protein signalling proteins. *Eur J Pharmacol*. 2008;585:278-91
- 84 Balmforth AJ, Shepherd FH, Warburton P, Ball SG. Evidence of an important and direct role for protein kinase C in agonist-induced phosphorylation leading to desensitization of the angiotensin AT1A receptor. *Br J Pharmacol*. 1997; 122: 1469-77.
- 85 Moore CA, Milano SK, Benovic JL. Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol*. 2007; 69:451-82
- 86 DeFea KA, Zalevsky J, Thoma MS, Déry O, Mullins RD, Bunnnett NW. beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol*. 2000; 148:1267-81
- 87 Singh K, Xiao L, Remondino A, Sawyer DB, Colucci WS. Adrenergic regulation of cardiac myocyte apoptosis. *J Cell Physiol*. 2001; 189:257-65.
- 88 Povsic TJ, Kohout TA, Lefkowitz RJ. Beta-arrestin1 mediates insulin-like growth factor 1 (IGF-1) activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and anti-apoptosis. *J Biol Chem*. 2003; 278:51334-9.
- 89 Buxton IL, Brunton LL. Compartments of cyclic AMP and protein kinase in mammalian cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 1983; 258: 10233–10239.
- 90 Steinberg SF, Brunton LL. Compartmentation of G protein-coupled signaling pathways in cardiac myocytes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001; 41:751-73.
- 91 Nikolaev VO, Moshkov A, Lyon AR, Miragoli M, Novak P, Paur H, Lohse MJ, Korchev YE, Harding SE, Gorelik J. Beta2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation. *Science*. 2010;327:1653–1657
- 92 Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, Lohse MJ. Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 7059–7064



- 93 Liggett SB, Tepe NM, Lorenz JN, Canning AM, Jantz TD, Mitarai S, Yatani A, Dorn GW II. Early and delayed consequences of beta(2)-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level. *Circulation*. 2000; 101: 1707– 1714
- 94 Dorn GW II, Tepe NM, Lorenz JN, Koch WJ, Liggett SB. Low and high-level transgenic expression of beta2-adrenergic receptors differentially affect cardiac hypertrophy and function in Galphaq overexpressing mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6400–405, 1999.
- 95 Milano CA, Allen LF, Rockman HA, Dolber PC, McMinn TR, Chien KR, Johnson TD, Bond RA, Lefkowitz RJ. Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the beta 2-adrenergic receptor. *Science*. 1994; 264: 582–586
- 96 Du XJ, Gao XM, Wang B, Jennings GL, Woodcock EA, Dart AM. Age-dependent cardiomyopathy and heart failure phenotype in mice overexpressing beta(2)-adrenergic receptors in the heart. *Cardiovasc Res*. 2000; 48:448–454
- 97 Peter PS, Brady JE, Yan L, Chen W, Engelhardt S, Wang Y, Sadoshima J, Vatner SF, Vatner DE. Inhibition of p38 alpha MAPK rescues cardiomyopathy induced by overexpressed beta 2-adrenergic receptor, but not beta 1-adrenergic receptor. *J Clin Invest*. 2007; 117:1335-43.
- 98 Ho D, Yan L, Iwatsubo K, Vatner DE, Vatner SF. Modulation of beta-adrenergic receptor signaling in heart failure and longevity: targeting adenylyl cyclase type 5. *Heart Fail Rev*. 2010; 15:495-5
- 99 Talan MI, Ahmet I, Xiao RP, Lakatta EG.  $\beta_2$  AR agonists in treatment of chronic heart failure: long path to translation. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;51:529-33.
- 100 Krief S, Lonnqvist F, Raimbault S, Baude B, Van Spronsen A, Arner P, Strosberg AD, Ricquier D, Emorine LJ. Tissue distribution of beta 3-adrenergic receptor mRNA in man. *J Clin Invest* 1993;91:344–9
- 101 Gauthier C, Langin D, Balligand JL. Beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system. *TIPS* 2000, 21:426-431.
- 102 El-Armouche A, Zolk O, Rau T, Eschenhagen T. Inhibitory G-proteins and their role in desensitization of the adenylyl cyclase pathway in heart failure. *Cardiovasc Res*. 2003; 60:478-87.
- 103 Strosberg AD. Structure and function of the beta 3-adrenergic receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997; 37:421-50.
- 104 Pietri-Rouxel F, Strosberg AD. Pharmacological characteristics and species-related variations of beta 3-adrenergic receptors. *Fundam Clin Pharmacol*. 1995; 9:211-8.
- 105 Moniotte S, Vaerman JL, Kockx MM, Larrouy D, Langin D, Noirhomme P, Balligand JL. Real-time RT-PCR for the detection of beta-adrenoceptor messenger RNAs in small human endomyocardial biopsies. *J Mol Cell Cardiol*. 2001; 33:2121-33.
- 106 Engelhardt S, Hein L, Keller U, Klämbt K, Lohse MJ. Inhibition of Na(+)-H(+) exchange prevents hypertrophy, fibrosis, and heart failure in beta(1)-adrenergic receptor transgenic mice. *Circ Res*. 2002 19; 90:814-9.
- 107 Tavernier G, Toumaniantz G, Erfanian M, Heymann MF, Laurent K, Langin D, Gauthier C. beta3-Adrenergic stimulation produces a decrease of cardiac contractility ex vivo in mice overexpressing the human beta3-adrenergic receptor. *Cardiovasc Res*. 2003;59:288-96.
- 108 Rozec B, Gauthier C. beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system: putative roles in human pathologies. *Pharmacol Ther*. 2006; 111:652-73.
- 109 Kaumann AJ. Four beta-adrenoceptor subtypes in the mammalian heart. *Trends Pharmacol Sci*. 1997;18:70-6.
- 110 Taira CA, Carranza A, Mayer M, Di Verniero C, Opezzo JA, Höcht C. Therapeutic implications of beta-adrenergic receptor pharmacodynamic properties. *Curr Clin Pharmacol*. 2008; 3:174-84.
- 111 Molenaar P, Parsonage WA. Fundamental considerations of  $\beta$ - adrenoceptor subtypes in human heart failure. *Trends Pharmacol Sci*. 2005;26:368–374.
- 112 Beta-Blocker Evaluation of Survival Trial Investigators. A trial of the beta-blocker bucindolol in patients with advanced chronic heart failure. *N Engl J Med*. 2001; 344: 1659-67.
- 113 Bundkirchen A, Brixius K, Bölck B, Schwinger RH. Bucindolol exerts agonistic activity on the propranolol-insensitive state of beta1-adrenoceptors in human myocardium. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002; 300:794-801.
- 114 Lowe MD, Grace AA, Kaumann AJ. Blockade of putative beta4- and beta1-adrenoceptors by carvedilol in ferret myocardium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1999; 359:400-3.
- 115 Endoh M, Shimizu T, Yanagisawa T. Characterization of adrenoceptors mediating positive inotropic responses in the ventricular myocardium of the dog. *Br J Pharmacol* 1978; 64: 53–61.
- 116 Woodcock EA. Roles of alpha1A- and alpha1B-adrenoceptors in heart: insights from studies of genetically modified mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007; 34: 884-8.
- 117 Li K, He H, Li C, Sirois P, Rouleau JL. Myocardial alpha1-adrenoceptor: inotropic effect and physiologic and pathologic implications. *Life Sci*. 1997; 60:1305-18.

- 118 Du XJ, Gao XM, Kiriazis H, Moore XL, Ming Z, Su Y, Finch AM, Hannan RA, Dart AM, Graham RM. Transgenic alpha1A-adrenergic activation limits post-infarct ventricular remodeling and dysfunction and improves survival. *Cardiovasc Res* 2006;71:735–43.
- 119 Rorabaugh BR, Ross SA, Gaivin RJ, Papay RS, McCune DF, Simpson PC, Perez DM alpha1A- but not alpha1B-adrenergic receptors precondition the ischemic heart by a staurosporine-sensitive, chelerythrine-insensitive mechanism. *Cardiovasc Res.* 2005; 65:436-45
- 120 Jensen BC, Swigart PM, Laden ME, DeMarco T, Hoopes C, Simpson PC. The alpha-1D Is the predominant alpha-1- adrenergic receptor subtype in human epicardial coronary arteries. *J Am Coll Cardiol.* 2009 54:1137–1145
- 121 Hein L, Altman JD, Kobilka BK Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature.* 1999; 402:181-4.
- 122 White M, Roden R, Minobe W, et al: Agerelated changes in beta-adrenergic neuroeffector systems in the human heart. *Circulation* 1994; 90: 1225–1238.
- 123 Satwani S, Dec GW, Narula J. Beta-adrenergic blockers in heart failure: review of mechanisms of action and clinical outcomes. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2004; 9: 243-55.
- 124 DiNicolantonio JJ, Lavie CJ, Fares H, Menezes AR, O'Keefe JH Meta-analysis of carvedilol versus beta 1 selective beta-blockers (atenolol, bisoprolol, metoprolol, and nebivolol). *Am J Cardiol.* 2013;111: 765-9
- 125 Krum H. Beta-blockers in heart failure. The 'new wave' of clinical trials. *Drugs.* 1999; 58:203-10
- 126 Haber HL, Christopher LS, Gimple LW, Bergin JD, Subbiah ME, Jayaweera AR, Powers ER, Feldman MD. Why do patients with congestive heart failure tolerate the initiation of b-blocker therapy? *Circulation* 1993; 88: 1610 –1619.
- 127 Newton GE, Parker JD. Acute effects of b1-selective and nonselective b-adrenergic receptor blockade on cardiac sympathetic activity in congestive heart failure. *Circulation.* 1996; 94:353–358.
- 128 Armstrong PW, Chiong MA, Parker JO. Effects of propranolol on the hemodynamic, coronary sinus blood flow and myocardial metabolic response to atrial pacing. *Am J Cardiol.* 1977; 40:83– 89.
- 129 Talwar KK, Bhargava B, Upasani PT, Verma S, Kamlakar T, Chopra P. Hemodynamic predictors of early intolerance and long-term effects of propranolol in dilated cardiomyopathy. *J Card Fail.* 1996; 2:273–277.
- 130 Newton GE, Azevedo ER, Parker JD. Inotropic and sympathetic responses to the intracoronary infusion of a b2-receptor agonist: a human in vivo study. *Circulation.* 1999; 99:2402–2407.
- 131 Bristow MR, Roden RL, Lowes BD, Gilbert EM, Eichhorn EJ. The role of third generation bb-blocking agents in chronic heart failure. *Clin Cardiol.* 1998; 21: I-3–I-13.
- 132 Gilbert EM, Anderson JL, Deitchman D, Yanowitz FG, O'Connell JB, Renlund DG, Bartholomew M, Mealey PC, Larrabee P, Bristow MR. Chronic b-blocker-vasodilator therapy improves cardiac function in idiopathic dilated cardiomyopathy: a double-blind, randomized study of bucindolol versus placebo. *Am J Med.* 1990; 88:223–229.
- 133 Neugebauer G, Akpan W, Kaufmann B, Reiff K. Stereoselective disposition of carvedilol in man after intravenous and oral administration of the racemic compound. *Eur J Clin Pharmacol.* 1990; 38 Suppl 2:S108-11.
- 134 Ruffolo RR, Gellai M, Hieble JP, Willette RN, Nichols AJ. The pharmacology of carvedilol. *Eur J Clin Pharmacol.* 1990; 38:S82–S88.
- 135 Basu S, Senior R, Raval U, van der Does R, Bruckner T, Lahiri A. Beneficial effects of intravenous and oral carvedilol treatment in acute myocardial infarction: a placebo-controlled, randomized trial. *Circulation.* 1997; 96:183–191.
- 136 Eichhorn EJ, Bristow MR. Practical guidelines for initiation of betaadrenergic blockade in patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol.* 1997; 79:794 –798.
- 137 Gilbert EM, Abraham WT, Olsen S, Hattler B, White M, Mealy P, Larrabee P, Bristow MR Comparative hemodynamic, left ventricular functional, and antiadrenergic effects of chronic treatment with metoprolol versus carvedilol in the failing heart. *Circulation.* 1996; 94:2817-25.
- 138 Bristow MR, O'Connell JB, Gilbert EM, French WJ, Leatherman G, Kantrowitz NE, Orié J, Smucker M, Marshall G, Kelly P, Deitchman D, Anderson JL, for the Bucindolol Investigators. Dose-response of chronic b-blocker treatment in heart failure from either idiopathic dilated or ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 1994; 89:1632–1642.
- 139 Bristow MR, Gilbert EM, Abraham WT, Adams KF, Fowler MB, Hershberger R, Kubo SH, Narahara KA, Ingersoll H, Krueger S, Young S, Shusterman N. Carvedilol produces dose-related improvements in left ventricular function and survival in subjects with chronic heart failure. *Circulation* 1996; 94:2807–2816.
- 140 Rehsia NS, Dhalla NS. Mechanisms of the beneficial effects of beta-adrenoceptor antagonists in congestive heart failure. *Exp Clin Cardiol.* 2010;15:e86-95.

- 141 Bristow MR, Abraham WT, Yoshikawa T, White M, Hattler BG, Crisman TS, Lowes BD, Robertson AD, Larrabee P, Gilbert EM. Second- and third-generation beta-blocking drugs in chronic heart failure. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1997; 11 Suppl 1:291-6.
- 142 Waagstein F, Bristow MR, Swedberg K, Camerini F, Fowler MB, Silver MA, Gilbert EM, Johnson MR, Goss FG, Hjalmarson A. Beneficial effects of metoprolol in idiopathic dilated cardiomyopathy. Metoprolol in Dilated Cardiomyopathy (MDC) Trial Study Group. *Lancet.* 1993; 342: 1441-6.
- 143 Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM, Shusterman NH. The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. *N Engl J Med.* 1996; 334: 1349-55.
- 144 CIBIS Investigators and Committees. A randomized trial of beta-blockade in heart failure. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study (CIBIS). *Circulation.* 1994; 90:1765-73.
- 145 Goldstein S, Hjalmarson A. The mortality effect of metoprolol CR/XL in patients with heart failure: results of the MERIT-HF Trial. *Clin Cardiol.* 1999; 22 Suppl 5:V30-5.
- 146 Hall SA, Cigarroa CG, Marcoux L, Risser RC, Grayburn PA, Eichhorn EJ. Time course of improvement in left ventricular function, mass, and geometry in patients with congestive heart failure treated with  $\beta$ -adrenergic blockade. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25:1154–1161.
- 147 Colucci WS, Packer M, Bristow MR, Gilbert EM, Cohn JN, Fowler MB, Krueger SK, Hershberger R, Uretsky BF, Bowers JA, Sackner-Bernstein JD, Young ST, Holclaw TL, Lukas MA. Carvedilol inhibits clinical progression in patients with mild symptoms of heart failure. US Carvedilol Heart Failure Study Group. *Circulation.* 1996; 94: 2800-6.
- 148 Quaife RA, Gilbert EM, Christian PE, Datz FL, Mealey PC, Volkman K, Olsen SL, Bristow MR. Effects of carvedilol on systolic and diastolic left ventricular performance in idiopathic dilated cardiomyopathy or ischemic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1996; 78: 779–784.
- 149 Eichhorn EJ, Heesch CM, Barnett JH, Alvarez LG, Fass SM, Grayburn PA, Hatfield BA, Marcoux LG, Malloy CR. Effect of metoprolol on myocardial function and energetics in patients with non-ischemic dilated cardiomyopathy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24: 1310–1320.
- 150 Fisher ML, Gottlieb SS, Plotnick GD, Greenberg NL, Patten RD, Bennett SK, Hamilton BP. Beneficial effects of metoprolol in heart failure associated with coronary artery disease: a randomized trial. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23: 943–950.
- 151 Waagstein F, Bristow MR, Swedberg K, Camerini F, Fowler MB, Silver MA, Gilbert EM, Johnson MR, Goss FG, Hjalmarson A. Beneficial effects of metoprolol in idiopathic dilated cardiomyopathy. Metoprolol in Dilated Cardiomyopathy (MDC) Trial Study Group. *Lancet.* 1993 Dec 11; 342(8885):1441-6.
- 152 Lowes BD, Gilbert EM, Abraham WT, Minobe WA, Larrabee P, Ferguson D, Wolfel EE, Lindenfeld J, Tsvetkova T, Robertson AD, Quaife RA, Bristow MR. Myocardial gene expression in dilated cardiomyopathy treated with beta-blocking agents. *N Engl J Med.* 2002; 346:1357-65.
- 153 Lowes BD, Abraham WT, Dutcher DL, Roden RL, Crisman TS, Minobe W, Port JD, Larrabee P, Gilbert EM, Bristow MR. Comparative antiadrenergic effects of carvedilol and metoprolol in a randomized, placebo-controlled trial. (Abstr.) *Circulation Suppl* 1996; 94:I-664
- 154 Bristow MR. Treatment of chronic heart failure with  $\beta$ -adrenergic receptor antagonists: a convergence of receptor pharmacology and clinical cardiology. *Circ Res.* 2011; 109:1176-94
- 155 Lowes BD, Minobe W, Abraham WT, Rizeq MN, Bohlmeyer TJ, Quaife RA, Roden RL, Dutcher DL, Robertson AD, Voelkel NF, Badesch DB, Groves BM, Gilbert EM, Bristow MR. Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J Clin Invest* 1997; 100:2315–2324.
- 156 Abraham WT, Gilbert EM, Lowes BD, Minobe WA, Larrabee P, Roden RL, Dutcher D, Sederberg J, Lindenfeld JA, Wolfel EE, Shakar SF, Ferguson D, Volkman K, Quaife RA, Robertson AD, Bristow MR. Coordinate changes in myosin heavy chain isoform gene expression are selectively associated with alterations in dilated cardiomyopathy phenotype. *Mol Med.* 2002; 8:750–760.
- 157 Sun YL, Hu SJ, Wang LH, Hu Y, Zhou JY. Effect of beta-blockers on cardiac function and calcium handling protein in postinfarction heart failure rats. *Chest.* 2005; 128:1812-21.
- 158 Cheng J, Niwa R, Kamiya K, Toyama J, Kodama I. Carvedilol blocks the repolarizing K<sup>+</sup> currents and the L-type Ca<sup>2+</sup> current in rabbit ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol* 1999; 376:189-201.
- 159 Yao A, Kohmoto O, Oyama T, et al. Characteristic effects of  $\alpha_1$ - $\beta_1$ ,  $\beta_2$ -adrenergic blocking agent, carvedilol, on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in ventricular myocytes compared with those of timolol and atenolol. *Circ J* 2003; 67:83-90
- 160 Koitabashi N, Arai M, Tomaru K, Nagai R, Kurabayashi M. Carvedilol effectively blocks oxidative stress-mediated downregulation of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase 2 gene transcription through modification of Sp1 binding. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328:116-24.

- 161 Sabbah HN, Sharov VG, Todor A, Singh V, Gupta RC, Goldstein S. Chronic therapy with metoprolol attenuates cardiomyocyte apoptosis in dogs with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:1698–1705.
- 162 Todor AV, Sharov VG, Suzuki G, Morita H, Goldstein S, Sabbah HN. Chronic therapy with metoprolol CR/XL prevents apoptosis inducing factor and downregulates the pro-apoptotic protein Bak in cardiomyocytes of dogs with heart failure (Abstr). *J Am Coll Cardiol* 2002;39: 165A
- 163 Sabbah HN. Biologic rationale for the use of beta-blockers in the treatment of heart failure. *Heart Fail Rev.* 2004; 9:91-7.
- 164 Wisler JW, DeWire SM, Whalen EJ, Violin JD, Drake MT, Ahn S, Shenoy SK, Lefkowitz RJ. A unique mechanism of  $\beta$ -blocker action: carvedilol stimulates  $\beta$ -arrestin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 16657–62.
- 165 Baker JG, Hall IP, Hill SJ. Agonist and inverse agonist actions of beta-blockers at the human beta 2-adrenoceptor provide evidence for agonist-directed signaling. *Mol Pharmacol.* 2003; 64:1357–1369.
- 166 Kim IM, Tilley DG, Chen J, Salazar NC, Whalen EJ, Violin JD, Rockman HA.  $\beta$ -blockers alprenolol and carvedilol stimulate  $\beta$ -arrestin-mediated EGFR transactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 14555–60.
- 167 Waagstein F, Hjalmarson A, Varnauskas E, Wallentin I. Effect of chronic beta-adrenergic receptor blockade in congestive cardiomyopathy. *Br Heart J.* 1975; 37:1022-36
- 168 Metra M, Nardi M, Giubbini R, Dei Cas L. Effects of short- and long-term carvedilol administration on rest and exercise hemodynamic variables, exercise capacity and clinical conditions in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24:1678 –1687.
- 169 Gilbert EM, Abraham WT, Olsen S, Hattler B, White M, Mealy P, Larrabee P, Bristow MR. Comparative hemodynamic, left ventricular functional, and antiadrenergic effects of chronic treatment with metoprolol versus carvedilol in the failing heart. *Circulation.* 1996; 94:2817-25.
- 170 Eichhorn EJ, Bedotto JB, Malloy CR, Hatfield B, Deitchman D, Brown M, Willard JE, Grayburn PA. Effect of beta-adrenergic blockade on myocardial function and energetics in congestive heart failure: improvements in hemodynamic, contractile, and diastolic performance with bucindolol. *Circulation* 1990; 82:473– 483.
- 171 Wisenbaugh T, Katz I, Davis J, Essop R, Skoularigis J, Middlemost S, Rothlisberger C, Skudicky D, Sareli P. Long-term (3 month) effects of a new beta-blocker (nebivolol) on cardiac performance in dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1993; 21:1094 –1100.
- 172 Andersson B, Waagstein F, Caidahl K, Eurenus I, Täng MS, Wikh R. Early changes in longitudinal performance predict future improvement in global left ventricular function during long term beta adrenergic blockade. *Heart.* 2000; 84:599-605.
- 173 Lohse MJ. Beta-adrenoceptor polymorphisms and heart failure. *Trends Mol Med.* 2004 Feb;10(2):55-8
- 174 Frielle T, Collins S, Daniel KW, Caron MG, Lefkowitz RJ, Kobilka BK. Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:7920-4.
- 175 Maqbool, A., Hall, A. S., Ball, S. G., & Balmforth, A. J. Common polymorphisms of  $\beta$ 1-adrenoceptor: identification and rapid screening assay. 1999, *Lancet* 353, 897
- 176 Börjesson M, Magnusson Y, Hjalmarson A, Andersson B. A novel polymorphism in the gene coding for the beta(1)-adrenergic receptor associated with survival in patients with heart failure. *Eur Heart J.* 2000; 21:1853-8.
- 177 Brodde OE. Beta-1 and beta-2 adrenoceptor polymorphisms: functional importance, impact on cardiovascular diseases and drug responses. *Pharmacol Ther.* 2008; 117:1-29.
- 178 Xie HG, Dishy V, Sofowora G, Kim RB, Landau R, Smiley RM, Zhou HH, Wood AJ, Harris P, Stein CM. Arg389Gly beta 1-adrenoceptor polymorphism varies in frequency among different ethnic groups but does not alter response in vivo. *Pharmacogenetics.* 2001; 11:191-7.
- 179 Lohse MJ. Beta-adrenoceptor polymorphisms and heart failure. *Trends Mol Med.* 2004 Feb;10(2):55-8
- 180 Terra SG, Johnson JA. Pharmacogenetics, pharmacogenomics, and cardiovascular therapeutics: the way forward. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2002;2:287-96.
- 181 Buscher R, Belger H, Eilmes KJ, Tellkamp R, Radke J, Dhein S, Hoyer PF, Michel MC, Insel PA, Brodde OE. In vivo studies do not support a major functional role for the Gly389Arg b-1 AR polymorphisms in humans. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 199– 205.
- 182 Moore JD, Mason DA, Green SA, Hsu J, Liggett SB. Racial differences in the frequencies of cardiac b-1 AR receptor polymorphisms. Analysis of c145A>G and c1165G>C. *Human Mutation* 1999;14:271
- 183 Terra SG, Hamilton KK, Pauly DF, Lee CR, Patterson JH, Adams KF, Schofield RS, Belgado BS, Hill JA, Aranda JM, Yarandi HN, Johnson JA Beta1-adrenergic receptor polymorphisms and left ventricular remodeling changes in response to beta-blocker therapy. *Pharmacogenet Genomics.* 2005;15:227-34.
- 184 Mason DA, Moore JD, Green SA, Liggett SB. A gain-of-function polymorphism in a G-protein coupling domain of the human beta1- adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1999;274:12670-4.

- 185 Rathz DA, Gregory KN, Fang Y, Brown KM, Liggett SB. Hierarchy of polymorphic variation and desensitization permutations relative to beta 1- and beta 2-adrenergic receptor signaling. *J Biol Chem.* 2003; 278: 10784-9.
- 186 Joseph SS, Lynham JA, Grace AA, Colledge WH, Kaumann AJ. Markedly reduced effects of (-)-isoprenaline but not of (-)-CGP 12177 and unchanged affinity of  $\beta$ -blockers at Gly389- $\beta$ 1-adrenoceptors compared to Arg389- $\beta$ 1-adrenoceptors. 2004. *Br J Pharmacol* 142, 51–56.
- 187 Rathz DA, Brown KM, Kramer LA, Liggett SB. Amino acid 49 polymorphisms of the human beta1-adrenergic receptor affect agonist-promoted trafficking. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2002; 39 :155-60
- 188 Levin MC, Marullo S, Muntaner O, Andersson B, Magnusson Y. The myocardium-protective Gly-49 variant of the beta 1-adrenergic receptor exhibits constitutive activity and increased desensitization and down-regulation. *J Biol Chem.* 2002; 277:30429-35.
- 189 Sandilands A, Yeo G, Brown MJ, O'Shaughnessy KM Functional responses of human beta1 adrenoceptors with defined haplotypes for the common 389R>G and 49S>G polymorphisms. *Pharmacogenetics.* 2004; 14:343-9
- 190 Mialet Perez J, Rathz DA, Petrashevskaya NN, Hahn HS, Wagoner LE, Schwartz A, Dorn GW, Liggett SB Beta 1-adrenergic receptor polymorphisms confer differential function and predisposition to heart failure. *Nat Med.* 2003, 9:1300-5
- 191 Akhter SA, D'Souza KM, Petrashevskaya NN, Mialet-Perez J, Liggett SB. Myocardial beta1-adrenergic receptor polymorphisms affect functional recovery after ischemic injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 290:H1427-32.
- 192 Molenaar P, Rabnott G, Yang I, Fong KM, Savarimuthu SM, Li L, West MJ, Russell FD Conservation of the cardiostimulant effects of (-)-norepinephrine across Ser49Gly and Gly389Arg beta(1)-adrenergic receptor polymorphisms in human right atrium in vitro. *J Am Coll Cardiol.* 2002 Oct 2;40:1275-82.
- 193 Sandilands AJ, O'Shaughnessy KM, Brown MJ Greater inotropic and cyclic AMP responses evoked by noradrenaline through Arg389 beta 1-adrenoceptors versus Gly389 beta 1-adrenoceptors in isolated human atrial myocardium. *Br J Pharmacol.* 2003; 138:386-92.
- 194 Liggett SB, Mialet-Perez J, Thaneemit-Chen S, Weber SA, Greene SM, Hodne D, Nelson B, Morrison J, Domanski MJ, Wagoner LE, Abraham WT, Anderson JL, Carlquist JF, Krause-Steinrauf HJ, Lazzaroni LC, Port JD, Lavori PW, Bristow MR. A polymorphism within a conserved beta(1)-adrenergic receptor motif alters cardiac function and beta-blocker response in human heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103: 11288-93.
- 195 Büscher R, Belger H, Eilmes KJ, Tellkamp R, Radke J, Dhein S, Hoyer PF, Michel MC, Insel PA, Brodde OE. In-vivo studies do not support a major functional role for the Gly389Arg beta 1-adrenoceptor polymorphism in humans. *Pharmacogenetics.* 2001; 11:199-205.
- 196 Liu J, Liu ZQ, Tan ZR, Chen XP, Wang LS, Zhou G, Zhou HH. Gly389Arg polymorphism of beta1-adrenergic receptor is associated with the cardiovascular response to metoprolol. *Clin Pharmacol Ther.* 2003; 74:372-9.
- 197 Sofowora GG, Dishy V, Muszkat M, Xie HG, Kim RB, Harris PA, Prasad HC, Byrne DW, Nair UB, Wood AJ, Stein CM. A common beta1-adrenergic receptor polymorphism (Arg389Gly) affects blood pressure response to beta-blockade. *Clin Pharmacol Ther.* 2003; 73:366-71.
- 198 Nieminen T, Lehtimäki T, Laiho J, Rontu R, Niemelä K, Kööbi T, Lehtinen R, Viik J, Turjanmaa V, Kähönen M. Effects of polymorphisms in beta1-adrenoceptor and alpha-subunit of G protein on heart rate and blood pressure during exercise test. The Finnish Cardiovascular Study. *J Appl Physiol.* 2006; 100:507-11.
- 199 Leineweber K, Bruck H, Temme T, Heusch G, Philipp T, Brodde OE. The Arg389Gly beta1-adrenoceptor polymorphism does not affect cardiac effects of exercise after parasympathetic inhibition by atropine. *Pharmacogenet Genomics.* 2006; 16:9-13.
- 200 Wagoner LE, Craft LL, Zengel P, McGuire N, Rathz DA, Dorn GW 2nd, Liggett SB Polymorphisms of the beta1-adrenergic receptor predict exercise capacity in heart failure. *Am Heart J.* 2002;144:840-6
- 201 Stanton T, Inglis GC, Padmanabhan S, Dominiczak AF, Jardine AG, Connell JMC. Variation at the a-1 adrenergic receptor gene locus affects left ventricular mass in renal failure. *J Nephrol* 2002; 15: 512–8.
- 202 La Rosée K, Huntgeburth M, Rosenkranz S, Böhm M, Schnabel P. The Arg389Gly beta1-adrenoceptor gene polymorphism determines contractile response to catecholamines *Pharmacogenetics.* 2004;14:711-6
- 203 Bruck H, Leineweber K, Temme T, Weber M, Heusch G, Philipp T, Brodde OE The Arg389Gly beta1-adrenoceptor polymorphism and catecholamine effects on plasma-renin activity. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 46: 2111-5.
- 204 Humma LM, Puckett BJ, Richardson HE, Terra SG, Andrisin TE, Lejeune BL, Wallace MR, Lewis JF, McNamara DM, Picoult-Newberg L, Pepine CJ, Johnson JA. Effects of beta1-adrenoceptor genetic

- polymorphisms on resting hemodynamics in patients undergoing diagnostic testing for ischemia. *Am J Cardiol.* 2001;88:1034-7
- 205 Bengtsson K, Melander O, Orho-Melander M, Lindblad U, Ranstam J, Råstam L, Groop L. Polymorphism in the beta(1)-adrenergic receptor gene and hypertension. *Circulation.* 2001; 104:187-90
- 206 Defoor J, Martens K, Zielinska D, Matthijs G, Van Nerum H, Schepers D, Fagard R, Vanhees L. The CAREGENE study: polymorphisms of the beta1-adrenoceptor gene and aerobic power in coronary artery disease. *Eur Heart J.* 2006; 27:808-16
- 207 McCaffery JM, Pogue-Geile MF, Ferrell RE, Petro N, Manuck SB. Variability within alpha- and beta-adrenoreceptor genes as a predictor of cardiovascular function at rest and in response to mental challenge. *J Hypertens.* 2002; 20:1105-14
- 208 Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2004; 369:23-37
- 209 Bradford LD. CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics.* 2006; 3:229-243
- 210 Rodriguez-Antona C, Ingelman-Sundberg M. Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene.* 2006; 25:1679-1691
- 211 Ingelman-Sundberg M (2005) Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J* 5, 6-13.
- 212 Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther.* 2007; 116:496-526.
- 213 Evans WE & Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science.* 1999; 286, 487-491.
- 214 Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J.* 2005; 5, 6-13.
- 215 Speirs CJ, Murray S, Boobis AR, Seddon CE, Davies DS. Quinidine and the identification of drugs whose elimination is impaired in subjects classified as poor metabolizers of debrisoquine. *Br J Clin Pharmacol* 1986;22:739-43.
- 216 Cascorbi I. Pharmacogenetics of cytochrome p4502D6: genetic background and clinical implication. *Eur J Clin Invest.* 2003 Nov;33 Suppl 2:17-22.
- 217 Madani S, Paine MF, Lewis L, Thummel KE, Shen DD. Comparison of CYP2D6 content and metoprolol oxidation between microsomes isolated from human livers and small intestines. *Pharm Res.* 1999; 16:1199-1205
- 218 Siegle I, Fritz P, Eckhardt K, Zanger UM, Eichelbaum M. Cellular localization and regional distribution of CYP2D6 mRNA and protein expression in human brain. *Pharmacogenetics.* 2001; 11:237-245
- 219 Yu AM, Idle JR, Byrd LG, Krausz KW, Kupfer A, Gonzalez FJ. Regeneration of serotonin from 5-methoxytryptamine by polymorphic human CYP2D6. *Pharmacogenetics.* 2003. 13:173- 181
- 220 Heim MH, Meyer UA. Evolution of a highly polymorphic human cytochrome P450 gene cluster: CYP2D6. *Genomics* 1992; 14: 49-58.
- 221 Gough AC, Smith CA, Howell SM, Wolf CR, Bryant SP, Spurr NK. Localization of the CYP2D gene locus to human chromosome 22q13.1 by polymerase chain reaction, in situ hybridization, and linkage analysis. *Genomics* 1993; 15:430-432.
- 222 Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet* 1997; 60 :284-95.
- 223 Nakamura K, Ariyoshi N, Yokoi T, Ohgiya S, Chida M, Nagashima K et al. 2D6\*10 present in human liver microsomes shows low catalytic activity and thermal stability. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293 :969-73.
- 224 Bertilsson L. Geographical/interracial differences in polymorphic drug oxidation. Current state of knowledge of cytochromes P450 (CYP) 2D6 and 2C19. *Clin Pharmacokinet* 1995; 29:192-209
- 225 Wennerholm A, Johansson I, Hiderstrand M, Bertilsson L, Gustafsson LL, Ingelman-Sundberg M. Characterization of the CYP2D6\*29 allele commonly present in a black Tanzanian population causing reduced catalytic activity. *Pharmacogenetics.* 2001;11:417-27.
- 226 Bogni A, Monshouwer M, Moscone A, Hiderstrand M, Ingelman-Sundberg M, Hartung T, Coecke S. Substrate specific metabolism by polymorphic cytochrome P450 2D6 alleles. *Toxicol In Vitro.* 2005;19:621-9
- 227 Raimundo S, Fischer J, Eichelbaum M, Griese EU, Schwab M, Zanger UM. Elucidation of the genetic basis of the common 'intermediate metabolizer' phenotype for drug oxidation by CYP2D6. *Pharmacogenetics.* 2000; 10:577-581

- 228 Zanger UM, Fischer J, Raimundo S, Stüven T, Evert BO, Schwab M, Eichelbaum M. Comprehensive analysis of the genetic factors determining expression and function of hepatic CYP2D6. *Pharmacogenetics*. 2001; 11:573-85.
- 229 Gaedigk A, Ndjountché L, Divakaran K, Dianne Bradford L, Zineh I, Oberlander TF, Brousseau DC, McCarver DG, Johnson JA, Alander SW, Wayne Riggs K, Steven Leeder J. Cytochrome P4502D6 (CYP2D6) gene locus heterogeneity: characterization of gene duplication events. *Clin Pharmacol Ther*. 2007;81:242-51
- 230 Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A & Rodriguez- Antona C Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther*. 2007; 116, 496–526.
- 231 Bijl MJ, Visser LE, van Schaik RH, Kors JA, Witteman JC, Hofman A, Vulto AG, van Gelder T, Stricker BH. Genetic variation in the CYP2D6 gene is associated with a lower heart rate and blood pressure in beta-blocker users. *Clin Pharmacol Ther*. 2009; 85: 45–50
- 232 Goryachkina K, Burbello A, Boldueva S, Babak S, Bergman U, Bertilsson L. CYP2D6 is a major determinant of metoprolol disposition and effects in hospitalized Russian patients treated for acute myocardial infarction. *Eur J Clin Pharmacol*. 2008; 64: 1163–1173.
- 233 Sharp CF, Gardiner SJ, Jensen BP, Roberts RL, Troughton RW, Lainchbury JG, Begg EJ. CYP2D6 genotype and its relationship with metoprolol dose, concentrations and effect in patients with systolic heart failure. *Pharmacogenomics J*. 2009; 9: 175–184.
- 234 Wuttke H, Rau T, Heide R, Bergmann K, Bohm M, Weil J, Werner D, Eschenhagen T. Increased frequency of cytochrome P450 2D6 poor metabolizers among patients with metoprolol-associated adverse effects. *Clin Pharmacol Ther*. 2002; 72: 429–437.
- 235 Fux R, Morike K, Prohmer AM, et al. Impact of CYP2D6 genotype on adverse effects during treatment with metoprolol: a prospective clinical study. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 78: 378–87
- 236 Terra SG, Pauly DF, Lee CR, et al.  $\beta$ -Adrenergic receptor polymorphisms and responses during titration of metoprolol controlled release/extended release in heart failure. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 77:127-37.
- 237 Zineh I, Beitelshes AL, Gaedigk A, Walker JR, Pauly DF, Eberst K, Leeder JS, Phillips MS, Gelfand CA, Johnson JA. Pharmacokinetics and CYP2D6 genotypes do not predict metoprolol adverse events or efficacy in hypertension. *Clin Pharmacol Ther* 76: 536–544, 2004.
- 238 Wedlund PJ, de LJ. Cytochrome P450 2D6 and antidepressant toxicity and response: what is the evidence? *Clin Pharmacol Ther*. 2004; 75: 373–375.
- 239 Murphy GM Jr, Kremer C, Rodrigues HE, Schatzberg AF. Pharmacogenetics of antidepressant medication intolerance. *Am J Psychiatry*. 2003; 160: 1830–1835.
- 240 Fujimaki M, Murakoshi Y, Hakusui H. Assay and disposition of carvedilol enantiomers in humans and monkeys: evidence of stereoselective presystemic metabolism. *J Pharm Sci*. 1990; 79: 568-72.
- 241 Oldham HG, Clarke SE. In vitro identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of R(+)- and S(-)-carvedilol. *Drug Metab Dispos*. 1997; 25:970-7.
- 242 Giessmann T, Modess C, Hecker U, Zschiesche M, Dazert P, Kunert-Keil C, Warzok R, Engel G, Weitschies W, Cascorbi I, Kroemer HK, Siegmund W. CYP2D6 genotype and induction of intestinal drug transporters by rifampin predict presystemic clearance of carvedilol in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther*. 2004;75:213-22.
- 243 Dunn CJ, Lea AP, Wagstaff AJ: Carvedilol. A reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic use in cardiovascular disorders. *Drugs*. 1999; 54: 161–185
- 244 Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med*. 1990; 323:236-41.
- 245 Mann DL, Bristow MR. Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. *Circulation*. 2005; 111:2837-49.
- 246 Chung ES, Packer M, Lo KH, Fasanmade AA, Willerson JT; Anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure Investigators. Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor- $\alpha$ , in patients with moderate-to-severe heart failure: results of the anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure (ATTACH) trial. *Circulation*. 2003;107: 3133-40.
- 247 Gong KZ, Song G, Spiers JP, Kelso EJ, Zhang ZG Activation of immune and inflammatory systems in chronic heart failure: novel therapeutic approaches. *Int J Clin Pract*. 2007; 61: 611-21.
- 248 Kapadia SR, Oral H, Lee J, Nakano M, Taffet GE, Mann DL Hemodynamic regulation of tumor necrosis factor- $\alpha$  gene and protein expression in adult feline myocardium. *Circ Res*. 1997; 81: 187-95.
- 249 Baumgarten G, Knuefermann P, Kalra D, Gao F, Taffet GE, Michael L, Blackshear PJ, Carballo E, Sivasubramanian N, Mann DL. Load-dependent and -independent regulation of proinflammatory

- cytokine and cytokine receptor gene expression in the adult mammalian heart. *Circulation*. 2002; 105: 2192-7.
- 250 Anker SD, von Haehling S. Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview. *Heart*. 2004;90:464-70.
- 251 Braunwald E. Biomarkers in heart failure. *N Engl J Med*. 2008;358:2148-59.
- 252 Shioi T, Matsumori A, Kihara Y, et al. Increased expression of interleukin-1 beta and monocyte chemoattractant and activating factor/ monocyte chemoattractant protein-1 in the hypertrophied and failing heart with pressure overload. *Circ Res* 1997; 81:664–71
- 253 Okada M, Matsumori A, Ono K, et al. Cyclic stretch upregulates production of interleukin-8 and monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:894–901.
- 254 Yndestad A, Damås JK, Øie E, Ueland T, Gullestad L, Aukrust P. Role of inflammation in the progression of heart failure. *Curr Cardiol Rep*. 2007; 9:236-41
- 255 Janabi M, Yamashita S, Hirano K, et al. Oxidized LDL-induced NF-kappa B activation and subsequent expression of proinflammatory genes are defective in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1953–60.
- 256 Celis R, Torre-Martinez G, Torre-Amione G. Evidence for activation of immune system in heart failure: is there a role for anti-inflammatory therapy? *Curr Opin Cardiol*. 2008; 23:254-60.
- 257 Warraich RS, Noutsias M, Kazak I, Seeberg B, Dunn MJ, Schultheiss HP, Yacoub MH, Kuhl U. Immunoglobulin G3 cardiac myosin autoantibodies correlate with left ventricular dysfunction in patients with dilated cardiomyopathy: immunoglobulin G3 and clinical correlates. *Am Heart J*. 2002; 143: 1076-84.
- 258 Wang ZH, Liao YH, Fu M. The frequency of occurrence of autoantibodies against beta1-adrenoceptors and its clinical relevance in patients with hepatitis virus myocarditis. *Autoimmunity* 2001;34:241 –5.
- 259 Nikolaev VO, Boivin V, Stork S et al (2007) A novel fluorescence method for the rapid detection of functional beta1-adrenergic receptor autoantibodies in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 50:423–431
- 260 Müller J, Wallukat G, Dandel M, Bieda H, Brandes K, Spiegelsberger S, Nissen E, Kunze R, Hetzer R. Immunoglobulin adsorption in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2000; 101: 385-91
- 261 Satoh M, Shimoda Y, Maesawa C, Akatsu T, Ishikawa Y, Minami Y, Hiramori K, Nakamura M. Activated toll-like receptor 4 in monocytes is associated with heart failure after acute myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2006; 109: 226-34
- 262 Yndestad A, Damås JK, Oie E, Ueland T, Gullestad L, Aukrust P. Systemic inflammation in heart failure--the whys and wherefores. *Heart Fail Rev*. 2006; 11: 83-92
- 263 Flesch M, Hoper A, Dell'Italia L, Evans K, Bond R, Peshock R, et al. Activation and functional significance of the renin-angiotensin system in mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor. *Circulation* 2003; 108:598– 604
- 264 Hahn AW, Jonas U, Buhler FR, Resink TJ. Activation of human peripheral monocytes by angiotensin II. *FEBS Lett* 1994; 347:178– 80.
- 265 Dostal DE, Baker KM. The cardiac renin –angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function? *Circ Res* 1999; 85: 643– 50.
- 266 Brasier AR, Jamaluddin M, Han Y, Patterson C, Runge MS. Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) transcription factor. *Mol Cell Biochem* 2000; 212:155– 69.
- 267 Hernández-Presa M, Bustos C, Ortego M, Tuñón J, Renedo G, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation*. 1997; 95:1532-41.
- 268 Hahn AW, Jonas U, Bühler FR, Resink TJ. Activation of human peripheral monocytes by angiotensin II. *FEBS Lett*. 1994; 347: 178-80.
- 269 Kalra D, Sivasubramanian N, Mann DL. Angiotensin II induces tumor necrosis factor biosynthesis in the adult mammalian heart through a protein kinase C-dependent pathway. *Circulation* 2002; 105:2198– 205.
- 270 Sekiguchi K, Li X, Coker M, Flesch M, Barger PM, Sivasubramanian N, Mann DL. Cross-regulation between the renin-angiotensin system and inflammatory mediators in cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res*. 2004;63:433-42.
- 271 Peng J, Gurantz D, Tran V, Cowling RT, Greenberg BH. Tumor necrosis factor-alpha-induced AT1 receptor upregulation enhances angiotensin II-mediated cardiac fibroblast responses that favor fibrosis. *Circ Res* 2002; 91:1119– 26



- 272 Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Mizuno T, et al. Angiotensin II partly mediates mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res* 1995; 77:258–65.
- 273 Clerk A, Harrison JG, Long CS, Sugden PH. Pro-inflammatory cytokines stimulate mitogen-activated protein kinase subfamilies, increase phosphorylation of c-Jun and ATF2 and upregulate c-Jun protein in neonatal rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31:2087–99.
- 274 Kudoh S, Komuro I, Mizuno T, Yamazaki T, Zou Y, Shiojima I, et al. Angiotensin II stimulates c-Jun NH2-Terminal kinase in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *Circ Res* 1997; 80:139–46.
- 275 Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griendling KK. p38 Mitogen- activated protein kinase is a critical component of the redoxsensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem* 1998; 273: 15022–9.
- 276 Nakamura K, Fushimi K, Kouchi H, Mihara K, Miyazaki M, Ohe T, et al. Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II. *Circulation* 1998; 98:794–9.
- 277 Kan H, Finkel MS. Interactions between cytokines and neurohormonal systems in the failing heart. *Heart Fail Rev.* 2001; 6: 119-27.
- 278 Shehab AM, MacFadyen RJ, McLaren M, Tavendale R, Belch JJ, Struthers ADSudden unexpected death in heart failure may be preceded by short term, intraindividual increases in inflammation and in autonomic dysfunction: a pilot study. *Heart.* 2004; 90:1263-8.
- 279 Cicoira M, Bolger AP, Doehner W, Rauchhaus M, Davos C, Sharma R, Al-Nasser FO, Coats AJ, Anker SD. High tumour necrosis factor-alpha levels are associated with exercise intolerance and neurohormonal activation in chronic heart failure patients *Cytokine.* 2001;15: 80-6.
- 280 Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol.* 1996; 27:1201-6.
- 281 MacGowan GA, Murali S, Loftus S, Uretsky BF. Comparison of metabolic, ventilatory, and neurohumoral responses during light forearm isometric exercise and isotonic exercise in congestive heart failure. *Am J Cardiol.* 1996; 77: 391-6.
- 282 Werner C, Werdan K, Pönicke K, Brodde OE. Impaired beta-adrenergic control of immune function in patients with chronic heart failure: reversal by beta1-blocker treatment. *Basic Res Cardiol.* 2001; 96: 290-8.
- 283 Jankowska EA, Ponikowski P, Piepoli MF, Banasiak W, Anker SD, Poole-Wilson PA. Autonomic imbalance and immune activation in chronic heart failure - pathophysiological links. *Cardiovasc Res.* 2006; 70: 434-45
- 284 Tracey KJ. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Clin Invest.* 2007; 117:289-96.
- 285 Candia AM, Villacorta H Jr, Mesquita ET. 201-8. Immune-inflammatory activation in heart failure. *Arq Bras Cardiol.* 2007; 89: 183-90.
- 286 Anker SD, Egerer KR, Volk HD, Kox WJ, Poole-Wilson PA, Coats AJ. Elevated soluble CD14 receptors and altered cytokines in chronic heart failure. *Am J Cardiol.* 1997; 79: 1426-30.
- 287 Niebauer J, Volk HD, Kemp M, Dominguez M, Schumann RR, Rauchhaus M, Poole-Wilson PA, Coats AJ, Anker SD Endotoxin and immune activation in chronic heart failure: a prospective cohort study. *Lancet.* 1999; 353: 1838-42
- 288 Krack A, Sharma R, Figulla HR, Anker SD. The importance of the gastrointestinal system in the pathogenesis of heart failure. *Eur Heart J.* 2005; 26: 2368-74.
- 289 Conraads VM, Jorens PG, De Clerck LS, Van Saene HK, Ieven MM, Bosmans JM, Schuerwegh A, Bridts CH, Wuyts F, Stevens WJ, Anker SD, Rauchhaus M, Vrints CJ. Selective intestinal decontamination in advanced chronic heart failure: a pilot trial. *Eur J Heart Fail.* 2004; 6: 483-91.
- 290 Zhao SP, Xu TD. Elevated tumor necrosis factor alpha of blood mononuclear cells in patients with congestive heart failure. *Int J Cardiol.* 1999; 71: 257-61
- 291 Vonhof S, Brost B, Stille-Siegener M, Grumbach IM, Kreuzer H, Figulla HR. Monocyte activation in congestive heart failure due to coronary artery disease and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 1998; 63: 237-44.
- 292 Matsumori A, Yamada T, Suzuki H, Matoba Y, Sasayama S. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br Heart J.* 1994; 72:561-6.
- 293 Aukrust P, Ueland T, Müller F, Andreassen AK, Nordøy I, Aas H, Kjekshus J, Simonsen S, Frøland SS, Gullestad L. Elevated circulating levels of C-C chemokines in patients with congestive heart failure. *Circulation.* 1998; 97: 1136-43.
- 294 Devaux B, Scholz D, Hirche A, Klövekorn WP, Schaper J. Upregulation of cell adhesion molecules and the presence of low grade inflammation in human chronic heart failure. *Eur Heart J.* 1997; 18: 470-9.

- 295 Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975; 7 : 3666-70.
- 296 Beutler B, Mahoney J, Le Trang N, Pekala P, Cerami A. Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *J Exp Med*. 1985; 161:984-95.
- 297 Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*. 1997; 385: 729-33.
- 298 Smookler DS, Mohammed FF, Kassiri Z, Duncan GS, Mak TW, Khokha R. Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 regulates TNF-dependent systemic inflammation. *J Immunol*. 2006; 176: 21-5
- 299 Eck MJ, Sprang SR. The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding. *J Biol Chem*. 1989; 264: 17595-605
- 300 Feldman AM, Combes A, Wagner D, Kadakomi T, Kubota T, Li YY, McTiernan C. The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 35: 537-44
- 301 Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther*. 2008; 117:244-79.
- 302 Han, J., Brown, T., & Beutler, B. Endotoxin-responsive sequences control cachectin/tumor necrosis factor biosynthesis at the translational level *J Exp Med*. 1990; 171, 465-475.
- 303 Eissner, G., Kolch, W., & Scheurich, P. Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004, 15, 353-366.
- 304 Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Durand JB, Bies RD, Young JB, Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation*. 1996;93: 704-11.
- 305 Torre-Amione G, Bozkurt B, Deswal A, Mann DL. An overview of tumor necrosis factor alpha and the failing human heart. *Curr Opin Cardiol*. 1999; 14:206-10
- 306 Grell M, Wajant H, Zimmermann G, Scheurich P The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95: 570-5
- 307 Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*. 2001; 11: 372-7.
- 308 Frantz S, Fraccarollo D, Wagner H, Behr TM, Jung P, Angermann CE, Ertl G, Bauersachs J. Sustained activation of nuclear factor kappa B and activator protein 1 in chronic heart failure. *Cardiovasc Res*. 2003; 57:749-56.
- 309 Mann DL. Tumor necrosis factor-induced signal transduction and left ventricular remodeling. *J Card Fail*. 2002; 8(6 Suppl):S379-86.
- 310 Flaherty MP, Guo Y, Tiwari S, Rezazadeh A, Hunt G, Sanganalmath SK, Tang XL, Bolli R, Dawn B. The role of TNF-alpha receptors p55 and p75 in acute myocardial ischemia/reperfusion injury and late preconditioning. *J Mol Cell Cardiol*. 2008; 45: 735-41
- 311 Kurrelmeyer KM, Michael LH, Baumgarten G, Taffet GE, Peschon JJ, Sivasubramanian N, Entman ML, Mann DL. Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97:5456-61.
- 312 Higuchi Y, McTiernan CF, Frye CB, McGowan BS, Chan TO, Feldman AM. Tumor necrosis factor receptors 1 and 2 differentially regulate survival, cardiac dysfunction, and remodeling in transgenic mice with tumor necrosis factor-alpha-induced cardiomyopathy. *Circulation*. 2004;109:1892-7.
- 313 Hamid T, Gu Y, Ortines RV, Bhattacharya C, Wang G, Xuan YT, Prabhu SD. Divergent tumor necrosis factor receptor-related remodeling responses in heart failure: role of nuclear factor-kappaB and inflammatory activation. *Circulation*. 2009; 119:1386-97
- 314 Bradham WS, Moe G, Wendt KA, Scott AA, Konig A, Romanova M, Naik G, Spinale FG. TNF-alpha and myocardial matrix metalloproteinases in heart failure: relationship to LV remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 282:H1288- H1295
- 315 Terlizese M, Simoni P, Antonetti F. In vitro comparison of inhibiting ability of soluble TNF receptor p75 (TBP II) vs. soluble TNF receptor p55 (TBP I) against TNF-alpha and TNF-beta. *J Interferon Cytokine Res*. 1996; 16:1047-53.
- 316 Ferrari R, Bachetti T, Confortini R, Opasich C, Febo O, Corti A, Cassani G, Visioli O. Tumor necrosis factor soluble receptors in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation*. 1995 15; 2:1479-86.
- 317 Rauchhaus M, Doehner W, Francis DP, Davos C, Kemp M, Liebenthal C, Niebauer J, Hooper J, Volk HD, Coats AJ, Anker SD. Plasma cytokine parameters and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 2000; 19; 102:3060-7.

- 318 Valgimigli M, Ceconi C, Malagutti P, Merli E, Soukhomovskaia O, Francolini G, Cicchitelli G, Olivares A, Parrinello G, Percoco G, Guardigli G, Mele D, Pirani R, Ferrari R. Tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor 1 is a major predictor of mortality and new-onset heart failure in patients with acute myocardial infarction: the Cytokine-Activation and Long-Term Prognosis in Myocardial Infarction (C-ALPHA) study. *Circulation*. 2005 Feb 22;111(7):863-70.
- 319 Dibbs Z, Thornby J, White BG, Mann DL. Natural variability of circulating levels of cytokines and cytokine receptors in patients with heart failure: implications for clinical trials. *J Am Coll Cardiol*. 1999;33: 1935-42.
- 320 Testa M, Yeh M, Lee P, Fanelli R, Loperfido F, Berman JW, LeJemtel TH. Circulating levels of cytokines and their endogenous modulators in patients with mild to severe congestive heart failure due to coronary artery disease or hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 1996; 28: 964-71.
- 321 Nakamura M, Yoshida H, Arakawa N, Saitoh S, Satoh M, Hiramori K. Effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  on basal and stimulated endothelium-dependent vasomotion in human resistance vessel. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000; 36: 487-92.
- 322 van der Poll T, Büller HR, ten Cate H, Wortel CH, Bauer KA, van Deventer SJ, Hack CE, Sauerwein HP, Rosenberg RD, ten Cate JW. Activation of coagulation after administration of tumor necrosis factor to normal subjects. *N Engl J Med*. 1990;322: 1622-7.
- 323 Suffredini AF, Fromm RE, Parker MM, Brenner M, Kovacs JA, Wesley RA, Parrillo JE. The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *N Engl J Med*. 1989; 321: 280-7
- 324 Kubota T, McTiernan CF, Frye CS, Slawson SE, Lemster BH, Koretsky AP, et al. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Circ Res* 1997; 81:627– 35.
- 325 Bryant D, Becker L, Richardson J, Shelton J, Franco F, Peshock R, et al. Cardiac failure in transgenic mice with myocardial expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Circulation* 1998; 97:1375– 81.
- 326 Kleinbongard P, Schulz R, Heusch G. TNF $\alpha$  in myocardial ischemia/reperfusion, remodeling and heart failure. *Heart Fail Rev*. 2011; 16:49-69.
- 327 Prabhu SD. Cytokine-induced modulation of cardiac function. *Circ Res*. 2004; 95: 1140-53.
- 328 Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science*. 1992; 257: 387-9
- 329 Yokoyama T, Vaca L, Rossen RD, Durante W, Hazarika P, Mann DL. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the adult mammalian heart. *J Clin Invest*. 1993; 92: 2303-12.
- 330 Eichenholz PW, Eichacker PQ, Hoffman WD, Banks SM, Parrillo JE, Danner RL, Natanson C. Tumor necrosis factor challenges in canines: patterns of cardiovascular dysfunction. *Am J Physiol*. 1992; 263: H668-7
- 331 Bozkurt B, Kribbs SB, Clubb FJ Jr, Michael LH, Didenko VV, Hornsby PJ, Seta Y, Oral H, Spinale FG, Mann DL. Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor- $\alpha$  promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. *Circulation*. 1998; 97:1382-91.
- 332 Yokoyama T, Nakano M, Bednarczyk JL, McIntyre BW, Entman M, Mann DL. Tumor necrosis factor- $\alpha$  provokes a hypertrophic growth response in adult cardiac myocytes. *Circulation*. 1997; 95: 1247-52.
- 333 Dibbs ZI, Diwan A, Nemoto S, DeFreitas G, Abdellatif M, Carabello BA, Spinale FG, Feuerstein G, Sivasubramanian N, Mann DL. Targeted overexpression of transmembrane tumor necrosis factor provokes a concentric cardiac hypertrophic phenotype. *Circulation*. 2003; 108:1002-8.
- 334 Janczewski AM, Kadokami T, Lemster B, Frye CS, McTiernan CF, Feldman AM. Morphological and functional changes in cardiac myocytes isolated from mice overexpressing TNF- $\alpha$ . *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 284: H960-9.
- 335 Diwan A, Dibbs Z, Nemoto S, DeFreitas G, Carabello BA, Sivasubramanian N, Wilson EM, Spinale FG, Mann DL. Targeted overexpression of noncleavable and secreted forms of tumor necrosis factor provokes disparate cardiac phenotypes. *Circulation*. 2004. 20; 109(2):262-8.
- 336 Hedayat M, Mahmoudi MJ, Rose NR, Rezaei N. Proinflammatory cytokines in heart failure: double-edged swords. *Heart Fail Rev*. 2010; 15:543-62.
- 337 Kawano S, Kubota T, Monden Y, Kawamura N, Tsutsui H, Takeshita A, Sunagawa K. Blockade of NF- $\kappa$ B ameliorates myocardial hypertrophy in response to chronic infusion of angiotensin II. *Cardiovasc Res*. 2005; 67: 689-98
- 338 Foo RS, Mani K, Kitsis RN. Death begets failure in the heart. *J Clin Invest*. 2005; 115: 565-71
- 339 Kaur K, Sharma AK, Dhingra S, Singal PK. Interplay of TNF- $\alpha$  and IL-10 in regulating oxidative stress in isolated adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;41: 1023-30

- 340 Fedak PW, Verma S, Weisel RD, Li RK. Cardiac remodeling and failure from molecules to man (part II). *Cardiovasc Pathol*. 2005; 14:49–60
- 341 Siwik DA, Chang DL, Colucci WS. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. *Circ Res*. 2000; 86: 1259–1265
- 342 Siwik DA, Colucci WS. Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium. *Heart Fail Rev*. 2004; 9:43–51
- 343 Sivasubramanian N, Coker ML, Kurrelmeyer KM, MacLellan WR, DeMayo FJ, Spinale FG, Mann DL. Left ventricular remodeling in transgenic mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor. *Circulation*. 2001; 104:826-31.
- 344 Li YY, Feng YQ, Kadokami T, McTiernan CF, Draviam R, Watkins SC, Feldman AM. Myocardial extracellular matrix remodeling in transgenic mice overexpressing tumor necrosis factor alpha can be modulated by anti-tumor necrosis factor alpha therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97: 12746-51.
- 345 Semb H, Peterson J, Tavernier J, Olivecrona T. Multiple effects of tumor necrosis factor on lipoprotein lipase in vivo. *J Biol Chem*. 1987; 262: 8390-4.
- 346 Peraldi P, Hotamisligil GS, Buurman WA, White MF, Spiegelman BMTumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. *J Biol Chem*. 1996;271; 22:13018-22
- 347 Dörge H, Schulz R, Belosjorow S, Post H, van De SA, Konietzka I, et al. Coronary microembolization: the role of TNF-alpha in contractile dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 51–62.
- 348 Skyschally A, Gres P, Hoffmann S, Haude M, Erbel R, Schulz R, et al. Bidirectional role of tumor necrosis factor-alpha in coronary microembolization: progressive contractile dysfunction versus delayed protection against infarction. *Circ Res* 2007; 100: 140–6
- 349 Herskowitz A, Choi S, Ansari AA, Wesselingh S. Cytokine mRNA expression in postischemic/reperfused myocardium. *Am J Pathol* 1995; 146: 419–28.
- 350 Lacerda L, Somers S, Opie LH, Lecour S. Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway. *Cardiovasc Res*. 2009; 1;84:201-8.
- 351 Moro C, Jouan MG, Rakotovao A, Toufektsian MC, Ormezzano O, Nagy N, et al. Delayed expression of cytokines after reperfused myocardial infarction: possible trigger for cardiac dysfunction and ventricular remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H3014–9.
- 352 Maekawa N, Wada H, Kanda T, Niwa T, Yamada Y, Saito K, et al. Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factoralpha. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39:1229–35.
- 353 Gurevitch J, Frolkis I, Yuhay Y, Lifschitz-Mercer B, Berger E, Paz Y, et al. Anti-tumor necrosis factor-alpha improves myocardial recovery after ischemia and reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30:1554–61.
- 354 Nakano M, Knowlton AA, Dibbs Z, Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha confers resistance to hypoxic injury in the adult mammalian cardiac myocyte. *Circulation* 1998; 97:1392–1400.
- 355 Deuchar GA, Opie LH, Lecour S. TNFalpha is required to confer protection in an in vivo model of classical ischaemic preconditioning. *Life Sci*. 2007; 80:1686-91.
- 356 Lecour S, Smith RM, Woodward B, Opie LH, Rochette L, Sack MN. Identification of a novel role for sphingolipid signaling in TNF alpha and ischemic preconditioning mediated cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34:509–18.
- 357 Lecour S, James RW. When are pro-inflammatory cytokines SAFE in heart failure? *Eur Heart J*. 2011; 32:680-5.
- 358 Lecour S. Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? *J Mol Cell Cardiol*. 2009; 47:32-40.
- 359 Hilfiker-Kleiner D, Landmesser U, Drexler H. Molecular Mechanisms in Heart Failure: Focus on Cardiac Hypertrophy, Inflammation, Angiogenesis, and Apoptosis *J Am Coll Cardiol* 2006;48:A56–66.
- 360 Anker SD, Ponikowski PP, Clark AL, Leyva F, Rauchhaus M, Kemp M, Teixeira MM, Hellewell PG, Hooper J, Poole-Wilson PA, Coats AJ. Cytokines and neurohormones relating to body composition alterations in the wasting syndrome of chronic heart failure. *Eur Heart J*. 1999; 20: 683-93
- 361 McMurray J, Abdullah I, Dargie HJ, Shapiro D. Increased concentrations of tumour necrosis factor in "cachectic" patients with severe chronic heart failure. *Br Heart J*. 1991; 66: 356-8.
- 362 Vasan RS, Sullivan LM, Roubenoff R, Dinarello CA, Harris T, Benjamin EJ, Sawyer DB, Levy D, Wilson PW, D'Agostino RB; Framingham Heart Study. Inflammatory markers and risk of heart failure in elderly subjects without prior myocardial infarction: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2003; 107: 1486-91.

- 363 Deswal A, Bozkurt B, Seta Y, Pariliti-Eiswirth S, Hayes FA, Blosch C, Mann DL. Safety and efficacy of a soluble P75 tumor necrosis factor receptor (Enbrel, etanercept) in patients with advanced heart failure. *Circulation*. 1999; 99: 3224-6.
- 364 Rauchhaus M, Doehner W, Francis DP, Davos C, Kemp M, Liebenthal C, Niebauer J, Hooper J, Volk HD, Coats AJ, Anker SD. Plasma cytokine parameters and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 2000 ;102: 3060-7.
- 365 Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, Young JB, White BG, Mann DL. Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST). *Circulation*. 2001; 103: 2055-9
- 366 Dunlay SM, Weston SA, Redfield MM, Killian JM, Roger VL. Tumor necrosis factor-alpha and mortality in heart failure: a community study. *Circulation*. 2008; 118: 625-31.
- 367 Feldman AM, Combes A, Wagner D, Kadakomi T, Kubota T, Li YY, McTiernan C. The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 35: 537-44.
- 368 Fukuzawa M, Satoh J, Sagara M, Muto G, Muto Y, Nishimura S, Miyaguchi S, Qiang XL, Sakata Y, Nakazawa T, Ikehata F, Ohta S, Toyota T. Angiotensin converting enzyme inhibitors suppress production of tumor necrosis factor-alpha in vitro and in vivo. *Immunopharmacology*. 1997; 36: 49-55.
- 369 Lindmark E, Siegbahn A. Tissue factor regulation and cytokine expression in monocyte-endothelial cell co-cultures: effects of a statin, an ACE-inhibitor and a low-molecular-weight heparin. *Thromb Res*. 2002; 108: 77-84.
- 370 Wei GC, Sirois MG, Qu R, Liu P, Rouleau JL. Subacute and chronic effects of quinapril on cardiac cytokine expression, remodeling, and function after myocardial infarction in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002;39: 842-50.
- 371 Gage JR, Fonarow G, Hamilton M, Widawski M, Martínez-Maza O, Vredevoe DL. Beta blocker and angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy is associated with decreased Th1/Th2 cytokine ratios and inflammatory cytokine production in patients with chronic heart failure. *Neuroimmunomodulation*. 2004; 11: 173-80.
- 372 Gullestad L, Aukrust P, Ueland T, Espevik T, Yee G, Vagelos R, Frøland SS, Fowler M. Effect of high-versus low-dose angiotensin converting enzyme inhibition on cytokine levels in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1999; 34:2061-7.
- 373 Posch PE, Cruz I, Bradshaw D, Medhekar BA. Novel polymorphisms and the definition of promoter 'alleles' of the tumor necrosis factor and lymphotoxin alpha loci: inclusion in HLA haplotypes. *Genes Immun*. 2003;4:547-58.
- 374 Ohtsuka T, Hamada M, Hiasa G, Sasaki O, Suzuki M, Hara Y, Shigematsu Y, Hiwada K. Effect of beta-blockers on circulating levels of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37: 412-7.
- 375 Cinquegrana G, D'Aniello L, Landi M, Spinelli L, Grande G, De Prisco F, Petretta M. Effects of different degrees of sympathetic antagonism on cytokine network in patients with ischemic dilated cardiomyopathy. *J Card Fail*. 2005; 11:213-9.
- 376 Pauschinger M, Rutschow S, Chandrasekharan K, Westermann D, Weitz A, Peter Schwimmbeck L, Zeichhardt H, Poller W, Noutsias M, Li J, Schultheiss HP, Tschope C. Carvedilol improves left ventricular function in murine coxsackievirus-induced acute myocarditis association with reduced myocardial interleukin-1beta and MMP-8 expression and a modulated immune response. *Eur J Heart Fail*. 2005; 7: 444-52.
- 377 Yuan Z, Shioji K, Kihara Y, Takenaka H, Onozawa Y, Kishimoto C. Cardioprotective effects of carvedilol on acute autoimmune myocarditis: anti-inflammatory effects associated with antioxidant property. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 286:H83-90.
- 378 Gullestad L, Ueland T, Brunsvig A, Kjekshus J, Simonsen S, Frøland SS, Aukrust P. Effect of metoprolol on cytokine levels in chronic heart failure--a substudy in the Metoprolol Controlled-Release Randomised Intervention Trial in Heart Failure (MERIT-HF). *Am Heart J*. 2001; 141:418-21.
- 379 Mizuochi Y, Okajima K, Harada N, Molor-Erdene P, Uchiba M, Komura H, Tsuda T, Katsuya H. Carvedilol, a nonselective beta-blocker, suppresses the production of tumor necrosis factor and tissue factor by inhibiting early growth response factor-1 expression in human monocytes in vitro. *Transl Res*. 2007;149:223-30
- 380 Yue-Chun L, Li-Sha G, Jiang-Hua R, Peng-Lin Y, Jia-Feng L, Ji-Fei T, Peng C, Zhan-Qiu Y. Protective effects of carvedilol in murine model with the coxsackievirus B3-induced viral myocarditis. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008; 51: 92-8.
- 381 Tatli E, Kurum T, Aktoz M, Buyuklu M. Effects of carvedilol on right ventricular ejection fraction and cytokines levels in patients with systolic heart failure. *Int J Cardiol*. 2008;125:273-6.
- 382 Tsutamoto T, Wada A, Matsumoto T, Maeda K, Mabuchi N, Hayashi M, Tsutsui T, Ohnishi M, Sawaki M, Fujii M, Matsumoto T, Yamamoto T, Horie H, Sugimoto Y, Kinoshita M. Relationship between

- tumor necrosis factor-alpha production and oxidative stress in the failing hearts of patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37:2086-92.
- 383 Hajeer A, Hutchison I. TNF- $\alpha$  gene polymorphism: clinical and biological implications. *Microsc Res Tech* 2000; 50:216-28.
- 384 Di Giovine FS, Nuki G, Duff GW. Tumour necrosis factor in synovial exudates. *Ann Rheum Dis.* 1988; 47:768-72.
- 385 Kwiatkowski D, Hill AV, Sambou I, Twumasi P, Castracane J, Manogue KR, Cerami A, Brewster DR, Greenwood BM. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet.* 1990 17; 336: 1201-4.
- 386 Jacob CO, Fronek Z, Lewis GD, Koo M, Hansen JA, McDevitt HO. Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor alpha: relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87: 1233-7
- 387 Abraham LJ, French MAH, Dawkins RL. Polymorphic MHC ancestral haplotypes affect the activity of tumor necrosis factor alpha. *Clin. Exp. Immunol.* 1993; 92, 14-18.
- 388 Bendtzen K, Morling N, Fomsgaard A, Svenson M, Jakobsen B, Odum N, Svejgaard A. Association between HLA-DR2 and production of tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 by mononuclear cells activated by lipopolysaccharide. *Scand J Immunol.* 1988; 28:599-606.
- 389 Brinkman BM, Zuijdeest D, Kaijzel EL, Breedveld FC, Verweij CL. Relevance of the tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) -308 promoter polymorphism in TNF alpha gene regulation. *J Inflamm.* 1995-1996; 46:32-41.
- 390 Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS et al. Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 1984; 312: 724-729.
- 391 Richardson A, Sisay-Joof F, Ackerman H et al. Nucleotide diversity of the TNF gene region in an African village. *Genes Immun* 2001; 2: 343-348.
- 392 Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY et al. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res* 1985; 13: 6361-6373.
- 393 Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet.* 1992 ;1:353.
- 394 Wilson AG, de Vries N, Pociot F, di Giovine FS, van der Putte LB, Duff GW. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. *J Exp Med.* 1993;177: 557-60.
- 395 Feng R, Li Y, Sun C. TNF $\alpha$  -308 G/A polymorphism and type 1 diabetes: a meta analysis. *Diabetes Res Clin Pract* 2009; 85:4-7.
- 396 Wilson AG, Gordon C, di Giovine FS, de Vries N, van de Putte LB, Emery P, Duff GW. A genetic association between systemic lupus erythematosus and tumor necrosis factor alpha. *Eur J Immunol.* 1994 Jan;24(1):191-5.
- 397 Bouma G, Xia B, Crusius JB, Bioque G, Koutroubakis I, Von Blomberg BM, Meuwissen SG, Peña AS. Distribution of four polymorphisms in the tumour necrosis factor (TNF) genes in patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol.* 1996; 103:391-6.
- 398 Sallack N, Akcurin G, Koksay S i sar. TNF alpha G-308A polymorphism is associated with rheumatic fever and correlates with increased TNF alpha production. *Journal of Autoimmunity* 2005; 25:150-54.
- 399 Schmitt Grohe S, Stuber F, Book M, Bargon J, Wagner TO, Naujoks C i sar. TNF alpha promoter polymorphism in relation to TNF alpha production and clinical status in cystic fibrosis. *Lung* 2006; 184: 99-104.
- 400 Kubota T, McNamara DM, Wang JJ, Trost M, McTiernan CF, Mann DL, Feldman AM. Effects of tumor necrosis factor gene polymorphisms on patients with congestive heart failure. VEST Investigators for TNF Genotype Analysis. *Vesnarinone Survival Trial. Circulation.* 1998; 97:2499-501.
- 401 Braun N, Michel U, Ernst BP, Metzner R, Bitsch A, Weber F, Rieckmann P. Gene polymorphism at position -308 of the tumor-necrosis-factor-alpha (TNF-alpha) in multiple sclerosis and it's influence on the regulation of TNF-alpha production. *Neurosci Lett.* 1996; 215:75-8.
- 402 Wu WS, McClain KL. DNA polymorphisms and mutations of the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) promoter in Langerhans cell histiocytosis (LCH). *J Interferon Cytokine Res.* 1997; 17:631-5.
- 403 Wilson, A. G., Symons, J. A., McDowell, T. L., McDevitt, H. O., Duff, G.W. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor a promoter on transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997; 94, 3195-3199
- 404 Ugliarolo AM, Turbay D, Pesavento PA, Delgado JC, McKenzie FE, Gribben JG, Hartl D, Yunis EJ, Goldfeld AE: Identification of three new single nucleotide polymorphisms in the human tumor necrosis factor-alpha gene promoter. *Tissue Antigens.* 1998, 52:359

- 405 Louis E, Franchimont D, Piron A et al. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 401–406.
- 406 Pociot F, Briant L, Jongeneel CV, Molvig J, Worsaae H, Abbal M, Thomsen M, Nerup J, Cambon-Thomsen A. Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF-a and TNF-b by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol*. 1993. 23: 224–231.
- 407 Danis VA, Millington M, Hyland V, Lawford R, Huang Q, Grennan D. Increased frequency of the uncommon allele of a tumour necrosis factor alpha gene polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Dis Markers*. 1995;12:127-33.
- 408 Huizinga TW, Westendorp RG, Bollen EL, Keijsers V, Brinkman BM, Langermans JA, Breedveld FC, Verweij CL, van de Gaer L, Dams L, Crusius JB, García-Gonzalez A, van Oosten BW, Polman CH, Peña ASTNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J Neuroimmunol*. 1997;72: 149-53
- 409 de Jong BA, Westendorp RG, Bakker AM, Huizinga TW. Polymorphisms in or near tumour necrosis factor (TNF)-gene do not determine levels of endotoxin-induced TNF production. *Genes Immun*. 2002;3:25-9.
- 410 Teuffel O, Ethier MC, Beyene J, Sung L. Association between tumor necrosis factor-alpha promoter -308 A/G polymorphism and susceptibility to sepsis and sepsis mortality: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med*. 2010; 38:276-82.
- 411 Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, Cheval C, Monchi M, Teboul JL, Riché F, Leleu G, Arbibe L, Mignon A, Delpech M, Dhainaut JF. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study, *JAMA* 1999; 282:561–568.
- 412 Gao J, Shan G, Sun B, Thompson PJ, Gao X. Association between polymorphism of tumour necrosis factor alpha-308 gene promoter and asthma: a meta-analysis. *Thorax*. 2006; 61: 466-71.
- 413 Korolija M, Hadžija M, Medvidović EP, Pavković P, Kapitanović S, Renar IP, Hadžija MP. Genetic evaluation of the TNF- $\alpha$  -238G>A and -308G>A promoter polymorphisms in Croatian patients with type I diabetes. *Hum Immunol*. 2010; 71:1228-32.
- 414 Rood MJ, van Krugten MV, Zanelli E, van der Linden MW, Keijsers V, Schreuder GM, Verduyn W, Westendorp RG, de Vries RR, Breedveld FC, Verweij CL, Huizinga TW. TNF-308A and HLA-DR3 alleles contribute independently to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2000;43: 129-34.
- 415 Mourão AF, Caetano-Lopes J, Costa P, Canhão H, Santos MJ, Pinto P, Brito I, Nicola P, Cavaleiro J, Teles J, Sousa A, Gomes JM, Branco J, da Costa JT, Pedro JG, de Queiroz MV, Fonseca JE. Tumor necrosis factor-alpha -308 genotypes influence inflammatory activity and TNF-alpha serum concentrations in children with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol*. 2009; 36:837-42.
- 416 Ma J, Nishimura M, Mine H, Kuroki S, Nukina M, Otha M i sar. Genetic contribution of the tumor necrosis region in Guillian-Barre syndrome. *Ann Neurol* 1998; 44: 815-8.
- 417 Jevtovic-Stoimenov T, Kocic G, Pavlovic D, Macukanovic-Golubovic L, Marjanovic G, Djordjevic V, Tosić N, Pavlović S. Polymorphisms of tumor-necrosis factor-alpha -308 and lymphotoxin-alpha +250: possible modulation of susceptibility to apoptosis in chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma mononuclear cells. *Leuk Lymphoma*. 2008; 49: 2163-9.
- 418 Lee YH, Ji JD, Song GG. Tumor necrosis factor-alpha promoter -308 A/G polymorphism and rheumatoid arthritis susceptibility: a metaanalysis. *J Rheumatol*. 2007; 34:43-9
- 419 Lu Z, Chen L, Li H, Zhao Y, Lin L Effect of the polymorphism of tumor necrosis factor-alpha-308 G/A gene promoter on the susceptibility to ulcerative colitis: a meta-analysis. *Digestion*. 2008; 78:44-51.
- 420 Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Strömberg K, van Veldhuisen DJ, Atar D, Hoes AW, Keren A, Mebazaa A, Nieminen M, Priori SG, Swedberg K; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur Heart J*. 2008; 29: 2388-442
- 421 Demeter J, Porzsolt F, Rämisch S, Schmidt D, Schmid M, Messer G. Polymorphisms of the tumor-necrosis factor alpha and lymphotoxin-alpha genes in chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 1997;97:107-112
- 422 Poirier JM, Perez M, Cheymol G, Jaillon P. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic determination of bisoprolol in plasma and urine. *J Chromatogr*. 1988; 426:431-437

- 423 Ptáček P, Macek J, Klíma J Liquid chromatographic determination of carvedilol in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003; 789:405-410
- 424 Milovanović JR, Janković SM. Population pharmacokinetics. *Vojnosanit Pregl.* 2005;62:847-50.
- 425 Vučićević K, Miljković BR, Pokrajac M, Petronijević M. Karakteristike populacionog farmakokinetičkog pristupa analizi podataka i njegov značaj *Arhiv za farmaciju*, 2005, 55:483-496
- 426 Sun H, Fadiran EO, Jones CD, Lesko L, Huang SM, Higgins K et al. Population pharmacokinetics a regulatory perspective. *Clin Pharmacokinet* 1999; 37: 41-58.
- 427 Ette EI, Williams PJ. Population pharmacokinetics I: Background, concepts, and models. *Ann Pharmacother* 2004; 38: 1702-6.
- 428 Bellissant E, Sébille V, Paintaud G. Methodological issues in pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling. *Clin Pharmacokinet* 1998; 35: 151-66.
- 429 Sheiner LB, Beal SL. *NONMEM Users Guide – Part V.* 1994.
- 430 Beal SL, Sheiner LB. *NONMEM Users Guides.* NOMEM Project Group, University of San Francisco, San Francisco, 1998
- 431 Takekuma Y, Takenaka T, Kiyokawa M et al. Evaluation of effects of polymorphism for metabolic enzymes on pharmacokinetics of carvedilol by population pharmacokinetic analysis. *Biol Pharm Bull* 2007; 30: 537-542
- 432 Galiñanes M, James M, Codd V, Baxi A, Hadjinikolaou L. TNF-alpha gene promoter polymorphism at nucleotide -308 and the inflammatory response and oxidative stress induced by cardiac surgery: role of heart failure and medical treatment. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2008;34:332-7
- 433 Henningsen KM, Olesen MS, Pedersen M, Nielsen L, Haunsø S, Bruunsgaard H, Svendsen JH. Single nucleotide polymorphisms in inflammatory genes and the risk of early onset of lone atrial fibrillation. *Inflamm Res* 2010;59:965-9.
- 434 Alikasifoglu M, Tokgözoğlu L, Acil T, Atalar E, Ali Oto M, Sirri Kes S, Tuncbilek E. Tumor necrosis factor-alpha polymorphism in Turkish patients with dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 2003;5:161-3.
- 435 Malave HA, Taylor AA, Nattama J, Deswal A, Mann DL. Circulating levels of tumor necrosis factor correlate with indexes of depressed heart rate variability: a study in patients with mild-to-moderate heart failure. *Chest* 2003;123: 716-24.
- 436 Small KM, Wagoner LE, Levin AM, Kardia SL, Liggett SB. Synergistic polymorphisms of beta1- and alpha2C-adrenergic receptors and the risk of congestive heart failure. *N Engl J Med.* 2002 ; 347:1135-42.
- 437 Biolo A, Clausell N, Santos KG, Salvato R, Ashton-Prolla P, Borges A, Rohde LE. Impact of beta1-adrenergic receptor polymorphisms on susceptibility to heart failure, arrhythmogenesis, prognosis, and response to beta-blocker therapy. *Am J Cardiol.* 2008;102:726-32
- 438 Forleo C, Resta N, Sorrentino S, Guida P, Manghisi A, De L, V, Romito R, Iacoviello M, De TE, Troisi F, Rizzon B, Guanti G, Rizzon P, Pitzalis MV. Association of beta-adrenergic receptor polymorphisms and progression to heart failure in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Med.* 2004; 117: 451-458
- 439 Maqbool A, Hall S.A, Ball, SG and Balmforth AJ. Common polymorphisms of  $\beta_1$ -adrenoreceptor: identification and rapid screening assay [research letter]. *Lancet.* 1999; 353:897.
- 440 Lobmeyer MT, Gong Y, Terra SG, et al. Synergistic polymorphisms of beta1 and alpha 2C-adrenergic receptors and the influence on left ventricular ejection fraction response to beta-blocker therapy in heart failure. *Pharmacogenet Genomics* 2007: 17: 277-282.
- 441 Tesson F, Charron P, Peuchmaurd M, Nicaud V, Cambien F, Tiret L, Poirier O, Desnos M, Jullières Y, Amouyel P, Roizès G, Dorent R, Schwartz K, Komajda M. Characterization of a unique genetic variant in the beta1-adrenoceptor gene and evaluation of its role in idiopathic dilated cardiomyopathy. *CARDIGENE Group. J Mol Cell Cardiol.* 1999;31:1025-32
- 442 Iwai C, Akita H, Shiga N, Takai E, Miyamoto Y, Shimizu M, Kawai H, Takarada A, Kajiya T, Yokoyama M. Suppressive effect of the Gly389 allele of the beta1-adrenergic receptor gene on the occurrence of ventricular tachycardia in dilated cardiomyopathy. *Circ J.* 2002; 66):723-8.
- 443 Covolo L, Gelatti U, Metra M, Nodari S, Picciché A, Pezzali N, Zani C, Alberti A, Donato F, Nardi G, Dei Cas L. Role of beta1- and beta2-adrenoceptor polymorphisms in heart failure: a case-control study. *Eur Heart J.* 2004; 25:1534-41.
- 444 Magnusson Y, Levin MC, Eggertsen R, Nystrom E, Mobini R, Schaufelberger M, Andersson B. Ser49Gly of beta1-adrenergic receptor is associated with effective beta-blocker dose in dilated cardiomyopathy. *Clin Pharmacol Ther.* 2005; 78: 221-231



- 445 Nonen S, Okamoto H, Akino M, Matsui Y, Fujio Y, Yoshiyama M, Takemoto Y, Yoshikawa J, Azuma J, Kitabatake A. No positive association between adrenergic receptor variants of alpha2cDel322-325, beta1Ser49, beta1Arg389 and the risk for heart failure in the Japanese population. *Br J Clin Pharmacol*. 2005; 60: 414-7.
- 446 Metra M, Zani C, Covolo L, Nodari S, Pezzali N, Gelatti U, Donato F, Nardi G, Dei Cas L. Role of beta1- and alpha2c-adrenergic receptor polymorphisms and their combination in heart failure: a case-control study. *Eur J Heart Fail*. 2006 Mar; 8:131-5.
- 447 Tiret L, Mallet C, Poirier O, Nicaud V, Millaire A, Bouhour JB, Roizès G, Desnos M, Dorent R, Schwartz K, Cambien F, Komajda M. Lack of association between polymorphisms of eight candidate genes and idiopathic dilated cardiomyopathy: the CARDIGENE study. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 29–35.
- 448 Aggarwal A, Esler MD, Socratous F, Kaye DM. Evidence for functional presynaptic alpha-2 adrenoceptors and their down-regulation in human heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1246–1251.
- 449 Brede M, Wiesmann F, Jahns R, Hadamek K, Arnolt C, Neubauer S, Lohse MJ, Hein L. Feedback inhibition of catecholamine release by two different alpha2-adrenoceptor subtypes prevents progression of heart failure. *Circulation*. 2002;106: 2491-6.
- 450 Woodiwiss AJ, Badenhorst D, Sliwa K, Brooksbank R, Essop R, Sareli P, Norton GR. Beta1- and alpha2c-adrenoceptor variants as predictors of clinical aspects of dilated cardiomyopathy in people of African ancestry. *Cardiovasc J Afr*. 2008;19:188-93.
- 451 Podlowski S, Wenzel K, Luther HP, et al. Beta1-adrenoceptor gene variations: a role in idiopathic dilated cardiomyopathy? *J Mol Med* 2000;78:87–93.
- 452 Onorato JJ, Palczewski K, Regan JW, Caron MG, Lefkowitz RJ, Benovic JL. Role of acidic amino acids in peptide substrates of the beta-adrenergic receptor kinase and rhodopsin kinase. *Biochemistry*. 1991;30:5118-25
- 453 Chen L, Meyers D, Javorsky G, Burstow D, Lolekha P, Lucas M, Semmler AB, Savarimuthu SM, Fong KM, Yang IA, Atherton J, Galbraith AJ, Parsonage WA, Molenaar P. Arg389Gly-b1-adrenergic receptors determine improvement in left ventricular systolic function in nonischemic cardiomyopathy patients with heart failure after chronic treatment with carvedilol. *Pharmacogenet Genomics*. 2007; 17: 941–949.
- 454 De Groote P, Helbecque N, Lamblin N, Hermant X, McFadden E, Foucher-Hossein C, Amouyel P, Dallongeville J, Bauters C. Association between beta-1 and beta-2 adrenergic receptor gene polymorphisms and the response to beta-blockade in patients with stable congestive heart failure. *Pharmacogenet Genomic*. 2005; 15: 137– 142
- 455 Metra M, Covolo L, Pezzali N, Zacà V, Bugatti S, Lombardi C, Bettari L, Romeo A, Gelatti U, Giubbini R, Donato F, Dei Cas L. Role of beta-adrenergic receptor gene polymorphisms in the long-term effects of beta-blockade with carvedilol in patients with chronic heart failure. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2010; 24: 49-60
- 456 Lowes BD, Gill EA, Abraham WT, Larrain JR, Robertson AD, Bristow MR, Gilbert EM. Effects of carvedilol on left ventricular mass, chamber geometry, and mitral regurgitation in chronic heart failure. *Am J Cardiol*. 1999; 83:1201-5.
- 457 McLean RC, Baird SW, Becker LC, Townsend SN, Gerstenblith G, Kass DA, Tomaselli GF, Schulman SP. Response to catecholamine stimulation of polymorphisms of the beta-1 and beta-2 adrenergic receptors. *Am J Cardiol*. 2012; 110: 1001-7.
- 458 Sandilands AJ, Parameshwar J, Large S, Brown MJ, O'Shaughnessy KM. Confirmation of a role for the 389R>G beta-1 adrenoceptor polymorphism on exercise capacity in heart failure. *Heart*. 2005; 91:1613-4.
- 459 Sandilands AJ, Yeo G, Brown MJ, et al. Functional responses of human b-1 adrenoceptors with defined haplotypes for the common 389R.G and 49S.G polymorphisms. *Pharmacogenetics* 2004; 14:343–9.
- 460 Mancini DM, Henson D, La Manca J, Donchez L, Levine S. Benefit of selective respiratory muscle training on exercise capacity in patients with chronic congestive heart failure. *Circulation*. 1995. 15; 91: 320-9
- 461 Fiuzat M, Neely ML, Starr AZ, Kraus WE, Felker GM, Donahue M, Adams K, Piña IL, Whellan D, O'Connor CM. Association between adrenergic receptor genotypes and beta-blocker dose in heart failure patients: analysis from the HF-ACTION DNA substudy. *Eur J Heart Fail*. 2013; 15:258-66.
- 462 Dungen HD, Apostolovic S, Inkrot S, et al. Dungen HD, Apostolovic S, Inkrot S, Tahirovic E, Töpper A, Mehrhof F, Prettin C, Putnikovic B, Neskovic AN, Krotin M, Sakac D, Lainscak M, Edelmann F, Wachter R, Rau T, Eschenhagen T, Doehner W, Anker SD, Waagstein F, Herrmann-Lingen C, Gelbrich G, Dietz R; CIBIS-ELD investigators and Project Multicentre Trials in the Competence

- Network Heart Failure. Titration to target dose of bisoprolol vs. carvedilol in elderly patients with heart failure: the CIBIS-ELD trial. *Eur J Heart Fail.* 2011; 13:670–680
- 463 Bristow MR, Murphy GA, Krause-Steinrauf H, Anderson JL, Carlquist JF, Thaneemit-Chen S, Krishnan V, Abraham WT, Lowes BD, Port JD, Davis GW, Lazzeroni LC, Robertson AD, Lavori PW, Liggett SB. An alpha<sub>2C</sub>-adrenergic receptor polymorphism alters the norepinephrine-lowering effects and therapeutic response of the beta-blocker bucindolol in chronic heart failure. *Circ Heart Fail.* 2010;3:21-8.
- 464 O'Connor C, Anand I, Fiuzat M, Plehn J, Gottlieb S, Silver M, Lindenfeld J, Miller A, White M, Liggett S, Davis G, Robertson A, Bristow MR, Carson P. Additive effects of  $\beta_1$  389 Arg/Gly  $\alpha_2C$  322–325 Wt/Del adrenergic receptor genotype combinations on adjudicated hospitalizations and death in the BEST trial. *J Cardiac Fail.* 2008; 14, S69
- 465 Bristow MR. Pharmacogenetic targeting of drugs for heart failure. *Pharmacol Ther.* 2012; 134: 107-15.
- 466 Cresci S, Kelly RJ, Cappola TP, Diwan A, Dries D, Kardia SL, Dorn GW 2nd. Clinical and genetic modifiers of long-term survival in heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2009; 54:432-44.
- 467 Sehnert AJ, Daniels SE, Elashoff M, Wingrove JA, Burrow CR, Horne B, Muhlestein JB, Donahue M, Liggett SB, Anderson JL, Kraus WE. Lack of association between adrenergic receptor genotypes and survival in heart failure patients treated with carvedilol or metoprolol. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 52: 644-51.
- 468 Shin J, Lobmeyer M T, Gong Y, Zineh I, Langae, TY, Yarandi H, et al. Relation of  $\beta_2$ -adrenoceptor haplotype to risk of death and heart transplantation in patients with heart failure. *Am J Cardiol.* 2007; 99: 250–255.
- 469 White HL, de Boer RA, Maqbool A, et al. An evaluation of the  $\beta_1$ -adrenergic receptor Arg389Gly polymorphism in individuals with heart failure: a MERIT-HF sub-study. *Eur J Heart Fail.* 2003; 5:463-8.
- 470 Börjesson M, Magnusson Y, Hjalmarsen A, Andersson B. A novel polymorphism in the gene coding for the beta(1)-adrenergic receptor associated with survival in patients with heart failure. *Eur Heart J.* 2000;21:1853-8.
- 471 Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG. Replication validity of genetic association studies. *Nat Genet* 2001; 29:306-9.
- 472 DiNicolantonio JJ, Hackam DG. Carvedilol: a third-generation  $\beta$ -blocker should be a first-choice  $\beta$ -blocker. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2012;10:13-25
- 473 Petersen M, Andersen JT, Hjelvang BR, et al. Association of beta-adrenergic receptor polymorphisms and mortality in carvedilol-treated chronic heart-failure patients. *Br J Clin Pharmacol.* 2011;71: 556–565.
- 474 Rochais F, Vilardaga JP, Nikolaev VO, Bunemann M, Lohse MJ, Engelhardt S. Real-time optical recording of beta<sub>1</sub>-adrenergic receptor activation reveals supersensitivity of the Arg389 variant to carvedilol. *J Clin Invest.* 2007; 117: 229–235.
- 475 Cohn JN, Fowler MB, Bristow MR, Colucci WS, Gilbert EM, Kinhal V, Krueger SK, Lejemtel T, Narahara KA, Packer M, Young ST, Holcslaw TL, Lukas MA. Safety and efficacy of carvedilol in severe heart failure: the US Carvedilol Heart Failure Study Group. *J Card Fail.* 1997;3: 173–179.
- 476 Berger R, Strecker K, Hülsmann M, Frey B, Pacher R, Stanek B. Experience with beta-blocker therapy in patients with advanced heart failure evaluated for HTx. *J Heart Lung Transplant.* 2000; 19:1081-8.
- 477 The Xamoterol in Severe Heart Failure Study Group. Xamoterol in severe heart failure. *Lancet.* 1990;336:1– 6.
- 478 Flather MD, Shibata MC, Coats AJ, Van Veldhuisen DJ, Parkhomenko A, Borbola J, Cohen-Solal A, Dumitrascu D, Ferrari R, Lechat P, Soler-Soler J, Tavazzi L, Spinarova L, Toman J, Böhm M, Anker SD, Thompson SG, Poole-Wilson PA; SENIORS Investigators. Randomized trial to determine the effect of nebivolol on mortality and cardiovascular hospital admission in elderly patients with heart failure (SENIORS). *Eur Heart J.* 2005;26:215–225.
- 479 BEST Trial Investigators. A trial of the beta-adrenergic blocker bucindolol in patients with advanced heart failure. *N Engl J Med* 2001; 344:1659 –1667.
- 480 Cohn JN, Pfeffer MA, Rouleau J, Sharpe N, Swedberg K, Straub M, Wiltse C, Wright TJ. Adverse mortality effect of central sympathetic inhibition with sustained-release moxonidine in patients with heart failure (MOXCON). *Eur J Heart Fail.* 2003;5:659–667.
- 481 Metra M, Eichhorn E, Abraham WT, Linseman J, Böhm M, Corbalan R, DeMets D, De Marco T, Elkayam U, Gerber M, Komajda M, Liu P, Mareev V, Perrone SV, Poole-Wilson P, Roecker E, Stewart J, Swedberg K, Tendera M, Wiens B, Bristow MR; for the ESSENTIAL Investigators. Effects of low-dose oral enoximone administration on mortality, morbidity and exercise capacity in patients with

- advanced heart failure: the randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel group ESSENTIAL Trials. *Eur Heart J*. 2009;30:3015–3026.
- 482 Ahmet I, Krawczyk M, Zhu W, Woo AY, Morrell C, Poosala S, Xiao RP, Lakatta EG, Talan MI. Cardioprotective and survival benefits of long-term combined therapy with beta2 adrenoceptor (AR) agonist and beta1 AR blocker in dilated cardiomyopathy postmyocardial infarction. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;325:491–499.
- 483 Grimm M, Brown JH. Beta-adrenergic receptor signaling in the heart: role of CaMKII. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48:322–330.
- 484 Casey LM, Pistner AR, Belmonte SL, Migdalovich D, Stolpnik O, Nwakanma FE, Vorobiof G, Dunaevsky O, Matavel A, Lopes CM, Smrcka AV, Blaxall BC. Small molecule disruption of G beta gamma signaling inhibits the progression of heart failure. *Circ Res*. 2010;107: 532–539.
- 485 Green SA, Turki J, Innis M, Liggett SB. Amino-terminal polymorphisms of the human beta 2-adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties. *Biochemistry*. 1994; 33:9414-9.
- 486 Green SA, Turki J, Bejarano P, Hall IP, Liggett SB. Influence of beta 2-adrenergic receptor genotypes on signal transduction in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995 ;13:25-33
- 487 Xie HG, Stein CM, Kim RB, Xiao ZS, He N, Zhou HH, Gainer JV, Brown NJ, Haines JL, and Wood AJ. Frequency of functionally important  $\beta_2$  adrenoceptor polymorphisms varies markedly among African-American, Caucasian and Chinese individuals. *Pharmacogenetics*. 1999; 9:511–516.
- 488 Matkovich SJ, Van Booven DJ, Hindes A, Kang MY, Druley TE, Vallania FL, Mitra RD, Reilly MP, Cappola TP, Dorn GW II. Cardiac signaling genes exhibit unexpected sequence diversity in sporadic cardiomyopathy, revealing HSPB7 polymorphisms associated with disease. *J Clin Invest*. 2010; 120: 280–289.
- 489 McGraw, D. W., Forbes, S. L., Kramer, L. A., & Liggett, S. B. Polymorphisms of the 5' leader cistron of the human beta2-adrenergic receptor regulate receptor expression. *J Clin Invest* 1998. 102: 1927–1932.
- 490 Drysdale, C. M., McGraw, D. W., Stack, C. B., Stephens, J. C., Judson, R. S., Nandabalan, K., et al. . Complex promoter and coding region  $\beta_2$ - adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict in vivo responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97, 10483–10488.
- 491 Dewar JC, Wheatley A, Venn A, Morrison JF, Britton J, & Hall IP.  $\beta_2$ -Adrenoceptor polymorphisms are in linkage disequilibrium, but are not associated with asthma in an adult population. *Clin Exp Allergy*. 1998; 28: 442–448.
- 492 Eichhorn EJ. Prognosis determination in heart failure. *Am J Med*. 2001; 110 (suppl):14S–36S.
- 493 Dishy V, Sofowora GG, Xie HG, Kim RB, Byrne DW, Stein CM, Wood AJ. The effect of common polymorphisms of the beta2-adrenergic receptor on agonist-mediated vascular desensitization. *N Engl J Med*. 2001; 345:1030-5
- 494 Liggett SB Polymorphisms of the beta2-adrenergic receptor. *N Engl J Med*. 2002; 346: 536-8
- 495 Liggett SB, Wagoner LE, Craft LL, Hornung RW, Hoit BD, McIntosh TC, Walsh RA. The Ile164 beta2-adrenergic receptor polymorphism adversely affects the outcome of congestive heart failure. *J Clin Invest*. 1998; 102: 1534-9.
- 496 De Groote P, Lamblin N, Helbecque N, Mouquet F, McFadden E, Hermant X, et al. The impact of beta-adrenoreceptor gene polymorphisms on survival in patients with congestive heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2005; 7: 966–973.
- 497 Opasich C, Febo O, Riccardi PG, Traversi E, Forni G, Pinna G, Pozzoli M, Riccardi R, Mortara A, Sanarico M, Cobelli F, Tavazzi L. Concomitant factors of decompensation in chronic heart failure. *Am J Cardiol* 1996;78:354 –357.
- 498 Smilde TD, Hillege HL, Navis G, Boomsma F, de Zeeuw D, van Veldhuisen DJ. Impaired renal function in patients with ischemic and nonischemic chronic heart failure: association with neurohormonal activation and survival. *Am Heart J* 2004;148:165–172.
- 499 Lanfear DE, Jones PG, Marsh S, Cresci S, McLeod HL, Spertus J A.  $\beta_2$ -Adrenergic receptor genotype and survival among patients receiving  $\beta$ -blocker therapy after an acute coronary syndrome. *JAMA*. 2005; 294: 1526–1533.
- 500 Kaye DM, Smirk B, Williams C, Jennings G, Esler M, Host D.  $\beta$ -Adrenoceptor genotype influences the response to carvedilol in patients with congestive heart failure. *Pharmacogenetics*. 2003; 13: 379–382.
- 501 Bruck H, Leineweber K, Temme T, Weber M, Heusch G, Philipp T, Brodde OE. The Arg389Gly beta1-adrenoceptor polymorphism and catecholamine effects on plasma-renin activity. *J Am Coll Cardiol* 46: 2111–2115, 2005.

- 502 Hoit BD, Suresh DP, Craft L, Walsh RA, Liggett SB. beta2-adrenergic receptor polymorphisms at amino acid 16 differentially influence agonist-stimulated blood pressure and peripheral blood flow in normal individuals. *Am Heart J.* 2000; 139:537-42
- 503 Wagoner LE, Craft LL, Singh B, Suresh DP, Zengel PW, McGuire N, Abraham WT, Chenier TC, Dorn GW 2nd, Liggett SB. Polymorphisms of the beta(2)-adrenergic receptor determine exercise capacity in patients with heart failure. *Circ Res.* 2000; 86: 834-40.
- 504 Jessup M, Brozena S. Heart failure. *N Engl J Med.* 2003; 348: 2007-18.
- 505 Bhatia RS, Tu JV, Lee DS, Austin PC, Fang J, Haouzi A, Gong Y, Liu PP Outcome of heart failure with preserved ejection fraction in a population-based study. *N Engl J Med.* 2006; 20;355: 260-9.
- 506 Kindermann M, Maack C, Schaller S, et al. Carvedilol but not metoprolol reduces beta-adrenergic responsiveness after complete elimination from plasma in vivo. *Circulation* 2004; 109:3182–3190.
- 507 Ohlstein EH, Arleth AJ, Storer B, Romanic AM. Carvedilol inhibits endothelin-1 biosynthesis in cultured human coronary artery endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol.* 1998; 30:167-73.
- 508 Muthumala A, Drenos F, Elliott PM, Humphries SE. Role of beta adrenergic receptor polymorphisms in heart failure: systematic review and meta-analysis. *Eur J Heart Fail.* 2008; 10:3-13.
- 509 McNamara DM, Holubkov R, Janosko K, et al. Pharmacogenetic interactions between  $\beta$ -blocker therapy and the angiotensin-converting enzyme deletion polymorphism in patients with congestive heart failure. *Circulation* 2001; 103: 1644-8.
- 510 De Groote P, Helbecque N, Lamblin N, et al.  $\beta$ -Adrenergic receptor blockade and the angiotensin-converting enzyme deletion polymorphism in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2004; 6:17-21.
- 511 Leopold G, Pabst J, Ungethüm W, Bühring KU Basic pharmacokinetics of bisoprolol, a new highly beta 1-selective adrenoceptor antagonist. *J Clin Pharmacol.* 1986; 26: 616-21.
- 512 Kirch W, Rose I, Demers HG, Leopold G, Pabst J, Ohnhaus EE. Pharmacokinetics of bisoprolol during repeated oral administration to healthy volunteers and patients with kidney or liver disease. *Clin Pharmacokinet.* 1987; 13: 110-7.
- 513 Taguchi M, Nozawa T, Igawa A, Inoue H, Takesono C, Tahara K, Hashimoto Y. Pharmacokinetic variability of routinely administered bisoprolol in middle-aged and elderly Japanese patients. *Biol Pharm Bull.*2005; 28:876–881
- 514 Horikiri Y, Suzuki T, Mizobe M. Pharmacokinetics and metabolism of bisoprolol enantiomers in humans. *J Pharm Sci.* 1998; 87:289–294
- 515 Horikiri Y, Suzuki T, Mizobe M Stereoselective metabolism of bisoprolol enantiomers in dogs and humans. *Life Sci.* 1998; 63:1097– 1108
- 516 Nozawa T, Taguchi M, Tahara K, et al. Influence of CYP2D6 genotype on metoprolol plasma concentration and  $\beta$ -adrenergic inhibition during long-term treatment: a comparison with bisoprolol. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 46:713-20.
- 517 Rau T, Heide R, Bergmann K, et al. Effect of the CYP2D6 genotype on metoprolol metabolism persists during long-term treatment. *Pharmacogenetics* 2002; 12:465-72.
- 518 Taguchi M, Nozawa T, Kameyama T et al. Effect of CYP2D6\*10 on pharmacokinetic variability of routinely administered metoprolol in middle-aged and elderly Japanese patients. *Eur J Clin Pharmacol.* 2003; 59:385–388
- 519 Rau T, Wuttke H, Michels LM, Werner U, Bergmann K, Kreft M, Fromm MF, Eschenhagen. Impact of the CYP2D6 genotype on the clinical effects of metoprolol: a prospective longitudinal study. *Clin Pharmacol Ther.* 2009; 85:269–272
- 520 Castagno D, Jhund PS, McMurray JJ, Lewsey JD, Erdmann E, Zannad F, Remme WJ, Lopez-Sendon JL, Lechat P, Follath F, Höglund C, Mareev V, Sadowski Z, Seabra-Gomes RJ, Dargie HJ. Improved survival with bisoprolol in patients with heart failure and renal impairment:an analysis of the cardiac insufficiency bisoprolol study II (CIBIS-II) trial. *Eur J Heart Fail.* 2010;12:607–616
- 521 Tahara K, Saigusa K, Kagawa Y, Taguchi M, Hashimoto Y. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of bisoprolol in rats with bilateral ureter ligation-induced renal failure. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2006; 21:389–394
- 522 Leopold G. Balanced pharmacokinetics and metabolism of bisoprolol. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1986; 8(Suppl):S16–S20
- 523 Dutta A, Lanc R, Begg E, Robson R, Sia L, Dukart G, Desjardins R, Yacobi A. Dose proportionality of bisoprolol enantiomers in humans after oral administration of the racemate. *J Clin Pharmacol.* 1994; 34:829–836
- 524 Bradford LD. CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogen.* 2002; 3:229–243

- 525 Hersberger M, Marti-Jaun J, Rentsch K, Hanseler E. Rapid Detection of the CYP2D6\*3, CYP2D6\*4, and CYP2D6\*6 Alleles by Tetra-Primer PCR and of the CYP2D6\*5 Allele by Multiplex Long PCR. *Clin Chem*. 2000; 46:1072–1077
- 526 Albers S, Meibohm B, Mir TS, Läer S. Population pharmacokinetics and dose simulation of carvedilol in paediatric patients with congestive heart failure. *Br J Clin Pharmacol*. 2008; 65:511-22.
- 527 Horiuchi I, Nozawa T, Fujii N, Inoue H, Honda M, Shimizu T, Taguchi M, Hashimoto Y. Pharmacokinetics of R- and S-carvedilol in routinely treated Japanese patients with heart failure. *Biol Pharm Bull*. 2008; 31:976-80.
- 528 Sehrt D, Meineke I, Tzvetkov M, Gültepe S, Brockmöller J. Carvedilol pharmacokinetics and pharmacodynamics in relation to CYP2D6 and ADRB pharmacogenetics. *Pharmacogenomics*. 2011;12:783-95
- 529 Ito M, Takahashi H, Fuse K, et al. Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 genes in Japanese patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Jpn Heart J* 2000; 41:183–91.
- 530 Densem CG, Hutchinson IV, Yonan N, Brooks NH. Tumour necrosis factor alpha gene polymorphism: a predisposing factor to non-ischaemic myocardial dysfunction? *Heart*. 2002;87:153-5.
- 531 Brooksbank R, Badenhorst D, Sliwa K, Norton G, Woodiwiss A. The G-308A polymorphism of the TNF-alpha gene does not predict changes in cardiac function in response to medical therapy for idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc J Afr*. 2008; 19:254-8.
- 532 Yamada T, Matsumori A, Sasayama S. Therapeutic effect of anti-tumor necrosis factor-alpha antibody on the murine model of viral myocarditis induced by encephalomyocarditis virus. *Circulation*. 1994; 89: 846-51.
- 533 Smith SC, Allen PM Neutralization of endogenous tumor necrosis factor ameliorates the severity of myosin-induced myocarditis. *Circ Res*. 1992; 70: 856-63.
- 534 Krown KA, Page MT, Nguyen C, Zechner D, Gutierrez V, Comstock KL, Glembotski CC, Quintana PJ, Sabbadini RA. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes. Involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death. *J Clin Invest*. 1996; 98:2854-65.
- 535 Miettinen KH, Lassus J, Harjola VP, Siirilä-Waris K, Melin J, Punnonen KR, Nieminen MS, Laakso M, Peuhkurinen KJ. Prognostic role of pro- and anti-inflammatory cytokines and their polymorphisms in acute decompensated heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2008; 10:396-403
- 536 Allen RA, Lee EM, Roberts DH, Park BK, Pirmohamed M. Polymorphisms in the TNF-alpha and TNF-receptor genes in patients with coronary artery disease. *Eur J Clin Invest*. 2001;31: 843-51.
- 537 Keso T, Perola M, Laippala P, Ilveskoski E, Kunnas TA, Mikkelsen J, Penttilä A, Hurme M, Karhunen PJ. Polymorphisms within the tumor necrosis factor locus and prevalence of coronary artery disease in middle-aged men. *Atherosclerosis*. 2001;154:691-7.
- 538 Ghaderian SM, Akbarzadeh Najar R, Tabatabaei Panah AS Tumor necrosis factor- $\alpha$ : investigation of gene polymorphism and regulation of TACE-TNF- $\alpha$  system in patients with acute myocardial infarction. *Mol Biol Rep*. 2011; 38:4971-7.
- 539 Sun M, Dawood F, Wen WH, Chen M, Dixon I, Kirshenbaum LA, Liu PP. Excessive tumor necrosis factor activation after infarction contributes to susceptibility of myocardial rupture and left ventricular dysfunction. *Circulation*. 2004; 110: 3221-8.
- 540 Berthonneche C, Sulpice T, Boucher F, Gouraud L, de Leiris J, O'Connor SE, Herbert JM, Janiak P. New insights into the pathological role of TNF-alpha in early cardiac dysfunction and subsequent heart failure after infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 287: H340-50.
- 541 Sugano M, Tsuchida K, Hata T, Makino N. In vivo transfer of soluble TNF-alpha receptor 1 gene improves cardiac function and reduces infarct size after myocardial infarction in rats. *FASEB J*. 2004; 18: 911-3.
- 542 Monden Y, Kubota T, Tsutsumi T, Inoue T, Kawano S, Kawamura N, Ide T, Egashira K, Tsutsui H, Sunagawa K. Soluble TNF receptors prevent apoptosis in infiltrating cells and promote ventricular rupture and remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2007; 73: 794-805.
- 543 Spinarová L, Spinar J, Vasků A, Pávková-Goldbergová M, Ludka O, Tomandl J, Vítovec J. Genetics of humoral and cytokine activation in heart failure and its importance for risk stratification of patients. *Exp Mol Pathol*. 2008 ;84: 251-5.
- 544 Malave HA, Taylor AA, Nattama J, Deswal A, Mann DL. Circulating levels of tumor necrosis factor correlate with indexes of depressed heart rate variability: a study in patients with mild-to-moderate heart failure. *Chest*. 2003; 123: 716-24
- 545 Straburzyńska-Migaj E, Ochotny R, Wachowiak-Baszyńska A, Straburzyńska-Lupa A, Leśniewska K, Wiktorowicz K, Cieśliński A. Cytokines and heart rate variability in patients with chronic heart failure. *Kardiol. Pol*. 2005; 63: 478-85
- 546 Aronson D, Mittleman MA, Burger AJ. Interleukin-6 levels are inversely correlated with heart rate variability in patients with decompensated heart failure. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2001; 12: 294-300

- 547 Heymans S, Hirsch E, Anker SD, Aukrust P, Balligand JL, Cohen-Tervaert JW, Drexler H, Filippatos G, Felix SB, Gullestad L, Hilfiker-Kleiner D, Janssens S, Latini R, Neubauer G, Paulus WJ, Pieske B, Ponikowski P, Schroen B, Schultheiss HP, Tschöpe C, Van Bilsen M, Zannad F, McMurray J, Shah AM. Inflammation as a therapeutic target in heart failure? A scientific statement from the Translational Research Committee of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail.* 2009; 11: 119-29
- 548 Torre-Amione G. Immune activation in chronic heart failure. *Am. J. Cardiol.* 2005; 95: 3C-8C
- 549 Kubota T, Miyagishima M, Alvarez RJ, Kormos R, Rosenblum WD, Demetris AJ, Semigran MJ, Dec GW, Holubkov R, McTiernan CF, Mann DL, Feldman AM, McNamara DM. Expression of proinflammatory cytokines in the failing human heart: comparison of recent-onset and end-stage congestive heart failure. *J. Heart Lung Transplant.* 2000; 19, 819-24
- 550 Petretta M, Condorelli GL, Spinelli L, Scopacasa F, de Caterina M, Leosco D, Vicario ML, Bonaduce D. Circulating levels of cytokines and their site of production in patients with mild to severe chronic heart failure. *Am. Heart J.* 2000; 140: E28
- 551 Aderka D, Engelmann H, Maor Y, Brakebusch C, Wallach D (1992) Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J Exp Med* 175:323-329
- Bautista LE, López-Jaramillo P, Vera LM, Casas JP, Otero AP, Guaracao AI. Is C-reactive protein an independent risk factor for essential hypertension? *J Hypertens.* 2001; 19: 857-61
- 552 De Groote D, Grau GE, Dehart I, Franchimont P. Stabilization of functional tumor necrosis factor- $\alpha$  by its soluble TNF receptors. *Eur Cytokine Net.* 1993; 4: 359-362
- 553 Koller-Strametz J, Pacher R, Frey B, Kos T, Woloszczuk W, Stanek B. Circulating tumor necrosis factor-alpha levels in chronic heart failure: relation to its soluble receptor II, interleukin-6, and neurohumoral variables. *J. Heart Lung Transplant.* 1998; 17: 356-62
- 554 Stein PK, Bosner MS, Kleiger RF, et al. Heart rate variability: A measure of cardiac autonomic tone. *Am. Heart J.* 2008; 127: 420-424
- 555 Diakakis GF, Parthenakis FI, Mavrakis HE, Patrianakos AP, Zacharis EA, Nyktari EG, Ganotakis ES, Vardas PE. Association of impaired glucose tolerance with increased heart rate and subclinical inflammation. *Hellenic J Cardiol.* 2005; 46: 394-401
- 556 Bautista LE, López-Jaramillo P, Vera LM, Casas JP, Otero AP, Guaracao AI. Is C-reactive protein an independent risk factor for essential hypertension? *J Hypertens.* 2001; 19: 857-61
- 557 Kop WJ, Stein PK, Tracy RP, Barzilay JI, Schulz R, Gottdiener JS. Autonomic nervous system dysfunction and inflammation contribute to the increased cardiovascular mortality risk associated with depression. *Psychosom Med.* 2010; 72: 626-35
- 558 Nolan J, Batin PD, Andrews R, Lindsay SJ, Brooksby P, Mullen M, Baig W, Flapan AD, Cowley A, Prescott RJ, Neilson JM, Fox KA. Prospective study of heart rate variability and mortality in chronic heart failure. *Circulation.* 1998; 98: 1510-1516
- 559 Tsuji H, Venditti FJ, Manders ES, Evans JC, Larson MG, Feldman CL, Levy D. Reduced heart rate variability and mortality risk in an elderly cohort. The Framingham Heart Study. *Circulation.* 1994; 90: 878-883
- 560 Lombardi F. Clinical implications of present physiological understanding of HRV components. *Cardiac Electrophysiol Rev.* 2002; 6, 245-9
- 561 Kinugawa T, Dibner-Dunlap ME. Altered vagal and sympathetic control of heart rate in left ventricular dysfunction and heart failure. *Am J Physiol.* 1995; 268: R317-R323
- 562 Schwartz PJ, De Ferrari GM, Sanzo A, Landolina M, Rordorf R, Raineri C, Campana C, Revera M, Ajmone-Marsan N, Tavazzi L, Odero A. Long term vagal stimulation in patients with advanced heart failure: first experience in man. *Eur J Heart Fail.* 2008; 10, 8
- 563 Li M, Zheng C, Sato T, Kawada T, Sugimachi M, Sunagawa K (2005) Vagal nerve stimulation markedly improves long-term survival after chronic heart failure in rats. *Circulation* 109, 120-484-91
- 564 Bozkurt B, Mann DL, Deswal A. Biomarkers of inflammation in heart failure. *Heart Fail Rev.* 2010; 15: 331-41.

## Sažetak

U srčanoj insuficijenciji postoji poremećaj beta adrenergičke signalizacije. Nedavne studije su pokazale da postoje funkcionalno relevanti i zajednjički polimorfizmi za oba beta adrenergička receptora,  $\beta_1$ -AR i  $\beta_2$ -AR. Ne postoje konzistentni rezultati kada je u pitanju korelacija ovih polimorfizama sa patogenezom, kliničkom prezentacijom i prognozom srčane insuficijencije. Značaj beta adrenergičkih receptora u srčanoj insuficijenciji je još veći zbog primene  $\beta$ -blokatora koji redukuju mortalitet. Nije poznato da li je odgovor pacijenta sa SI na  $\beta$  blokatore udružen sa genotipom enzima koji učestvuju u njihovom metabolisanju.

Ispitivana je korelacija polimorfizama adrenergičkih receptora  $\beta_1$ Ser49Gly,  $\beta_1$ Arg389Gly i  $\beta_2$ Arg16Gly sa rizikom za pojavu SI u srpskoj populaciji koristeći model pacijent-kontrola. Frekvence ispitivanih genotipa je bila u Hardy-Weinberg ravnoteži. Polimorfizam je bio analiziran lančanom reakcijem polimeraze sa restriktivnom digestijom (PCR-RFLP) kod pacijenata sa SI i zdravih ispitanika.

Takođe je ispitivan uticaj ova tri funkcionalna polimorfizma na preživljavanje, hospitalizaciju i potrebu za hitnom medicinskom pomoći pacijenata sa SI koji su na terapiji karvedilolom, bisoprololom i metoprololom. U te svrhe, ispitano je 70 pacijenata sa SI lečenih na klinici, a njihov vitalni status je evaluiran na osnovu elektronski bolničkih, i podataka iz Hitne medicinske pomoći kao i baze podataka umrlih.

Cilj ove studije, pored toga, bio je da razvije populacioni farmakokinetički model za klirens karvedilola i bisoprolola kod odraslih pacijenata sa SI koristeći nelinearno modelovanje kombinovanih efekata (NONMEM).

Osim navedenih, jedan od ciljeva ove teze bio je i da se determiniše da li genski polimorfizam *CYP2D6* korelira sa dozom ili odgovorom na terapiju bisoprolola i karvedilola pacijenata sa SI. Merena je koncentracija karvedilola i bisoprolola na HPLC-u, a efekti na krvni pritisak i frekvencu srčanog rada u miru analizirani su multivarijantnom kliničko-genetskom analizom.

Nije dokazana značajnija razlika u frekvenci alela i genotipa ispitivanih polimorfizama  $\beta_1$ Ser49Gly,  $\beta_1$ Arg389Gly i  $\beta_2$ Arg16Gly kod pacijenata sa SI u odnosu na kontrolnu grupu. Ni jedan od njih nije udružen sa izmenjenim ishodom (hospitalizacija, hitnu pomoć ili mortalitet). Dokazana je statistički značajna alel-specifična razlika *CYP2D6* na farmakokinetiku karvedilola, ali sam *CYP2D6* genotip nije imao uticaja na rad srca i visinu krvnog pritiska. Naš populacioni farmakokinetički (PFK) model klirensa karvedilola kod adultnih pacijenata standardno lečenih je pokazao da totalna telesna masa, udružena terapija digoksinom i pušenje mogu biti glavni subjekti varijabilnosti u farmakokinetici karvedilola. Konačno, PPK model klirensa bisoprolola je pokazao da je totalna dnevna doza jedino važna kovarijanta.

Možemo da zaključimo da su  $\beta$ -blokatori lekovi kod kojih se *CYP2D6*-vezane farmakokinetičke varijacije očito ne prenose na farmakokinetičku varijabilnost. Iako postojeće znanje ne dopušta korištenje  $\beta_1$ -AR i  $\beta_2$ -AR genotipova za kliničko lečenje, naši podaci bi trebali podstaknuti dalja istraživanja o uticaju tih genotipova na zdravlje i bolesti.

## Summary

The beta-adrenergic receptor ( $\beta$ -AR) pathway is altered in heart failure. Recent studies have discovered functionally relevant and common polymorphisms in both  $\beta_1$ -AR and  $\beta_2$ -AR. These polymorphisms have been implicated with inconsistent results in the pathogenesis, clinical presentation, and prognosis of patients with heart failure (HF). In patients with HF,  $\beta$ -blockers reduce mortality. It's not known whether the response to  $\beta$  blockers in patients with HF could be associated with the genotype of drug-metabolizing enzymes and/or drug targets.

We investigated the correlation of adrenergic receptor polymorphisms  $\beta_1$ Ser49Gly,  $\beta_1$ Arg389Gly and  $\beta_2$ Arg16Gly with the risk of HF in Serbian population using a case-control study design. The genotype frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium. These polymorphisms were analysed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism in patients with HF and compared with the control group.

We also investigated the impact of 3 functional polymorphisms on survival, hospitalization and emergency department (ED) visits due to HF in carvedilol- and bisoprolol-treated HF patients. For these propose, 70 patients were enrolled and followed up at the HF clinic, and vital status was evaluated using electronic hospital and emergency department records and a local death certificate database.

The aim of this study was to derive population pharmacokinetic (PK) model for clearance (CL) of carvedilol and bisoprolol, respectively in adult patients with HF using non-linear mixedeffect modeling (NONMEM).

Finally, purpose of this study was to determine whether genetic polymorphisms in *CYP2D6* correlated with dose of, or response to, bisoprolol or carvedilol treatment in patients with HF. Carvedilol and bisoprolol concentrations were quantified and effects on resting heart rate and blood pressure were analyzed using a multivariable clinical-genetic analysis.

There were no differences or any trends in the allele and genotype frequencies of the  $\beta_1$ Ser49Gly,  $\beta_1$ Arg389Gly and  $\beta_2$ Arg16Gly polymorphisms. None of these polymorphisms were associated with adverse outcomes (hospitalization, ED visits or mortality). There were significant *CYP2D6* allele-specific differences in carvedilol pharmacokinetics, but the *CYP2D6* genotype had no effect on heart rate and blood pressure. Our population pharmacokinetic (PPK) model for the clearance of carvedilol in routinely treated adult patients with CHF showed that the total body weight, concomitant therapy with digoxin and smoking tobacco were the main subjects of carvedilol pharmacokinetic variability. Finally, PPK model for the clearance of bisoprolol showed that the total daily dose of bisoprolol was the only important covariate.

In conclusion,  $\beta$ -blockers are the drugs where *CYP2D6*-related pharmacokinetic variation is apparently not carried forward into pharmacodynamic variation. Although current knowledge does not allow utilizing  $\beta_1$ -AR and  $\beta_2$ -AR genotypes for clinical treatment decisions, our data should stimulate further research on the impact of these genotypes in health and disease.



# BIOGRAFIJA

## Osnovni podaci:

Ime i prezime: Valentina Nikolić  
Datum i mesto rođenja: 01.02.1970.god., Leskovac  
Naučna oblast: Medicina

## Obrazovanje:

Naziv magistarske teze: „Uloga kalcijumskih kanala u mehanizmima depresivnog i antikonvulzivnog dejstva alkohola u centralnom nervnom sistemu”

Naučna oblast: Medicina-farmakologija  
Godina i mesto odbrane: 2004.godine, Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu

Osnovne akademske studije: Medicinski fakultet Niš, odsek medicina  
Godina završetka i prosečna ocena: 1995.god., prosečna ocena: 9.52

## Rezultati naučno istraživačkog rada (izabrane publikacije):

1. **Nikolic VN**, Jankovic SM, Velickovic-Radovanović R, Apostolović S, Stanojevic D, Zivanovic S, Stefanovic N, Pesic S, Jevtovic-Stoimenov T, Djuric J, Markovic V, Milovanovic JR. Population pharmacokinetics of carvedilol in patients with congestive heart failure. J Pharm Sci. 2013 May 31. doi: 10.1002/jps.23626;
2. **Nikolic VN**, Jevtovic-Stoimenov T, Stokanovic D, Milovanovic M, Velickovic-Radovanović R, Pesic S, Stoilkovic M, Pesic G, Ilic S, Deljanin-Ilic M, Marinkovic D, Stefanovic N, Jankovic SM. An inverse correlation between TNF alpha serum levels and heart rate variability in patients with heart failure. J Cardiology 2013; DOI 10.1016/j.jjcc.2013.02.013
3. **Nikolic VN**, Jevtovic-Stoimenov T, Velickovic-Radovanović R, Ilic S, Deljanin-Ilic M, Marinkovic D, Apostolović S, Stanojevic D, Zivanovic S, Stefanovic N, Pesic S, Ruzic-Zececic D, Milovanovic JR, Jankovic SM. Population pharmacokinetics of bisoprolol in patients with chronic heart failure Eur J Clin Pharmacol 2013; 69: 859-865.
4. Milovanovic M, Pesic G, **Nikolic V**, Vasic K, Jovic Z, Deljanin-Ilic M, Pesic S. Vitamin D deficiency is associated with increased IL-17 and TNF $\alpha$  levels in patients with chronic heart failure. Arquivos Brasileiros de Cardiologia 2012; 98(3):259-265.