

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Иван Р. Животић

**Асоцијација генских варијанти на
хромозому 9p21 и транскрипције гена за
CDKN2B и HACD4 са настанком
атеросклерозе и њеним клиничким
компликацијама код човека**

докторска дисертација

Београд, 2019

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ivan R. Životić

**Asocijacija genskih varijanti na hromozomu
9p21 i transkripcije gena za CDKN2B i HACD4
sa nastankom ateroskleroze i njenim kliničkim
komplikacijama kod čoveka**

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ivan R. Životić

**Association of genetic variants in
chromosome 9p21 and transcription of
CDKN2B and HACD4 genes with the onset of
atherosclerosis and its clinical complications
in human**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

Mentori:

dr Maja Živković, naučni savetnik

Institut za nuklearne nauke “Vinča”, Univerzitet u Beogradu

dr Goran Brajušković, redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr Maja Živković, naučni savetnik

Institut za nuklearne nauke “Vinča”, Univerzitet u Beogradu

dr Goran Brajušković, redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Tamara Đurić, viši naučni saradnik

Institut za nuklearne nauke “Vinča”, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija urađena je u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, Univerziteta u Beogradu, kao deo projekata čiji je neposredni rukovodilac dr Dragan Alavantić, kome se zahvaljujem na pruženoj prilici da se bavim naučno-istraživačkim radom u oblasti molekularne genetike.

Posebnu zahvalnost dugujem mentorki, dr Maji Živković na stručnim savetima i sugestijama u osmišljavanju i izradi ove doktorske disertacije.

Mentoru, dr Goranu Brajuškoviću se zahvaljujem na stručnim savetima, detaljnom pregledu i oceni doktorske disertacije.

Zahvaljujem se dr Tamari Đurić Delić na pomći, stručnim i prijateljskim savetima tokom dosadašnjeg istraživačkog rada.

Zahvaljujem se dr Aleksandri Stanković na stručnim i kvalitetnim savetima i podršci tokom dosadašnjeg istraživačkog rada.

Zahvaljujem se svim kolegama iz Laboratorije: Ani Kolaković, Ljiljani Stojković, Ani Đorđević, Jovani Kuveljić, Magdaleni Anđeleovski, Maji Bubić, Ivani Kolić, Ivanu Jovanoviću i Milanu Stefanoviću, koji su učinili da vreme provedeno u laboratoriji bude kvalitetno, uzbudljivo, koji su bili konstantna podrška u realnim i nerealnim granicama. Hvala im na timskom radu, prijateljskim savetima, inspiraciji, i posebno hvala što su uspeali da me istrpe svo ovo vreme!

Hvala državi Srbiji, koja mi je omogućila da se razvijam kao stručnjak kroz rad na projektima od nacionalnog značaja i da stičem dodatna znanja i veštine na seminarima u zemlji i inostranstvu!

Hvala porodici i prijateljima što su uz mene!

Mojoj Jovani[©] hvala na jakim žvcima na nosalomivom strpljenju i ljubavi koju mi pruža!

Ova doktorska disertacija urađena je u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke “Vinča” u okviru projekta finansiranog od strane Ministarstva nauke prosvete, i tehnološkog razvoja Republike Srbije (III41028).

Sažetak

Ateroskleroza je kompleksna, hronična i progresivna bolest arterijskih krvnih sudova koja se razvija tokom života i najčešće se klinički manifestuje u kasnijem životnom dobu. Dve najznačajnije kliničke komplikacije su ishemijski moždani i srčani udar (IM), na čiji nastanak utiču sredinski i nasledni faktori (genetska predispozicija). U ovoj studiji ispitana je asocijacija četiri genetičke varijante prisutne u hromozomskom regionu 9p21 (rs10757278 i rs518394 u genu *ANRIL*, i rs36212560 i rs2275888 u genu *HACD4*), sa rizikom za nastanak IM, karotidnog plaka (KP) i kliničkih komplikacija KP (ultrasonografski definisan tip plaka, simptomatska karotidna bolest, prisustvo ulceracije na plaku). Ispitana je transkripcija gena *CDKN2B* i *HACD4* kao i nivo iRNK u tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka i mononuklearnim ćelijama periferne krvi (MČPK) bolesnika koji su doživeli prvi IM, 6 meseci nakon infarkta. Nivo iRNK ispitan je u odnosu na genotipove i tip karotidnog plaka.

Utvrđena je značajna asocijacija rs10757278 sa rizikom za nastanak KP kod žena. Utvrđeno je da je haplotip genetičkih varijanti rs36212560 i rs2275888 značajno asociiran sa rizikom za nastanak KP i IM. Rezultat je pokazao polno specifičnu asocijaciju (kod muškaraca) kao i značajnu asocijaciju varijante rs36212560 testirane van haplotipa. Nije detektovana značajna asocijacija genetičkih varijanti rs2275888 i rs518394 sa rizikom za razvoj karotidnog plaka, ali je ustanovljena značajna, nezavisna asocijacija varijante rs2275888 sa rizikom za nastanak IM. Varijanta rs10757278 je značajno asociirana sa tipom karotidnog aterosklerotskog plaka. Ustanovljeno je da je haplotip varijanti rs36212560 i rs2275888 značajno asociiran sa rizikom za razvoj ulceracije karotidnog plaka, i sa simptomatskom karotidnom bolešću u grupi bolesnika sa KP, kao i da polno specifična asocijacija sa haplotipom postoji kod muškaraca.

Razlika u nivoima ekspresije merena je na nivou iRNK u odnosu na genotipove ispitivanih varijanti. U tkivu KP nije detektovana razlika u nivou iRNK za *CDKN2B* u odnosu na genotipove ispitivanih varijanti, ali je ustanovljen statistički trend u asocijaciji sa genotipom varijante rs1075278. Varijanta rs2275888 je prethodno okarakterisan kao eQTL (eng. *expression Quantitative Trait Locus*) za gen *FOCAD* gen u tibijalnoj arteriji. Da bi se ispitaio efekat varijante rs2275888 na nivo ekspresije

obližnjih gena urađena je replikacija ekspresije gena *FOCAD* u tkivu karotidnog plaka i dobijena je značajna asocijacija, rezultat prethodno dobijen od strane GTEx konzorcijuma u tibijalnoj arteriji.

U MĆPK je detektovana značajna asocijacija varijante rs10757278, i statistički trend u asocijaciji varijante rs518394 i relativnim nivoom ekspresije iRNK za *CDKN2B*. U MĆPK nije detektovana značajna asocijacija u nivou iRNK gena *HACD4* sa genotipovima ispitivanih varijanti.

Detektovan je snižen nivo iRNK gena *CDKN2B* u MĆPK bolesnika sa IM (6 meseci nakon prvog infarkta miokarda) u odnosu na zdrave kontrole.

Ključne reči: studija asocijacije, genetičke varijante, karotidni plak, infarkt miokarda, 9p21, *CDKN2B*, *HACD4*, *FOCAD*, iRNK, relativna ekspresija

Naučna oblast: Biomedicina

Uža naučna oblast: Molekularna genetika

Abstract

Atherosclerosis is a complex, chronic and progressive disease of arterial blood vessels that develops during the life and usually with clinical manifestations at later age. Two most significant clinical manifestations are stroke and myocardial infarction (MI), which development is affected by the median and hereditary factors (genetic predisposition). In this study, association of four genetic variants from chromosome region 9p21 have been investigated (rs10757278 and rs518394 in the *ANRIL* gene, and rs36212560 and rs2275888 in the *HACD4* gene) with the risk for development of MI, the carotid plaque (CP) and its clinical complications (ultrasonographically defined plaque type, symptomatic disease, presence of carotid plaque ulceration). The transcription of genes *CDKN2B* and *HACD4* at the mRNA level was examined in the CP tissue and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients who sustained first MI, six months after the infarction. Level of mRNA was examined in relation to genotypes and CP type.

Significant association was determined for rs10757278 with the risk for CP development among females. It was determined that haplotype of gene variants rs36212560 and rs2275888 is significantly associated with the risk for CP and MI development. Result has shown gender specific association (among males) as well as association of rs36212560 with CP and MI when tested independently. It wasn't detected significant association of gene variants rs2275888 and rs518394 with the risk for the development of CP, but, the significant independent association of rs2275888 variant with the risk for MI. Variant rs10757278 is significantly associated with the carotid atherosclerotic plaque type. Haplotype of rs36212560 and rs2275888 variants is significantly associated with the carotid plaque ulceration, as well as with symptomatic carotid disease in the group of CP patients., and in addition, the gender specific association with the haplotype exist in males.

Difference in expression levels was measured at the level of mRNA in relation to genotypes of tested variants. In CP tissue difference in *CDKN2B* mRNA level wasn't detected in relation to tested variants according to genotype, but statistical trend was detected in association with rs10757278 genotypes. Variant rs2275888 was previously characterized as eQTL (*expression Quantitative Trait Locus*) for gene *FOCAD* in tibial

artery. To investigate effect of variant rs2275888 on proximal genes expression level, the validation of the gene *FOCAD* expression was conducted in CP tissue and the significant association was detected, the result previously obtained by GTEx consortia in tibial artery.

In PBMC, significant association of variant rs10757278 and statistical trend in association of variant rs518394 with the level of *CDKN2B* mRNA expression was detected. It wasn't detected significant association of *HACD4* mRNA level with the genotypes of investigated variants in PBMC.

A significantly lower *CDKN2B* mRNA level was detected in PBMC of MI patients 6 months after first MI in relation to healthy controls.

Key words: association study, genetic variants, carotid plaque (CP), myocardial infarction (MI), 9p21, *CDKN2B*, *HACD4*, *FOCAD*, mRNA

Scientific field: Biomedicine

Special topic: Molecular genetics

Sadržaj

1	UVOD	1
1.1	Ateroskleroza i kardiovaskularne bolesti	1
1.1.1	Nastanak i progresija ateroskleroze	2
1.1.2	Epidemiologija ishemijskog moždanog udara i infarkta miokarda	3
1.2	Genetička osnova ateroskleroze	6
1.2.1	Hromozomski region 9p21	8
1.2.2	Asocijacija hromozomskog regiona 9p21 sa nastankom bolesti	9
1.2.3	Značaj hromozomskog regiona 9p21 za nastanak bolesti (efekat na fenotipske karakteristike)	12
1.2.4	Promene u nivoima ekspresijegena hromozomskog regiona 9p21 i njihov značaj u molekularnim mehanizimam nastanka bolesti.....	13
1.3	Inhibitor ciklin zavisne protein kinase 2B (CDKN2B).....	16
1.3.1	Gen <i>CDKN2B</i>	16
1.3.2	Protein CDKN2B.....	17
1.4	3-Hidroxiacil Koenzim A dehidrataza 4 (HACD4).....	18
1.4.1	Gen <i>HACD4</i>	18
1.4.2	Protein HACD4	18
1.5	Genetičke varijante hromozomskog regiona 9p21 ispitane u studiji	20
1.5.1	Varijanta rs10757278 u genu <i>ANRIL</i>	20
1.5.2	Varijanta rs518394 u genu <i>ANRIL</i>	21
1.5.3	Varijanta rs2275888 u genu <i>HACD4</i>	23
1.5.4	Varijanta rs36212560 u genu <i>HACD4</i>	23
2	HIPOTEZA I CILJEVI	24
3	MATERIJAL I METODE.....	25
3.1	Materijal	25

3.1.1	Uzorak	25
3.1.2	Aparatura	26
3.2	Metode.....	27
3.2.1	Ultrazvučna karakterizacija karotidnog plaka	27
3.2.2	Definicija simptomatske karotidne stenoze.....	28
3.2.3	Karakterizacija bolesnika sa IM	28
3.2.4	Anamnestički podaci bolesnika sa KP i IM	29
3.2.5	Laboratorijske analize krvi	29
3.2.6	Ekstrakcija DNK iz ćelija pune periferne krvi fenol-hloroformskom metodom.....	30
3.2.7	Ekstrakcija DNK iz periferne krvi na aparatu ABI PRISM™ 6100 Nucleic Acid PrepStation	32
3.2.8	Merenje koncentracije i provera čistoće izolovane DNK.....	33
3.2.9	Genotipizacija varijante rs36212560 I/D u genu <i>HACD4</i>	34
3.2.10	Elektroforeza na poliakrilamidnom (PAA) gelu	35
3.2.11	Genotipizacija varijanti rs1075278 i rs518394 u genu <i>ANRIL</i> , rs2275888 u genu <i>HACD4</i>	36
3.2.12	Ekstrakcija celokupne RNK iz mononuklearnih ćelija periferne krvi.....	38
3.2.13	Ekstrakcija ukupne RNK iz tkiva karotidnog plaka	41
3.2.14	Merenje koncentracije i provera kvaliteta ekstrahovanih RNK	41
3.2.15	Tretman uzoraka RNK dezoksiribonukleazom I (DNKazaI)	41
3.2.16	Reverzna transkripcija (RT) uzoraka RNK, nakon tretmana DNKazom I	42
3.2.17	Određivanje nivoa iRNK gena <i>CDKN2B</i> , <i>HACD4</i> i <i>FOCAD</i> metodom kvantitativnog PCR u realnom vremenu (eng. <i>real-time</i> <i>PCR</i>)	43
3.3	Statistička analiza rezultata	45
4	REZULTATI.....	47

4.1	Genotipizacija varijanti rs10757278 i rs518394 u genu <i>ANRIL</i> , rs2275888 i rs36212560 u genu <i>HACD4</i>	47
4.2	Asocijacija genetičkih varijanti sa kliničkim i biohemijskim faktorima rizika za nastanak ateroskleroze	50
4.3	Asocijacija analiziranih genetičkih varijanti sa nastankom karotidnog plaka	50
4.3.1	Asocijacija haplotipova varijanti rs36212560 i rs2275888 u genu <i>HACD4</i> sa nastankom karotidnog plaka	56
4.4	Asocijacija genetičkih varijanti sa kliničkim komplikacijama karotidne aterosklerotske bolesti	58
4.4.1	Asocijacija varijanti u genima <i>ANRIL</i> i <i>HACD4</i> sa fenotipom karotidnog plaka (ehogeni i eholucentni).....	58
4.4.2	Asocijacija analiziranih genetičkih varijanti sa simptomatskom karotidnom bolešću	59
4.4.3	Asocijacija analiziranih genetičkih varijanti sa rizikom za nastanak ulceracije karotidnog plaka	61
4.5	Asocijacija analiziranih genetičkih varijanti sa nastankom infarkta miokarda.....	62
4.5.1	Asocijacija haplotipova varijanti rs36212560 i rs2275888 u genu <i>HACD4</i> sa nastankom infarkta miokarda.....	67
4.5.2	Asocijacija analiziranih genetičkih varijanti sa brojem obolelih koronarnih arterija kod bolesnika sa infarktom miokarda	69
4.6	Rezultati određivanja relativne ekspresije ispitivanih gena na nivou iRNK u tkivu karotidnog plaka.....	71
4.6.1	Rezultati ispitivanja asocijacije nivoa ekspresije analiziranih gena u odnosu na genotipove varijanti u tkivu karotidnog plaka	71
4.6.2	Relativna ekspresija iRNK ispitivanih gena u odnosu na fenotip karotidnog plaka	74
4.7	Rezultati određivanja ekspresije ispitivanih gena na nivou iRNK u mononuklearnim ćelijama periferne krvi	75
4.7.1	Relativna ekspresija ispitivanih gena na nivou iRNK u MĆPK kod kontrola i bolesnika sa infarktom miokarda, 6 meseci nakon akutnog događaja	75

4.7.2	Rezultati ispitivanja asocijacije nivoa ekspresije analiziranih gena u odnosu na genotipove varijanti kod bolesnika sa IM.....	76
5	DISKUSIJA.....	79
6	ZAKLJUČCI.....	96
7	LITERATURA.....	98
8	PRILOZI.....	131

SKRAĆENICE

AHA	eng. <i>American Heart Association</i> , AHA
BMI	indeks telesne mase (eng. <i>Body Mass Index</i> , BMI)
CABG	aortokoronarni bajpas (eng. <i>Coronary Artery Bypass Grafting</i> , CABG)
CI	interval poverenja (eng. <i>Confidence Interval</i> , CI)
CRP-C	C-reaktivni protein
Ct	eng. <i>Threshold cycle</i>
CDK	ciklin-zavisna kinaza (eng. <i>Cyclin-Dependent Kinase</i> , CDK)
CDKI	Inhibitor ciklin-zavisnih kinaza (eng. <i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor</i>)
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
EKG	Elektrokardiogram
ECST	eng. <i>European Carotid Surgery Trialists</i>
FC	nivo promene (eng. <i>Fold Change</i> , FC)
GWAS	Studija asocijacije na celokupnom genomu (eng. <i>Genome Wide Association Study</i> , GWAS)
GMC	Glatke Mišićne Čelije
HDL	lipoproteini visoke gustine (eng. <i>High Density Lipoproteins</i> , HDL)
HOBP	Hronična Opstruktivna Bolest Pluća
HR	Hromozomski Region
IFN-β	interferon β
IM	Infarkt Miokarda
IMT	zadebljanje sloja intima-medije (eng. <i>Intima-Media Thickness</i> , IMT)
iRNK	informaciona RNK
KAB	Koronarna Arterijska Bolest

Kb	Kilo-baza
KB	Karotidna Bolest
KBS	Koronarna Bolest Srca
KVB	Kardiovaskularne Bolesti
KP	Karotidni Plak
KS	Koronarni krvni Sud
LD	neslučajna asocijacija genetičkih varijanti (eng. <i>Linkage Disequilibrium</i> , LD)
LDL	lipoproteini niske gustine (eng. <i>Low Density Lipoprotein</i> , LDL)
Lp(a)	Lipoprotein a
LPS	Lipopolisaharid
MĆPK	Mononuklearne Čelije Periferne Krvi
MKVDL	Masne Kiseline Veoma Dugog Lanca
NAP	Nestabilni Aterosklerotski Plak
NASCET	eng. <i>North American Symptomatic Carotide Endarterectomy Trial</i>
PAA	Poliakrilamid
PCI	perkutana koronarna intervencija (eng. <i>Percutaneous Coronary Intervention</i> , PCI)
PCR	lančana reakcija polimeraze (eng. <i>Polymerase Chain Reaction</i> , PCR)
PRC	eng. Polycomb Repression Complex
RNK	Ribonukleinska Kiselina
SAP	Stabilni Aterosklerotski plak
Tg	Trigliceridi
TIA	Tranzitorni Ishemijski Napad (eng. <i>Transient Ischaemic Attack</i> , TIA)
TF	Tkivni Faktor
3'UTR	3'-netranslatirajući region gena (eng. <i>3' Untranslated Region</i> , 3' UTR)
VĆM	Vanćelijski Matriks

1 UVOD

1.1 Ateroskleroza i kardiovaskularne bolesti

Kardiovaskularne bolesti (KVB) podrazumevaju široku grupu poremećaja srca i krvnih sudova koji uključuju perifernu arterijsku bolest, reumatičnu bolest srca, kongenitalne bolesti srca, duboku vensku trombozu, plućnu emboliju, kao i najvažnije po posledicama za ljudsko zdravlje i život, koronarnu bolest srca (KBS) i karotidnu bolest (KB) koje predstavljaju vodeći uzrok smrtnosti u svetu. Prema podacima svetske zdravstvene organizacije više od trećine smrti nastaju kao posledica KVB (WHO 2016). Pored toga, KVB predstavljaju vodeći uzrok invaliditeta (Perk i sar., 2012).

U osnovi KBS i KB nalazi se ateroskleroza koja dovodi do suženje koronarnih odnosno karotidnih arterija usled čega dolazi do ishemije, koja u slučajevima velikog suženja ili potpune okluzije krvnog suda dovodi do infarkta miokarda (IM) odnosno moždanog udara (Lusis i sar., 2000). To su ujedno i najozbiljnije kliničke manifestacije sa najvećim uticajem na zdravlje i ljudski život.

Patolog Felix Markand je 1904. godine predložio termin “ateroskleroza”, što potiče od reči “atero”, što znači kaša u i “skleroza” što znači očvršćavanje, čime je opisao kašu masti unutar očvrsnule arterije (Mehta i sar., 2002). Ateroskleroza je sistemska, kompleksna, multifaktorijska, hronična, inflamatorna bolest zida srednjih i velikih arterijskih krvnih sudova (Hansson i sar., 2005). Karakteriše se akumulacijom lipida i makrofaga/limfocita unutar intime srednjih i velikih arterija što vodi formiranju aterosklerotskog plaka. Najčešće se javlja na mestima grananja ili zakrivljenja krvnih sudova gde dolazi do narušavanja normalnog laminarnog protoka krvi. Uticaj laminarnog protoka, takozvani smicajući stres (eng. *sheer stress*) deluje potektivno na endotelijum (Cunningham i Gotlieb 2005; Gimbrone i sar., 2000). Smatra se da proces aterogeneze započinje kombinacijom kvalitativnih promena na endotelnim ćelijama krvnog suda i zadržavanjem lipoproteina (LP), prevashodno apolipo-proteina B (apoB) i lipoproteina niske gustine (LDL), u subendotelnom sloju (Sitia i sar., 2010; Tabas i sar., 2015).

1.1.1 Nastanak i progresija ateroskleroze

Aterosklerotski process dovodi do zadebljanja zida koje zalazi u lumen arterije kompromitujući krvni tok i dovodeći do ishemijskih događaja distalno od mesta lezije (Libby P. 2002, Badimon i sar., 2012). Ateroskleroza prati poremećaj metabolizma lipida, endotelna disfunkcija, inflamacija, oksidativni stres, aktivacija vaskularnih glatkih mišićnih ćelija (VGMĆ), izmenjen metabolizam vanćelijskog matriksa, remodelovanje i tromboza. Svi navedeni procesi su kontrolisani mnogobrojnim faktorima od kojih je jedan i genetička komponenta (Libby P., 2002).

Inicijalni korak u procesu ateroskleroze predstavlja disfunkcija endotela. Endotelni sloj ima ulogu u održavanju homeostaze reagujući na humoralne i mehaničke stimulse. Promene fenotipa i nastanak disfunkcionalnog stanja predstavljaju rizik za nastanak ateroskleroze, ali i drugih vaskularnih bolesti (Tabas i sar., 2015). Uobičajeni KV faktori rizika (dislipidemija, arterijska hipertenzija, hiperglicemija i dijabetes) su takođe asocirani sa endotelnom disfunkcijom. Na oštećenje endotela mogu uticati i oksidovani-LDL (Valente i sar., 2014), renin-angiotenzin sistem (Wassmann i sar., 2002) i insulinska neosetljivost (Muniyappa i sar., 2013; Sitia i sar., 2010).

Disfunkcionalni endotel menja propustljivost i postaje proinflamatoran. Arterijske endotelne ćelije, koje u fiziološkim uslovima onemogućavaju vezivanje belih krvnih ćelija ekspimiraju adhezione molekule kojima “kače” leukocite na svojoj površini dozvoljavajući mononuklearnim leukocitima, kao što su monociti i T-ćelije, da se “zakače” za endotelijum i probiju u intimu. Iako nisu uobičajeni kao prethodno pomenute, dendritske ćelije, mastociti, neutrofil i B ćelije takođe mogu biti prisutni u lezijama (Tabas i sar., 2015).

Promena u endotelnoj provodljivosti i sadržaju vanćelijskog matriksa ispod endotelijuma omogućavaju prolazak i zadržavanje apolipo-proteina B (apoB) i lipoproteina niske gustine (LDL) u arterijskom zidu. Njihovo zadržavanje stimuliše ulazak monocita, njihovu diferencijaciju u makrofage koji apsorbuju lipide i transformišu se u penaste ćelije (Tabas i sar., 2015). Najraniji vidljivi znak ateroskleroze su masne pruge, koje nastaju usled akumulacije lipidima bogatih penastih ćelija unutar intimalnog sloja arterije (Crowther i sar., 2005).

Još jedan ćelijski tip koji je prisutan u lezijama su glatke mišićne ćelije (GMĆ), koje pod uticajem akumulacije LP, aktivacije endotela i inflamacije proliferišu, migriraju u sloj intime iz sloja medije i menjaju fenotip u sintetičke GMĆ. Kao posledica toga, povećavaju produkciju vanćelijskog matriksa i drugih proteina značajnih za remodelovanje, progresiju i stabilnost plaka (Alexander i Owens., 2012). Na taj način utiču na patofiziologiju aterosklerotskog plaka. Aterosklerotski plakovi se mogu podeliti na stabilne i nestabilne. Stabilni plakovi su obično asimptomatski sa debelom fibroznom kapom od kolagenom bogatog vanćelijskog matriksa (sintetisan od strane GMĆ). Fibrozna kapa stabilizuje plak i odvaja unutrašnjost od lumena krvnog suda. Nestabilni plakovi su bogati penastim ćelijama, vanćelijski matriks sadrži manje količine kolagena što plak čini nestabilnim i sklonim rupturi (Finn i sar., 2010).

Ateroskleroza se smatra inflamatornom bolešću. Imuno-kompetentne ćelije nalaze se u aterosklerotskim lezijama i učestvuju u produkciji proinflamatornih citokina (Frostegard i sar., 1999). Iako u aterosklerotska stenoza i okluzija krvnog suda putem smanjenja protoka krvi mogu indukovati KVB, aterotromboza je najčešći mehanizam nastanka akutnih događaja (pre svega IM i moždanog udara). Nastaje onda kada je fibrozna kapa na površini plaka oštećena usled delovanja proinflamatornih citokina i hemokina. Kada su plakovi oštećeni i ruptuirani, protrombotski materijal je izložen koagulacionom sistemu koji se aktivira i dovodi do formiranja tromba na mestu lezije zaustavljajući krvni tok (Lippi i sar., 2011).

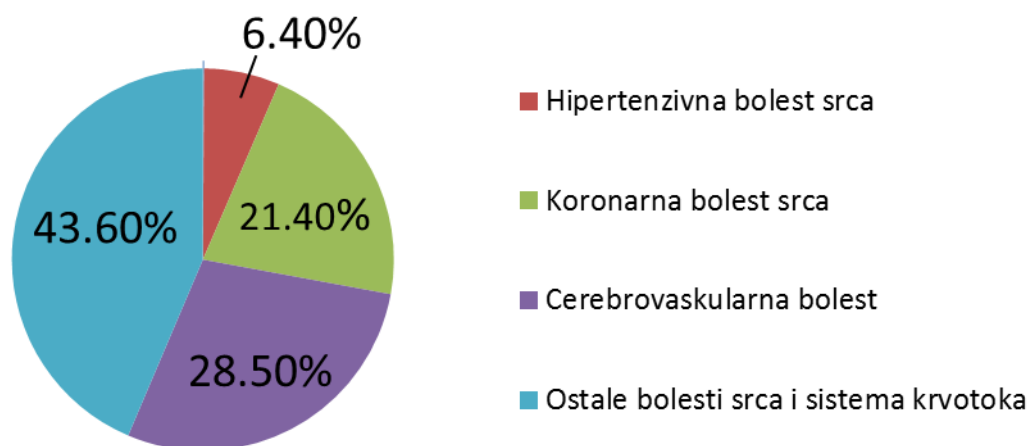
1.1.2 Epidemiologija ishemijskog moždanog udara i infarkta miokarda

Koronarna bolest srca (KBS) i ishemijski moždani udar predstavljaju prvi, odnosno treći uzrok smrtnosti u svetu. Po najnovijim podacima svetske zdravstvene organizacije, 31% svih smrtnih ishoda u svetu uzrokovano je KVB, od čega se 85% pripisuje upravo infarktu miokarda i moždanom udaru (https://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/).

Od sredine dvadesetog veka, prevalenca smrtnih ishoda u srednjem životnom dobu (35 - 69 godina) usled KVB se u razvijenim zemljama značajno smanjila. Tako je na primer u Ujedinjenom Kraljevstvu 1950-tih godina broj umrlih muškaraca na 100000 iznosio oko 700, dok je 2010-te taj broj ispod 200. U istom periodu, smrtnost među

ženama je smanjena sa približno 450 na manje od 100 (Herrington i sar., 2016.). Uprkos smanjenju incidence i smrtnosti u odnosu na godine starosti, globalno se broj umrlih od KVB povećao. Povećanje je posledica povećane starosti populacije ljudi, odnosno prosečne životne dobi, ali i povećanja broja ljudi u populacijama (Roth i sar., 2015). Proteklih nekoliko decenija značajno povećanje prevalencije kardiovaskularnih i drugih nezaraznih bolesti je zabeleženo u nerazvijenim i zemljama u razvoju (Moran i sar., 2014). Ove epidemiološke promene su svakako pod uticajem ishrane i životnog stila (Astrup i sar., 2008; Popkin i sar., 2001; Roth i sar., 2015) i razlikuju se u različitim zemljama (Astrup i sar., 2008). Svakako da je genetička struktura populacije bitan faktor koji utiče na predispoziciju za nastanak bolesti (Zanetti i sar., 2015; Hellwege i sar., 2017). Na žalost u Srbiji detaljna epidemiološka studija koja bi ispitala prevalenciju/incidenciju kardiovaskularnih bolesti nije sprovedena posle 2010. godine, što je potrebno da bi se na adekvatan način pratio trend opadanja ili rasta stope oboljevanja. Prema studiji Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut”, sprovedenoj 2010. godine, kardiovaskularne bolesti predstavljaju vodeći uzrok smrtnosti u Republici Srbiji sa 54,7%. Broj novo obolelih od infarkta miokarda 2010. godine iznosio je 11063 muškarca i 6794 žena. Broj umrlih od infarkta miokarda iznosio je 3801 muškaraca i 2526 žena. Procenat umrlih od različitih tipova kardiovaskularnih bolesti prikazan je na slici 1. (Izvor: Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“)

Srbije 2013. godine iznosila je 2,0% (1,9% za muškarce i 2,1% za žene). Broj umrlih od moždanog udara u Srbiji je 2016-te godine iznosio 160,8 na 100.000 stanovnika, odnosno 145,9 na 100.000 muškaraca i 174,9 na 100.000 žena (Izvor: Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“, informacije dobijene na zahtev po Zakonu o slobodnom pristupu informacijama).



Slika 1. Procenat smrtnosti usled kardiovaskularnih bolesti u populaciji Srbije. Rezultati istraživanja objavljeni su 2010. godine od strane Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“, (<http://www.batut.org.rs>).

Ishemijski moždani udar i infarkt miokarda dele patološke mehanizme i faktore rizika (Pasternak i sar., 2004, Adams i sar., 2003). Najveći rizik za razvoj ateroskleroze kardiovaskularnih bolesti predstavljaju hipertenzija, dijabetes i dislipidemija. Faktori rizika ne deluju podjednako intenzitetom na aterosklerozu u različitim arterijskim sistemima. Tako je pokazano da je holesterol naročito značajan za KBS, dok hipertenzija ima izraženiji uticaj na ishemijski šlog (Kannel i sa., 1994, Kannel i sar., 2006). Bez obzira što je svaki od pomenutih faktora delom pod genetičkom kontrolom, porodična istorija predstavlja nezavisan faktor rizika. Procenjuje se da je doprinos nasleđa nastanku KBS 40-50% (Peden i sar., 2011; Roberts R., 2012). Genetičke varijante koje predstavljaju varijacije pojedinačnih nukleotida u genomu takođe doprinose genetičkom riziku za nastanak bolesti, što je pokazano kako u studijama na genima kandidatima (Hegele i sar., 2009; Teslovich i sar., 2010) tako i u GWAS (The Wellcome Trust 2007, Helgadottir i sar., 2007, McPherson i sar., 2007, Samani i sar., 2007, Verweij i sar., 2017).

Značajni faktori rizika su starost i pol (Jousilahti i sar., 1999; Appelman i sar., 2015). Prevalenca koronarne i karotidne bolesti povećava se sa godinama i češće se javlja kod muškaraca nego kod žena (Yin i sar., 2012). Kod žena se IM javlja kasnije u

odnosu na muškarce (u proseku 10 godina kasnije), ali je veća stopa smrtnosti (Hanratty i sar., 2000). Navedene razlike se gube nakon 64-te godine. Takođe, žene imaju lošiju kliničku sliku nakon šloga, što je nezavisno od starosti (Reeves i sar., 2008).

Postoji konkordantnost između karotidne i koronarne ateroskleroze. Pokazano je da 4,5% ljudi sa KBS ima KP sa stepenom stenozе >80%, a da 14,5% ima stepen stenozе >50% (Aboyans i sar., 2009). Prevalenca klinički značajne karotidne bolesti (stenozа >50%) sukcesivno raste kod bolesnika sa neobstruktivnom KBS (5,9%), jednosudovnom (6,6%), dvosudovnom (13%), trosudovnom (17,8%) i bolešću leve glavne koronarne arterije (31,3%). Takođe prevalenca uznapredovale KA (stenozа >70%) je pronađena kod 2.1% bolesnika sa neopstruktivnom KBS, 3.1% sa jednosudovnom, 3.6% sa dvosudovnom, 7% sa trosudovnom bolešću srca i 10.8% bolesnika sa aterosklerozom leve glavne koronarne arterije (Steinvil i sar., 2011).

1.2 Genetička osnova ateroskleroze

Napredak u tehnologijama koje se primenjuju u molekularnoj genetici omogućio je detektovanje i definisanje Genetičkihgenetičkih varijanti koje povećavaju rizik za nastanak ateroskleroze. Otkriven je veliki broj gena kandidata, genetičkih varijanti i lokusa asociраних sa nastankom bolesti a, taj broj i dalje raste. Genetički rizik za aterosklerozu je delom ispoljen i putem uticaja na poznate metaboličke faktore rizika kao što su hipertenzija, dislipidemija i *diabetes mellitus* (Kovačić i sar., 2012). Mnoge varijante nalaze se u nekodirajućim regionima gena i njihov značaj na ekspresiju gena još uvek nije poznat. Dosadašnja saznanja nisu dovoljna da u potpunosti objasne naslednu osnovu ateroskleroze. Ulažu se naponi u otkrivanj novih genetičkih faktora rizika ali, i razumevanje funkcionalnih mehanizama već definisanih varijanti, kao i kontekst uticaja u različitim populacijama, etničkim grupama i životnim sredinama. Osim retkih primera u kojima varijacije u pojedinačnim genima povećavaju rizik za KVB (Goldstein i sar., 2001) one su definisane kao kompleksne, multifaktorijalne i poligenske bolesti. Do 2007. godine, saznanja o riziku koje određeni geni i varijante nose sa sobom potiče od studija asocijacije na genima kandidatima, kao i genima testiranim u studijama *in vivo* i *in vitro* (Chen i sar., 2013).

Sprovođenje studija asocijacija na celokupnom genomu (eng. *Genome Wide Association Studies*, GWASs) je u proteklih deset godina dovelo do identifikacije velikog broja genetičkih varijanti asociiranih sa KVB ali i sa faktorima rizika za nastanak bolesti (gojaznost, hipertenzija, nivo LDL-a, HDL-a, triglicerida) (Peden i sar., 2011; Schunkert i sar., 2010; Tanya i sar., 2010, Weissglas-Volkov i sar., 2010; Johanson i sar., 2011; Choquet i sar., 2011; Franceschini i sar., 2011). Do sada je primenom GWAS pristupa identifikovano 56 lokusa koji imaju konsenzusom definisanu statističku značajnost ($p < 10^{-8}$), asocijacije sa KBS na celokupnom genomu, eng. "*Genome-wide*" (Nikpay i sar., 2015). Nakon prvih GWASs usledile su studije urađene na većem broju ispitanika, koje su pokazale da postoji pozitivna korelacija između broja uzoraka i broja genetičkih varijanti koje imaju "*genome-wide*" značajnost, implicirajući da sa povećanjem broja uzoraka može doći do otkrića dodatnih genetičkih varijanti sa "*genome-wide*" značajnošću. Ove genske varijante su uglavnom locirane u nekodirajućim regionima gena. Regioni u kojima se nalaze su anotirani kao regulatorni. Skoro sve varijante identifikovane pomoću GWASs uobičajene su u Evropskim populacijama (Braenne i sar., 2015). Dosta manji broj studija navedenog dizajna sproveden je u istraživanju asocijacije genetičkih markera sa karotidnom aterosklerotskom bolešću. Karotidna i koronarna ateroskleroza imaju istu etiologiju i većina varijanti koje su asociirane sa koronarnom asociirane su i sa karotidnom aterosklerozom. Ipak, postoji razlika u značajnosti asocijacije kao i precizno definisanim aterosklerotskim fenotipovima koji su u navedenim studijama izučavani (Geswendtner i sar., 2009; Helgadottir i sar., 2008).

GWASs su u velikoj meri doprinele novim saznanjima o naslednoj osnovi KVB, ali ipak ove studije imaju određena ograničenja. Iako su GWASs identifikovale veliki broj novih genetičkih varijanti, individualno ovi lokusi imaju umeren efekat na bolest, sa OR od 1,3 ili manje, čime je ograničena njihova prediktivna vrednost. Imaju nedovoljnu moć da identifikuju interakciju genotipa sa drugim faktorima rizika i ne daju odgovor o mehanizmima koji doprinose nastanku bolesti (Visscher i sar., 2017).

1.2.1 Hromozomski region 9p21

U četiri nezavisne GWAS, čiji su rezultati objavljeni 2007. godine, detektovana je asocijacija genetičkih varijanti hromozomskog regiona 9p21 sa povišenim rizikom za razvoj KBS i IM (The Wellcome Trust 2007; Helgadóttir i sar., 2007; McPherson i sar., 2007, Samani i sar., 2007). Iako se do 2007. godine smatralo da ovaj region uopšte ne poseduje kodirajuće sekvence, u nezavisnoj studiji je ustanovljeno da se na ovom mestu nalazi gen za dugu nekodirajuću RNK, označen kao duga nekodirajuća DNK u lokusu INK/ARF, (eng. *long non-coding DNA in INK/ARF locus*, ANRIL)(Pasmant i sar., 2007). Činjenica da ove varijante nisu ranije detektovane, kao i da se ne zna njihov funkcionalni značaja. Uglavnom se nalaze u regionima genoma u kome se ne nalaze geni za proteine i koji su označeni kao genske pustinje. S obzirom da se ne nalaze u sekvencama egzona verovatno je da imaju ulogu u regulaciji ekspresije gena. Deset godina nakon otkrića se ne može sa sigurnošću reći koji je molekularni mehanizam u osnovi asocijacije ovih varijanti sa ispitanim fenotipovima, a poznato je da ne deluju preko uobičajenih faktora rizika za KVB (McPherson i sar., 2007).

Nakon prvobitnih GWASs u različitim Evropskim populacijama, usledile su GWASs u populacijama različitog etničkog porekla u kojima je dokazano da su genetičke varijante u regionu 9p21 faktor rizika za KBS u populacijama Kine (Ding i sar., 2009) i Koreje (Shen i sar., 2008). Asocijacija je potvrđena i u Japanskoj (Hinohara i sar., 2008) i populaciji južne Azije (Ding i sar., 2009, Assimens i sar 2008) ali ne u populaciji Afričkih Amerikanaca (Shen i sar., 2008). Smatra se da je razlog duži vremenski period u toku koga je kod Afričke populacije došlo do razdvajanja 9p21 haplotipskog bloka na manje haplotipske blokove koji ne utiču na rizik za KVB (Assimens i sar., 2008).

Genske varijante HR 9p21, koje su najznačajnije za nastanak KVB, raspoređene u okviru dva haplotipska bloka prikazane su na slici 2. Iako su različite varijante identifikovane u asocijaciji sa KVB, varijante regiona 9p21 nalaze se u značajnoj neravnoteži vezanosti (eng. Linkage Disequilibrium, LD) zbog toga se ovaj region često i označava kao lokus 9p21. Istraživanja sprovedena nakon prvih GWAS su pokazala da je najznačajnija asocijacija spregnuta sa varijantama u okviru 58 kb dugog regiona (Broadbent i sar., 2008). U većini studija, vodeće genske varijante (rs10757278,

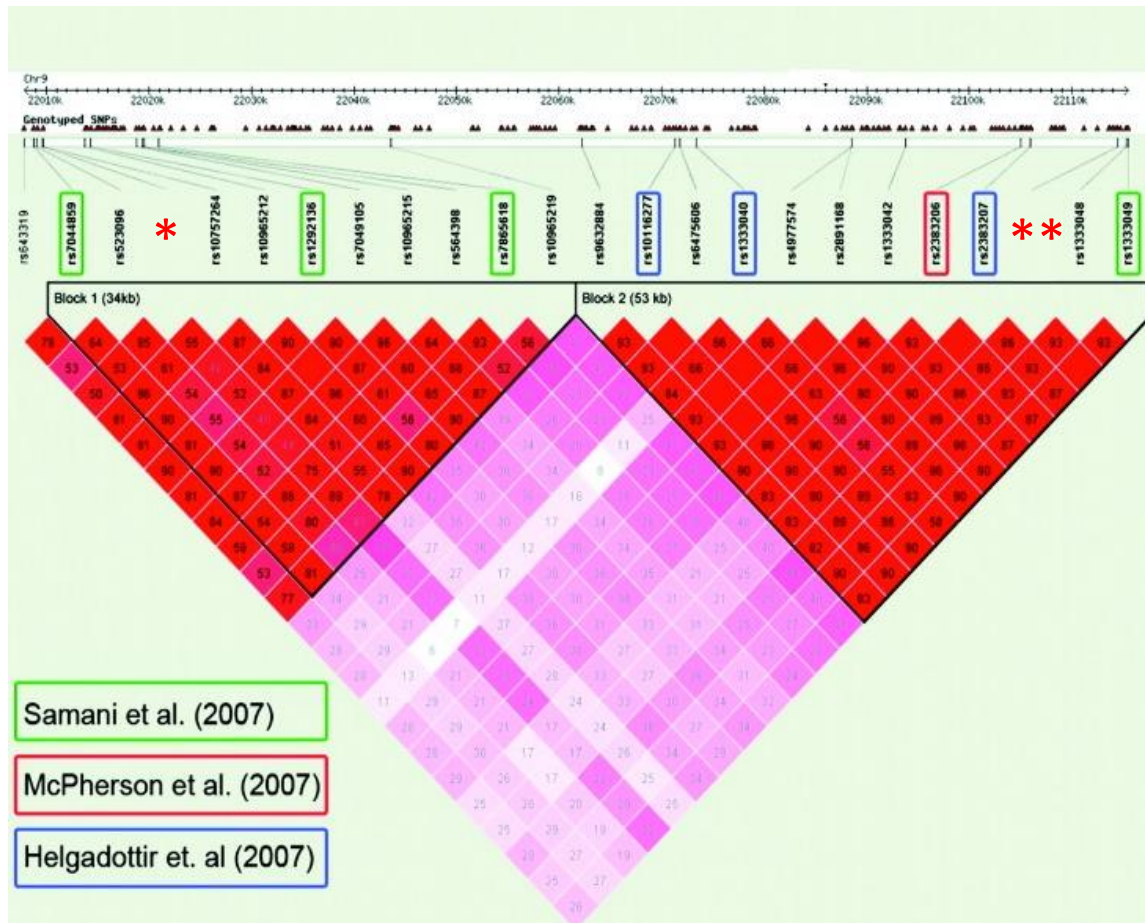
rs10757274, rs2383207, rs1333045, rs1333049 i druge) nalaze se u jakoj neravnoteži vezanosti. Pri tom se rs10757278 i rs1333049 nalaze u izrazito jakoj neravnoteži vezanosti koja u većini studija iznosi $r^2 > 0,95$ i gotovo zajedno se nasleđuju, zbog čega se istraživači opredeljuju za ispitivanje jedne od njih (Chen i sar., 2013).

1.2.2 Asocijacija hromozomskog regiona 9p21 sa nastankom bolesti

Do sada najsvieobuhvatnija GWAS meta-analiza urađena je od strane CARDIoGRAMplusC4D konzorcijuma i uključuje preko 190 hiljada individua (637746 bolesnika sa KBS i 130681 kontrola). Detektovano je 46 lokusa i van njih još 104 genetičkih varijanti koje imaju „Genome-Wide“ značajnu asocijaciju ($p \leq 10^{-8}$) sa rizikom za razvoj KBS (CARDIoGRAMplusC4D consortium 2013). Ono što se može uočiti iz dobijenih rezultata je da čak i lokusi sa najsnažnijom asocijacijom (kao što su 9p21 ili SLC22A3-LPAL2-LPA) povećavaju rizik za 21% do 37% dok većina lokusa moduliše rizik za 10% ili manje (The CARDIoGRAMplusC4D Consortium 2013). Izuzimajući gene koji su asociirani sa fenotipovima koji nose rizik (krvni pritisak, lipidi...), za većinu varijanti se ne zna tačan mehanizam kojim deluju na aterosklerozu ili povezane kliničke fenotipove (The CARDIoGRAMplusC4D Consortium 2013).

Zbog neravnoteže vezanosti u kojoj se nalaze varijante HR 9p21, teško je reći koje tačno povećavaju rizik a koje su samo detektovane zbog neravnoteže vezanosti sa uzročnim genskim varijantama. Asociiranost varijanti sa koronarnom bolešću srca višestruko je potvrđena u različitim studijama slučajeva i kontrola (Talmud i sar., 2008; Ye i sar., 2008; Ding i sar., 2009; Hinohara i sar., 2008; Schunkert i sar., 2008; Lusk i sar., 2014).

Iako su varijante HR 9p21 reproducibilno asociirane sa KBS, nije tako pokazano u svim studijama (Dehghan i sar., 2016; Yang i sar., 2018). U radu Dehghan i saradnika iz 2016.godine, rs1333049 pokazao je samo statistički trend u asocijaciji sa KBS. Autori su objavili i da je ista varijanta pokazala protektivan efekat kada je u pitanju smrtnost kod osoba prospektivno praćenih nakon prvog IM. Alel C rs1333049 (alel koji nosi rizik) je asociiran sa dužim preživljavanjem nakon prvog IM (Dehghan i sar., 2016).



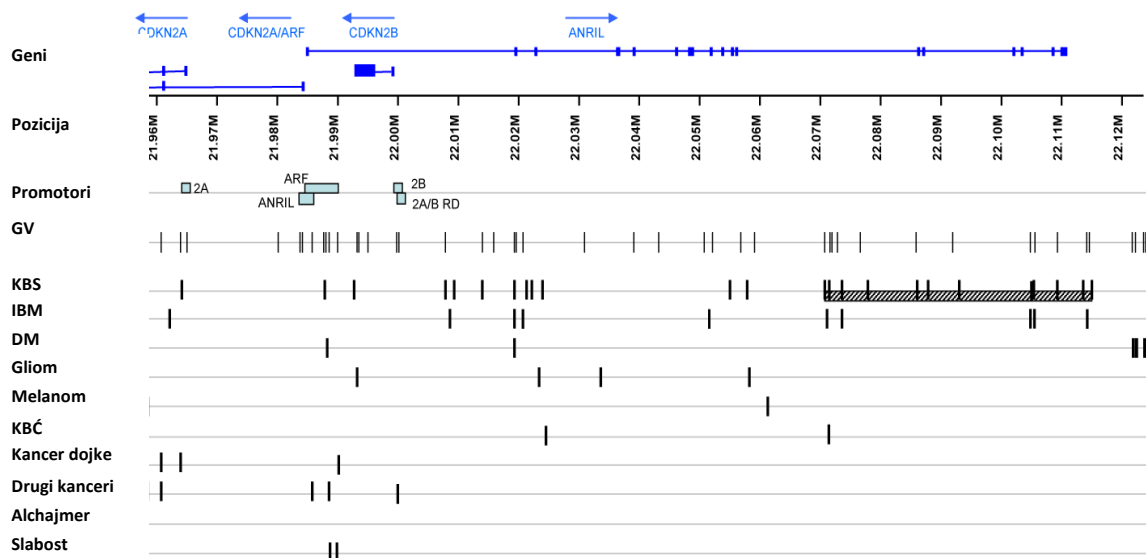
Slika 2. Vodeće genetičke varijante asociirane sa KBS identifikovane u prvim GWASs. Na skali koja označava bazne parove hromozoma prikazane su najznačajnije genetičke varijante, detektovane u pomenutim studijama. Boja kojom su uokvirene genetičke varijante označava GWAS studiju u okviru koje su detektovne. Crvene zvezdice označavaju genetičke varijante ispitane u okviru ove doktorske disertacije. *rs518394; **rs10757278; Slika preuzeta i adaptirana iz Schunkert H i sar., 2008.

Detektovana je asocijacija sa rizikom za nastanak ishemijskog moždanog udara (Dichgans i sar., 2014; Ding i sar., 2009; Geschwendtner i sar., 2009; Matarin i sar., 2008) ali rezultati nisu konzistentni i u nekim studijama slučajeva i kontrola izostaje (Lemmens i sar., 2009; Plant i sar., 2011). U meta-analizi koje je uključila 21 studiju (34 hiljada slučajeva i 150 hiljada kontrola) iz različitih populacija i etničkih grupa, pokazano je da je genetička varijanta rs10757278 i njoj pridružene (varijante u značajnom LD) uz OR od 1,1 značajno asociirana sa ishemijskim moždanim udarom, ali

da postoji variranje u asocijaciji među različitim populacijama. Takođe, asocijacija se pokazala značajnom samo kada je u pitanju moždani udar nastao usled okluzije velikih krvnih sudova, dok asocijacija nije bila značajna u slučaju malih sudova ili kardioembolijskog moždanog udara (Xiaoqing i sar., 2014).

Pored toga, ustanovljena je asocijacija varijanti HR 9p21 sa razvojem karotidnog plaka (Zhang i sar., 2013). Uticaj varijanti HR 9p21 na zadebljanje karotidne intime-medije (koje je prihvaćeno kao rani vaskularni marker za nastanak karotidne ateroskleroze) je značajno slabiji ili izostaje (Shamani i sar., 2008; Zhang i sar., 2013). Varijante HR 9p21 takodje nose rizik za razvoj vaskularnih patologija kao što su abdominalna (Bjorck i sar., 2009; Bown i sar., 2008; Helgadottir i sar., 2008; Thompson i sar., 2009) i kranijalna aneurizma (Yasuno i sar., 2010; Foroud i sar., 2012), aterotrombotski i hemoragijski šlog (Zhang i sar., 2012) kao i periferna opstruktivna bolest (indeks brahijalnog pritiska) (Murabito i sar., 2012).

Na slici 3. predstavljena je pozicija najznačajnijih genetičkih varijanti u HR 9p21 asociраних sa rizikom za nastanak različitih oboljenja. Postoji asocijacija i sa patologijama koje nisu uzročno/posledično povezane sa kardiovaskularnim sistemom, kao što su: bipolarni poremećaj (Cassidy i sar. 2007), glioblastom (Rajaraman i sar., 2012), melanom (Hayward i sar., 2003) i različiti tipovi karcinoma: skvamoznih ćelija ezofagusa, renalnih ćelija, bešike, stomaka (Wen-Qing i sar., 2014). Poznato je i da delecija ovog regiona dovodi do nastanka malignog melanoma (Hayward i sar., 2003). Alchajmerova bolest i vaskularna demencija su takođe bolesti za koje varijante HR 9p21 regiona nose određeni rizik (Emanuele i sar., 2011).



Slika 3. Pozicija genetičkih varijanti i gena asociраних са rizikom за n bolesti u hromozomskom regionu 9p21. Region koji nosi najveći rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti je zasеnчен. Plavom bojom su označeni geni i smer njihove transkripcije. Na skali je prikazana pozicija gena i Genetičkihgenetičkih varijanti na hromozomu. GV genska varijanta; KBS Koronarna Bolest Srca; IBM Ishemijska Bolest Srca; DM *Diabetes Mellitus*; KBĆ karcinom ćelija bazalne membrane. (Slika preuzeta iz Cunnington i saradnici 2010)

1.2.3 Značaj hromozomskog regiona 9p21 za nastanak bolesti (efekat na fenotipske karakteristike)

Iako je još 2007. godine prvi put detektovan značaj HR 9p21 još uvek se ne može sa sigurnošću reći kojim molekularnim mehanizmom utiče na razvoj bolesti. Zna se da je efekat varijanti na razvoj KVB nezavisan od uobičajenih faktora rizika (McPheres i sar., 2007) i sa velikom sigurnošću može reći jeste da je efekat plejotropan. Neki od predloženih mehanizama su: uticaj na homeostazu endotelnih ćelija u reakciji na inflamaciju (Harismendi i sar., 2011), poremećaj u sposobnosti reparacije ćelija (Broadbent i sar., 2008) ili abnormalna deoba i diferencijacija vaskularnih glatkih mišićnih ćelija (Congrains i sar., 2010). Varijante koje nose značajan rizik za razvoj KVB u populaciji Evropljana i Amerikanaca evropskog porekla i Azijata nemaju nikakav uticaj u afričkim populacijama (McPherson i sar., 2007; Assimens i sar., 2008; Franceschini i sar., 2011). Činjenica da iste varijante utiču na pojavu intrakranijalne i

abdominalne aneurizme sugerirše da je efekat varijanti kompleksan i da utiče na procese koji se odvijaju u zidu krvnih sudova (Helgadottir i sar., 2008). Sa druge strane, određene varijante utiču na reaktivnost krvnih pločica koje dovode do formiranja tromba (Masunuru i sar., 2010). Unutar HR 9p21 identifikovan je haplotipski blok koji ne utiče na razvoj KBS ali kod bolesnika sa predijagnostikovanom karotidnom aterosklerozom dovodi do nastanka infarkta miokarda. Šta više, ovaj haplotip se pokazao protektivnim za razvoj KBS (Broadbent i sar., 2008; Fan i sar., 2013). Vodeća varijanta ovog bloka rs518394 bi mogla uticati na reaktivnost krvnih pločica, što bi objašnjavalo povećanje rizika za akutni događaj kakav je IM, koji najčešće nastaje usled tromboze (Masunuru i sar., 2010). Krvne pločice imaju bitnu ulogu u popravci vaskularnih oštećenja ali takođe i u patološkom stanju prilikom rupture plaka, kada dovode do formiranja tromba i okluzije krvnih sudova (del Zoppo i sar., 1998). Varijanta rs10965219 koja je pokazala najznačajniju asocijaciju u studiji Masunuru K i sar. (Masunuru i sar., 2010), a koja je u istom haplotipskom bloku sa rs518394, asociirana je i sa koronarnom aterosklerotskom i kalcifikacijom, fenotipskom osobinom koja karakteriše aterosklerotski plak (Pechlivanis i sar., 2013).

1.2.4 Promene u nivoima ekspresijegena hromozomskog regiona 9p21 i njihov značaj u molekularnim mehanizimam nastanka bolesti

Pokazano je da varijante HR 9p21 utiču na proces ekspresije gena, tj. da imaju ulogu eQTL-a (eng. expression Quantitative Trait Locus, eQTL). Hromozomski region 9p21 je bogat pojačivačima (Jarínova i sar., 2009; Harismendi i sar., 2011) koji mogu uticati na ekspresiju gena u HR 9p21 ali i izvan njega i koji bi mogli imati specifičnu aktivnost u određenom tkivu ili stanju (bolesti). Aleli koji nose rizik za KVB su asociirani sa nivoima ekspresije gena kod individua koje boluju od KVB i metaboličkih komplikacija (Holdt i sar., 2011, Congrains i sar., 2012, Jarínova i sar., 2009; Stone i sar., 1995; Yan i sar., 2009; Folkersen i sar., 2009; Holdt i sar., 2010; Cunnington i sar., 2010; Almontashiri i sar., 2013; Pilbow i sar., 2012; Motterle i sar., 2012.).

Varijante koje su najznačajnije asociirane sa razvojem KVB bolesti nalaze se u okviru segmenta od 58 Kb, udaljene su oko 120 Kb od najbližih gena koji kodiraju proteine (*CDKN2A* i *CDKN2B*) u genu za ANRIL (eng. long noncoding RNA in

INK4/ARF locus). Proteinski produkti, p16INK4a i p14ARF kodirani od strane CDKN2A i p15INK4b kodiran od strane CDKN2B pronađeni su u aterosklerotskim plakovima i arterijama bez ateroskleroze (Hold i sar., 2011). Geni *CDKN2A*, *CDKN2B*, *MTAP* i *ANRIL* predstavljaju prvi izbor gena HR 9p21, za ispitivanje njihove moguće uloge u patofiziološkim mehanizmima odgovornih za razvoj bolesti. *CDKN2A* i *CDKN2B* su proto-onkogeni sa poznatom ulogom u regulaciji ćelijske proliferacije, apoptoze, mirovanja i starenja (Matheu i sar., 2009; Cánepa i sar., 2007). Delecija i inaktivacija MTAP prisutna je u procesima neoplastične transformacije (Schmid i sar., 1998; Schölmerich i sar., 2006). Duga nekodirajuća RNK ANRIL interaguje sa "Polycomb" proteinskim kompleksima i ima ulogu u procesima utišavanja ekspresije gena putem epigenetičkih mehanizama (Kotake i sar., 2011). U više studija je pokazana korelacija u ekspresiji između gena za *ANRIL* i gena *CDKN2A* i *CDKN2B* (Cunnington i sar., 2010; Hold i sar., 2010; Congrains i sar., 2011). Iako je detektovana asocijacija Genetičkihgenetičkih genetičkih varijanti sa nivoom ekspresije gena INK/ARF lokusa (Yan i sar., 2009) u nekim studijama je istaknuta izraženija asocijacija sa nivoom ekspresije ANRIL-a (Congrains A. 2012; Hold LM 2010; Cunnington MS 2010). Tačna funkcija ANRIL-a nije poznata. Zna se da reaguje sa polikomb represorskim kompleksima 1 i 2 (eng. *Polycomb Repression Complex*, PRC) koji utiču na epigenetičko utišavanje lokusa *CDKN2A/B* (Yap i sar., 2010; Kotake i sar., 2011). S obzirom da se varijante najznačajnije za razvoj KVB nalaze u intronu i 3' netranslirajućem kraju gena *ANRIL* jedna od hipoteza je da utiču na regulaciju ekspresije ANRIL-a i da nemaju direktan uticaj na *CDKN2A/B* ekspresiju (Congrains i sar., 2012; Hold i sar., 2010, Yap i sar., 2010).

Regulacija ćelijskog ciklusa bi mogao biti važan mehanizam u progresiji ateroskleroze (Braun-Dullaes i sar., 1998), čemu bi doprineli inhibitori ćelijskog ciklusa delovanjem na proliferaciju makrofaga. Segment humanog lokusa 9p21 dužine 58 kb ima svoj ortolog kod miševa dužine 70 kb na hromozomu 4. Miševi sa homozigotnom delecijom ovog segmenta ($\text{Chr4}^{\Delta 70\text{kb}/\Delta 70\text{kb}}$) imaju značajno sniženu srčanu ekspresiju *Cdkn2a* i *Cdkn2b* (Visel i sar., 2010). Isti autori su pokazali da primarna kultura $\text{Chr4}^{\Delta 70\text{kb}/\Delta 70\text{kb}}$ glatkih mišićnih ćelija aorte pokazuje povećanu proliferaciju i smanjeno mirovanje (eng. "*senescence*"), što je fenotip karakterističan za KBS. Kuo i saradnici su sproveli analizu na mikromatrici (eng. "*microarray*") u

perifernim makrofagima i u CD11b⁺ monocitnoj/makrofagnoj populaciji kod miševa sa delecijom na hromozomu 4 i divljeg soja. Kod životinja sa delecijom, koje pokazuju ubrzan process ateroskleroze uz povećanu proliferaciju monocita/makrofaga je detektovana značajno snižena ekspresija Cdkn2a, Jun, Tusc 1, Mtap, Hacd4 ali ne i Cdkn2b (Kuo i sar., 2011). Model transgenih miševa sa izbačenom funkcijom (“knock out”) govori u prilog značaju CDKN2A/B u patologiji ateroskleroze, s obzirom da miševi nemaju gen koji bi mogao da se okarakterise kao jasan ortolog genu za ANRIL, a koji je jedan od najznačajnijih za razvoj ateroskleroze kod čoveka (Congrains i sar., 2010; Lesca i sar., 2011). Miševi kojima nedostaje protein Retinoblastom, (čija je aktivnost direktno pod uticajem CDKN2A/B) razvijaju veći plak uz veći stepen proliferacije makrofaga (Boesten i sar., 2006; Robbins i sar., 2013).

U kulturi fibroblasta je pokazano da suprimiranjem ANRIL-a dolazi do povećanja koncentracije CDKN2A i CDKN2B (Congrains i sar., 201). Obratno, „knock-down“ ANRIL-a pomoću RNK interferencije u kulturi GMĆ smanjuje ekspresiju CDKN2A i ćelijski rast ali povećava ekspresiju CDKN2B (Congrains i sar., 2012). Dodatnu komplikaciju u rasvetljavanju mehanizma delovanja unosi činjenica da ANRIL ima veliki broj izoformi, od kojih su neke tkivno specifične (Folkersen i sar., 2009, Burdt i sar., 2010).

Varijante u regionu 9p21 koje su asocirane sa KVB asocirane su i sa sniženom ekspresijom CDKN2B u humanom subkutanom adipoznom tkivu i leukocitima iz cirkulacije. CDKN2B ima ulogu u regulisanju širenja subkutanog adipoznog tkiva i otud bi mogao uticati na gojaznost i KVB (Svensson i sar., 2014). Hronična inflamacija povezuje DM i KVB. U obe bolesti dolazi do poremećaja u produkciji citokina i leukocitne aktivacije u adipoznom tkivu, jetri, pankreasu i vaskularnom zidu. CDKN2A i CDKN2B modulišu proliferaciju T limfocita, mirovanje i apoptozu (Bianchi i sar., 2006; Erickson i sar., 2006; Kim i sar., 2007). U mijeloidnoj ćelijskoj lozi, CDKN2B utiče na proliferaciju monocita (Bies i sar., 2010).

Pored gena INK/ARF lokusa, 9p21 region uključuje i klaster gena za interferon tip I, koji kodiraju citokine sa antivirusnim, aniproliferativnim i imunomodulatornim efektom, koji svakako mogu uticati na imunološku komponentu bolesti (Stark i sar., 1998).

1.3 Inhibitor ciklin zavisne protein kinase 2B (CDKN2B)

1.3.1 Gen *CDKN2B*

Gen *CDKN2B* mapiran je u hromozomskom regionu 9p21 na poziciji 22002903..22009313 (GRCh38.p7). Njegova sekvenca se u celosti nalazi u prvom intronu gena za ANRIL (Plichart M 2007). Sastoji se od dva egzona koji kodiraju protein. Identifikovana su dva transkripta gena (3878 i 4001 baznih parova) sa kojih se transliraju proteini dužine 138 i 78 aminokiselina. Duži transkript ima dodatni interni region koji dovodi do mutacije odnosno pomerenog okvira čitanja (https://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?hgnc_id=HGNC:1788 - HGNC).

CDKN2B je visoko konzervisani regulator ćelijskog ciklusa i proto-onkogen asociran sa patogeneozom različitih maligniteta (Krimpenfort i sar., 2007). Ektopična ekspresija *CDKN2B* inhibira rast ćelijskih linija koje potiču od tumora (Stone i sar., 1995). *CDKN2B* je eksprimiran u zdravim i aterogenim koronarnim arterijama čoveka (Holdt i sar., 2011). Nalazi se uz gen za *CDKN2A* na hromozomu 9p21. Ova dva gena su blisko povezana. Istovremena delecija je otkrivena u velikom broju uspostavljenih ćelijskih linija karcinoma čoveka (Kamb sar., 1994; Nobori sar., 1994; Hannon and Beach, 1994; Okuda sar., 1995).

Varijante regiona 9p21 su statistički značajno asocirane sa ekspresijom *CDKN2B* u adipoznom tkivu (Schunkert i sar., 2011, McPherson i sar., 2013). Ekspresija *CDKN2B* je snižena u aterosklerotskim plakovima bolesnika koji su nosili rizični alel varijante rs1412829 (Kojima i sar., 2014). Isti autor je pokazao da gubitak *CDKN2B* čini GMĆ otporne na eferocitozno uklanjanje pod uslovima hronične inflamacije (Kojima sar., 2014) a takođe je pokazano da gubitak *Cdkn2b* indukuje apoptozu GMĆ i na taj način utiče na odgovor krvnih sudova na mehaničku povredu (Leeper sar., 2013). Grupa sa univerziteta Stanford koristila je *Cdkn2b*^{-/-} miševe, na kojima je pokazano povećanje apoptoze GMĆ i smanjeno fagocitno preuzimanje u mišjim modelima ateroskleroze. Takođe su pokazali da gubitak *Cdkn2b* smanjuje mogućnost GMĆ da podrže razvoj novih krvnih sudova i tkivnu perfuziju na ne-

aterosklerotskom animalnom modelu periferne arterijske bolesti (Nanda sar., 2015). Osobe sa genotipovima koji nose rizik imaju sniženu ekspresiju CDKN2B u cirkulišućim ćelijama i tkivu srca (Y Yan i sar., 2009; Pilbow i sar., 2012)

1.3.2 Protein CDKN2B

Protein inhibitor ciklin-zavisne protein kinaze 2B (eng. *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B*, CDKN2B ili p15^{INK4b}) poznat i kao MTS-2 (eng. *multiple tumor suppressor 2*) je protein kodiran od strane gena *CDKN2B* kod ljudi (Hannon i sar., 1994). Pripada famili INK4 proteina (eng. *Inhibitors of cyclin-dependent kinase 4*) kojoj pripadaju još i CDKN2A (p16^{INK4a}), CDKN2C (p18^{INK4c}) i CDKN2D (p19^{INK4d}) (Roussel i sar., 1999). Svi članovi familije imaju višestruke ankirinske ponovke i funkciju inhibitora ciklin D zavisnih kinaza (CDK), izazivajući zaustavljanje ćelijskog ciklusa u G₁ fazi. CDKN2B se vezuje za CDK4 i CDK6. Ćelijski ciklusi su regulisani cikličnom aktivacijom CDK, kroz njihovu asocijaciju i disocijaciju sa ciklinom (Hunter i sar., 1994, Morgan i sar., 1995). Formiranje kompleksa CDK-ciklin zavisi od koncentracije ciklinskih subjedinica, koja varira za vreme ćelijskog ciklusa. Vezivanje ciklina olakšava aktivaciju CDK putem fosforilacije (Jeffrey i sar., 1995). Vezivanje inhibitora CDK za CDK ili kompleks CDK-ciklin, suprimira njihovu katalitičku aktivnost, zaustavljajući ćelijski ciklus u G₁ fazi ćelijskog ciklusa (Sherr CJ. i Roberts JM. 1995).

CDKN2B ima molekulska težinu 14,7 kDa, sastoji se od 138 aminokiselina i ima intraćelijsku lokalizaciju (Hannon GJ. i Beach D. 1994). Identifikovana je alternativno iskrojena forma proteina označena kao p10. Alternativno iskrojanje nastaje zbog alternativnog 5' donorskog mesta u intronu 1. Stop kodon unutar novog egzona (označenog kao 1β) vodi do translacije proteina identičnog NH₂ terminusa CDKN2B ali sa novim COOH terminusom. Nije identifikovana interakcija p10 sa CDK4 i CDK6 (Tsubari i sar., 1997). U aterosklerotskim lezijama je protein CDKN2B kolokalizovan sa CD68 pozitivnim makrofagima i GMC koje su uključene u proces aterogeneze (Holdt i sar., 2011).

1.4 3-Hidroksiacil Koenzim A dehidrataza 4 (HACD4)

1.4.1 Gen *HACD4*

Humani gen *HACD4* mapiran je u hromozomskom regionu 9p21, na poziciji 20,999,515-21,031,636 (GRCh38.p12). sa koje se transkript prepisuje u reverznoj orijentaciji u odnosu na vodeći lanac. Gen poseduje sedam egzona koji se alternativno iskrajaju. Do sada su identifikovana dva transkripta. Alternativno iskrojeni transkript dužine 1126 bp (koji se sastoji od 3 egzona) koji nije protein kodirajući i transkript dužine 8267 bp (sastoji se od svih sedam egzona) koji kodira protein dužine 232 amino kiselina

(http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000188921;r=9:20999515-21031636). Pokazano je da je gen *HACD4* konzerviran je u genomima nekoliko životinja (šimpanze, pasa, miša, pacova) (Strausberg i sar., 2002). Deletiran je u glioblastomima i akutnoj limfoblastičnoj leukemiji, što sugeriše da ima funkciju proto-onkogeno (Nord i sar., 2009, Usvasalo i sar., 2010).

1.4.2 Protein HACD4

Protein HACD4 (3-hidroksiacil-coenzyme A dehidrataza 4) katalizuje konverziju 3-hidroksipalmitoil-koenzima A u 2,3 trans heksadekanoil-koenzim A. Učestvuje u procesu sintezemasnih kiselina veoma dugog lanca (MKVDL) katalizujući reakciju dehidratacije. MKVDL su masne kiseline sa više od 22 ugljenikova atoma. Imaju ulogu u različitim ćelijskim procesima, uključujući biogenezu sfingolipida, formiranje kože, sazrevanje spermatozoida, fetalni rast i razvoj, funkcionisanju retine, razvoj mozga, inflamacija i održavanje mijelina (Kihara i sar., 2012). Koristeći Western-blot analizu detektovan je značajan nivo ekspresije ovog proteina u leukocitima, dok je nešto niža ekspresija detektovana u plućima, bubrezima, slezini, placenti i srcu (Ikeda i sar., 2008). U drugim ispitivanim tkivima (mozak, skeletni mišići, timus, debelo i tanko crevo) nije detektovana ekspresija HACD4 (Ikeda i sar., 2008). HACD4 je eksprimiran u endoplazmatskom retikulumu transfektovanih HeLa ćelija (Ikeda i sar., 2008).

Proces sinteze se odvija na membrani endoplazmatičnog retikuluma sukcesivnim smenjivanjem procesa kondenzacije, redukcije i dehidratacije pri čemu se dodaju dva ugljenikova atoma nakon svakog ciklusa. HACD4 interaguje sa enzimima kondenzacije masnih kiselina, verovatno u elongacionom kompleksu sa masnim kiselinama. Ostali članovi ove familije (HACD1, HACD2, HACD3) su paralozi koji u procesu dehidratacije prevode 3-hidroksi-koenzimA u 2,3-trans-enoil-koenzimA (Ikeda i sar. 2008). Kao i HACD4, pokazuju istu aktivnost ali svaki poseduje drugačiji afinitet i brzinu reakcije (Ikeda i sar.,2008).

HACD4 poseduje 6 transmembranskih domena i protein tirozin fosfatazi sličan motiv između transmembranskih domena 2 i 3. Protein HACD4 se još naziva i PTPLAD2 (eng. *protein tyrosine phosphatase-like A domain-containing 2*) zbog postojanja CXXXXXP protein tirozin fosfatazi (skraćeno eng. *PTP*) sličnog motiva u bliskom PTPLA proteinu (Uwanogho i sar., 1999). Uprkos tome, ni jedan od proteina iz HACD (PTPL) familije ne sadrži PTP-azni domen niti ispoljava fosfataznu aktivnost. Protein HACD4 ne poseduje ni cistein, potreban za katalizu fosfatazne aktivnosti u PTP-azi (Ikeda i sar., 2008).

Zhu i sar., su okarakterisali HACD4 kao tumor supresor u karcinogenezi skvamoznih ćelija ezofagusa. HACD4 inhibira proliferaciju skvamoznih ćelija ezofagusnog karcinoma, dok povećana ekspresija smanjuje preživljavanje ćelija. Pokazali su da isključivanje (eng. *Knockdown*) gena *HACD4* povećava fosforilaciju proteina STAT3na poziciji tirozina 705 i serina 727 u HET-1A (ćelijska linija epitela ezofagusa) i NIH3T3 (ćelijska linija fibroblasta miša). Nije poznato kojim mehanizmom HACD4 snižava nivo fosforilacije STAT3.(Zhu i sar., 2014). Ovaj gen je deletiran u glioblastomima i akutnoj limfoblastičnoj leukemiji, što sugerise da bi mogao imati funkciju proto-onkogen (Nord i sar., 2009; Usvasalo i sar., 2010).

1.5 Genetičke varijante hromozomskog regiona 9p21 ispitane u studiji

1.5.1 Varijanta rs10757278 u genu *ANRIL*

Varijanta rs10757278 nalazi se u 3' netranslatirajućem regionu gena za *ANRIL*, na poziciji 22124478 (GRCh38.p12) i predstavlja tranzitnu zamenu adenina u guanin (A/G). Učestalost ređeg alela u projektu hiljadu genoma je 40,08% (The 1000 Genomes Project Consortium 2015). Rezultati HapMap CEU projekta pokazuju učestalost od 50% (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=10757278). Njen značaj je prvi put objavljen u studiji Helgadottir i saradnika 2007. godine kada je otkriveno da je alel G značajno češći kod bolesnika sa KBS i IM u odnosu na zdrave kontrole (Helgadottir i sar., 2007). Značaj varijante, detektovan u pomenutoj studiji je i taj što je njena asocijacija sa IM ostala statistički značajna i nakon korekcije na druge varijante u regionu 9p21 (koje su gubile značajnost nakon korekcije na rs10757278). Procenjeni rizik koji varijanta nosi na nivou populacije iznosi 21% za razvoj IM i 31% za razvoj ranog IM. Pokazano je da je asocijacija snažnija u mlađem dobu (MI pre 50 za muškarce i pre 60 za žene). Takođe svaka kopija ređeg alela dovodi do skraćenja od jedne godine životne dobi u kojoj se dešava akutni IM (Helgadottir i sar., 2007).

Nekoliko studija je objavilo odsustvo asocijacije rs10757278, odnosno njegove proksimalne varijante (rs1333049), u Afričkoj populaciji (Assimens i sar., 2008, Zhang i sar., 2013). Iako je rs10757278 u studiji Helgadottir i sar. bio najznačajnije asociiran sa KBS, u populaciji španskog porekla je dobijena značajnija asocijacija za rs2383206 (Assimens i sar., 2008). Najznačajnija asocijacija u populaciji istočne Azije takođe je zabeležena za rs2383206 sugerišući međupopulacione razlike riziku koji nose Genetičkihenske varijante HR 9p21 za razvoj KBS i IM (Assimens i sar., 2008). Deghan D. i sar. nisu detektovali značajnu asocijaciju rs10757278 sa povećanim rizikom za razvoj KBS u prospektivnom ispitivanju urađenom u okviru Roterdamske studije (Deghan i sar., 2008). Cunnington i sar. nisu pronašli značajnu asocijaciju sa zadebljanjem sloja intima-medija karotidnih arterija, a koji predstavlja rani znak ateroskleroze (Cunnington i sar., 2009). Genetička varijanta rs10757278 je asociirana i sa vaskularnim patologijama kao što su periferna arterijska bolest, aterosklerotski

moždani udar, moždana i abdominalna aneurizma (Helgadottir i sar., 2008; Gschwendtner i sar., 2009; Thorgeirsson i sar., 2008). Nalazi se na mestu vezivanja regulatornog proteina STAT 1 (Harismendy i sar., 2011). Jedan od predloženih mehanizama delovanja rs10757278 bi bio preko uticaja na ekspresiju obližnjih (ANRIL, CDKN2B, CDKN2A, MTAP) i udaljenih gena, kao i modulisanjem odgovora na inflamaciju (Yan i sar., 2009; Jarinova i sar., 2009; Harismendy i sar., 2011).

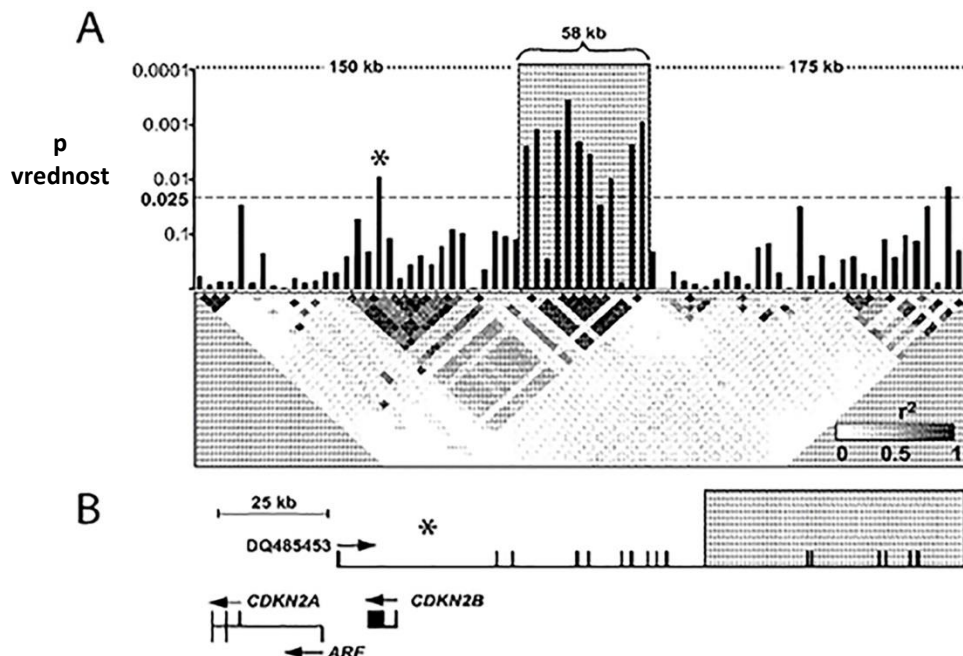
1.5.2 Varijanta rs518394 u genu ANRIL

Nalazi se u prvom intronu gena za ANRIL, centromerno u odnosu na gen *CDKN2B*, na poziciji 22019674 (GRCh38.p12) u reverznoj orijentaciji u odnosu na vodeći lanac molekula DNK. Učestalost ređeg alela (C) na osnovu rezultata projekta 1000 genoma iznosi 19,59% (The 1000 Genomes Project Consortium 2015), dok rezultati HAP-MAP CEU pokazuju da taj procenat iznosi 54,86 u Evropskoj populaciji (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=518394).

Aleli koji nose rizik sačinjavaju haplotip koji se prostire regionom od oko 58 kb. U studiji McPhersen i saradnika u regionu veličine 350 kb (koji okružuje pomenuti segment) od 65 ispitivanih varijanti detektovane su dve koje imaju nominalno značajnu asocijaciju sa rizikom za razvoj KBS, uključujući i rs518394 (Slika 4; McPherson i sar., 2007). Iako do sada nema čvrstih dokaza koji bi vezali genetičku varijantu rs518394 sa rizikom za nastanak KBS postoje studije čiji rezultati ukazuju da bi rs518394 mogao biti kandidat za asocijaciju sa nastankom/progresijom ateroskleroze (Fan i sar., 2013; Chen i sar., 2013). Alelna varijanta C rs518394 u haplotipu GCCG (rs523096, rs518394, rs564398 i rs7865618) značajno povećava rizik za nastanak infarkta miokarda kod bolesnika kod kojih je prethodno angiografski dijagnostikovana KBS, pri čemu je pokazan protektivan efekat genotipa sa komplemetarnim varijantama (AGTA) (Fan i sar., 2013). Sličan rezultat detektovan je u populaciji Saudijske Arabije gde je alel G varijante rs518394, kao i haplotip AGTA u kome se ona nalazi protektivan za razvoj IM (AbdulAzeez i sar., 2016).

Genetička varijanta rs518394 asocirana je sa povećanom reaktivnošću trombocita, čime bi se mogao objasniti uticaj na klinički događaj (infarkt miokarda) kod bolesnika sa KBS. Studija je urađena u grupi Amiša (Musunuru i sar., 2010). Postoji

značajna asocijacija sa nastankom periodontitisa u studiji urađenoj u populacijama Danske i Nemačke (Schaefer i sar., 2010). Isti autori su označili varijantu kao vodeću u haplotipskom bloku, kao što je prethodno objavljeno i od strane Fan i saradnika u studiji na karotidnoj aterosklerozi (Fan i sar, 2013). U GWAS u populaciji Japana je pronađena značajna asocijacija sa primarnim glaukomom otvorenog ugla (eng. *primary open-angle glaucoma*) (Masakazu i sar., 2012). Za sada ne postoje eksperimentalni dokazi o načinu na koji ova genetička varijantada utiče na ekspresiju obližnjih gena. U studiji Yan i sar, nije pronađena značajna asocijacija varijante rs518394 sa nivoom ekspreija iRNK gena *INK/ARF* lokusa u T-limfocitima periferne krvi zdravih individua (Yan i sar., 2009).



Slika 4. Genetičke varijante i geni locirani u segmentu hromozomskog regiona 9p21, asociрани sa najvećim rizikom za nastanak KBS. **A** *Pozicija varijante rs518394 u odnosu na segment hromozoma 9p21 dužine 58 kb koji nosi najveći rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti, u HR 9p21. r^2 koeficijent neravnoteže vezanosti; Na vertikalnoj skali su predstavljene p vrednost; **B** Fizička mapa regiona koja prikazuje region 58kb region visokog rizika (označen sivom bojom) u odnosu na dugu nekodirajuću RNK *ANRIL*, i obližnje gene *CDKN2B*, *CDKN2A* i *ARF*; Strelice predstavljaju smer transkripcije gena; *Pozicija genske varijante rs518394; Slika preuzeta i adaptirana iz McPherson i sar., 2007.

1.5.3 Varijanta rs2275888 u genu *HACD4*

Genetička varijanta rs2275888 predstavlja tranziciju T/C u intronu gena *HACD4* na poziciji 21017885 (GRCh38.p12). Učestalost ređeg alela C na osnovu rezultata projekta 1000 genoma iznosi 34,9% (The 1000 Genomes Project Consortium 2015), dok rezultati genotipizacije HAP-MAP CEU pokazuju da taj procenat iznosi 46,9% (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2275888).

Do sada je objavljen mali broj studija u kojima je ispitivana uloga rs2275888 u patogenezi KBS. U GWAS sprovedenom u populaciji Zuni indijanaca koji su imali hroničnu bolest bubrega, detektovana je njegova asocijacija sa koncentracijom serumskog kreatinina (Laston i sar., 2015). Povišeni nivo kreatinina može ukazati na stepen stenozе angiografski ispitane KBS (Korkmaz i sar., 2011). Ova genetička varijanta anotirana je kao *cis/trans* eQTL za interferon β 1 (IFN- β) i IFN- β indukovane gene, kao i IFN- β indukovanu signalnu kaskadu gena u monocitima *in vitro*, nakon stimulacije lipopolisaharidima (Fairfax et al., 2014). Pored toga, u tibijalnoj arteriji je pokazano da predstavlja eQTL za *FOCAD* i druge gene u blizini *HACD4* (Ardlie i sar. 2015). Podaci iz baze podataka „rSNP base“ pokazuju da ima regulatorni efekat (Guo i sar. 2014). *FOCAD* predstavlja deo fokalnog adhezionog kompleksa. Ima tumor supresorsku aktivnost i ispoljava uticaj na ćelijsku pokretljivost (Brockschmidt i sar., 2012).

1.5.4 Varijanta rs36212560 u genu *HACD4*

Genetička varijanta rs36212560 predstavlja inserciono/delecionu varijaciju u intronu gena *HACD4* na poziciji 21017420 (GRCh38.p7). Učestalost ređeg alela, delecije, na osnovu rezultata sekvenciranja projekta 1000 genoma iznosi 19,15% (The 1000 Genomes Project Consortium 2015).

Ima potencijalno funkcionalni efekat na šta ukazuju podaci ENCODE (*eng.* Encyclopedia of DNA Elements projekta) i GTEx (*eng.* Genotype-Tissue Expression) projekata (Guo i sar., 2014). Do sada nije ispitivan u studijama asocijacije sa kardiovaskularnim ili drugim patologijama.

2 HIPOTEZA I CILJEVI

Studija slučajeva i kontrola obuhvata analizu moguće asocijacije genetičkih genetičkih varijanti HR 9p21, i nivoa ekspresije gena *CDKN2B*, *HACD4* i *FOCAD* na nivou iRNK koja bi imala ulogu u patogenezi ateroskleroze, u grupi ispitanika iz Srbije. Ispitivanje je sprovedeno u grupi bolesnika sa koronarnom aterosklerozom (koji su doživeli ishemijski infarkt miokarda), grupi bolesnika sa uznapređovalom karotidnom aterosklerozom koji su podvrgnuti operaciji endarterektomije, kao i zdravim kontrolama iz populacije Srbije. Studija se bazira na hipotezi da su varijante hromozomskog regiona 9p21 asociirane sa nastankom i/ili progresijom ateroskleroze, nastankom kliničkih komplikacija (IM, moždani udar, komplikacije na karotidnom plaku) kao i da je jedan od mehanizama, kojim genske varijante ispoljavaju uticaj na fenotip regulacija ekspresije gena u HR 9p21.

U skladu sa hipotezom postavljeni su sledeći ciljevi:

1. Ispitati asocijaciju varijanti rs10757278 i rs518394 u genu *ANRIL* i varijanti rs36212560 i rs2275888 u genu *HACD4*, i njihovih haplotipova sa rizikom za nastanak karotidnog plaka i infarkta miokarda.
2. Ispitati asocijaciju varijanti rs10757278 i rs518394 u genu *ANRIL* i varijanti rs36212560 i rs2275888 u genu *HACD4* sa fenotipom karotidnog plaka i kliničkim komplikacijama karotidne ateroskleroze.
3. Ispitati asocijaciju varijanti rs10757278 i rs518394 u genu *ANRIL* i varijanti rs36212560 i rs2275888 u genu *HACD4* sa klasičnim faktorima rizika za nastanak ateroskleroze
4. Ispitati da li je nivo ekspresije gena *CDKN2B*, *HACD4* i *FOCAD* na nivou iRNK asociiran sa genotipovima varijanti rs10757278 i rs518394 u genu *ANRIL* i varijanti rs36212560 i rs2275888 u genu *HACD4* u tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka.
5. Ispitati da li je nivo ekspresija gena *CDKN2B* i *HACD4* na nivou iRNK asociiran sa infarktomiokarda i genotipovima varijanti rs10757278 i rs518394 u genu *ANRIL* i varijanti rs36212560 i rs2275888 u genu *HACD4* u mononuklearnim ćelijama periferne krvi bolesnika sa infarktomiokarda, 6 meseci nakon kliničkog događaja.

3 MATERIJAL I METODE

3.1 Materijal

3.1.1 Uzorak

Bolesnici su prema kliničkim i laboratorijskim podacima klasifikovani od strane lekara kao bolesnici sa KP, odnosno sa ishemijskim IM u institucijama u kojima su lečeni. Pored primarne dijagnoze, bolesnici su pregledani i na komorbiditete. Genetičko-epidemiološka analiza učestalosti ispitivanih varijanti hromozomskog regiona 9p21 njihove asocijacije sa nastankom i kliničkim komplikacijama kod čoveka uključila je grupu bolesnika sa karotidnim plakom (KP) (n = 500), grupu bolesnika sa ishemijskim IM (n = 540) i kontrolnu grupu zdravih individua. Kontrole čine grupu kojoj su uzeti uzorci pune periferne krvi za genetičku analizu (n = 325) i grupa kojoj je uzeta krv za analizu ekspresije na nivou iRNK (n = 27). Bolesnici sa KP (n = 191) lečeni su na Klinici za vaskularnu hirurgiju, Instituta za kardiovaskularne bolesti Dedinje u Beogradu, Srbija, gde su lečeni u periodu 2004. do 2005. godine i na Institutu za kardiovaskularne bolesti kliničkog centra Srbije (IKVB KCS) u Beogradu, Srbija (n = 316) u periodu 2006. do 2007. godine. Od svih bolesnika su uzeti uzorci pune periferne krvi za ekstrakciju DNK, a od n = 58 bolesnika uzorci tkiva karotidnog plaka za ekstrakciju RNK.

Bolesnici sa IM regrutovani su na Klinici za kardiologiju KCS u Beogradu, Srbija (n = 340), gde su lečeni tokom 2013. godine i na Klinici za kardiologiju, Kliničko-bolničkog centra Zvezdara u Beogradu, Srbija (n = 200) gde su lečeni u periodu 2010. do 2011. godine. Svi bolesnici uključeni u studiju bili su hospitalizovani usled akutnog ishemijskog IM i podvrgnuti perkutanoj koronarnoj intervenciji (PKI), tokom koje je detektovana stenoza (>50 %) najmanje jednog koronarnog krvnog suda. Svim bolesnicima su uzeti uzorci periferne krvi za ekstrakciju DNK, a od 75 bolesnika regrutovanih u Gradskoj bolnici i uzorci periferne krvi za ekstrakciju RNK iz MČPK.

Kontrolna grupa obuhvatila je zdrave individue (starosti 18 do 90 god.) iz populacije Srbije nasumično odabrane prilikom kontrolnog zdravstvenog pregleda, urađenog na teritoriji Beograda i Niša. Od svih članova kontrolne grupe uzeti su uzorci

pune periferne krvi za ekstrakciju DNK, a od 40 članova uzorci periferne krvi za ekstrakciju RNK iz MČPK. Standardne biohemijske analize su urađene u medicinskim ustanovama u kojima su ispitanici lečeni ili su podvrgnuti kontrolnom zdravstvenom pregledu.

Od svih osoba uključenih u studiju uzeti su lični i anamnestički podaci i informisani pristanak za učeše. Studija je odobrena od strane Etičkih komiteta institucija koje saučestvuju u studiji. Genetičko-epidemiološka analiza varijanti u molekulu DNK i nivoi iRNK gena urađena je u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke „Vinča”, Univerziteta u Beogradu, Srbija.

3.1.2 Aparatura

Laboratorijska aparatura korišćena za obavljanje eksperimentalnog dela doktorske teze:

- ABI PRISM™ 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems)
- Cenrifuga ("Super Speed" Sorvall Inc, Norwalk Conn USA)
- Mikrocentrifuga (Eppendorf 5417R)
- Vorteks aparat (Ependorf)
- Set pipetora (Ependorf)
- Spektrofotometar BioSpec-nano (Shimadzu Biotech)
- PCR aparat: ABI GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- Real-time PCR sistem: Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems)
- Sistem za horizontalnu elektroforezu (IBI- International Biotechnologies Inc, Model HRH, OWL Scientific, Model B3, Inc. Woburn, MA, SAD)
- Sistem za vertikalnu elektroforezu (Elektrofor VP-80, Rovigo, Italy, Bio Rad, SAD)
- Sistem za snimanje i analizu gelova GDS8000 (UVP Inc, Upland, CA, SAD):
mračna komora sa UV/belom svetlošću, CCD kamera, transluminator,
- Vodeno kupatilo (Termomedicinski aparati, Bodalec i Havočić, YU)
- Vaga (Tehtnica ET 111, YU)
- Analitička vaga (Mettler, Switzerland)
- pH metar (Iskra MA 5730, YU).

3.2 Metode

3.2.1 Ultrazvučna karakterizacija karotidnog plaka

Karotidni plak je definisan kao lokalizovana eho-struktura koja zalazi u lumen krvnog suda sa rastojanjem između spoja medija-adventicije i površine lezije okrenute lumenu većim od 1.2 mm. Karakterizacija KP vršena je ultrazvučnim pregledom, korišćenjem kolor duplek ultrasonografije, koja kombinuje pulsni dopler i prikaz tkiva u realnom vremenu (real time B-mode) korišćenjem aparata Toshiba, Power Vision 6000, 7.5 Mhz (*Riverside, CA*). Ultrasonografski pregled obuhvatio je distalni deo zajedničke karotidne arterije u dužini od 2 cm, karotidni bulbus i proksimalni deo unutrašnje karotidne arterije u dužini od 2 cm.

Plakovi su klasifikovani prema stepenu ehogenosti na ehogene (stabilne, fibrolipidne) i eholucentne (nestabilne, komplikovane) (Gray-Weale i sar. 1988). Heterogenost plaka se povećava sa povećanjem stepena stenozе. Ehogenost plaka zavisi od njegovog sastava. Eholucentni plak čine ili nekrotične ili hemoragične lezije, dok fibrotično tkivo predstavlja dobro ehogenu strukturu, koja je naročito prisutna u homogeno ehogenim plakovima. Mali kalcifikati su takođe pronađeni u heterogeno ehogenim plakovima (Sztajzel i sar., 2005).

Procena stepena stenozе urađena je merenjem rezidualnog lumena krvnog suda, po ECST kriterijumu (eng. *European Carotid Surgery Trialists Collaborative Group*, ECST) kod bolesnika lečenih u IKVB Dedinje, i NASCET kriterijumu (eng. *North American Symptomatic Carotide Endarterectomy Trial*, NASCET) kod bolesnika lečenih u IKVB KCS. NASCET i ECST su metode koje određuju dijаметar na različite načine. Oba mere lumen na mestu maksimalne stenozе, ali je drugačije meren dijаметar originalnog neizmenjenog krvnog suda. Prema ECST kriterijumu merenje stepena stenozе krvnog suda vrši se poređenjem odnosa dijametra rezidualnog lumena sa procenjenim dijametrom karotidnog bulbusa (ECST collaborative group 1991). NASCET kriterijum uzima u obzir odnos dijametra rezidualnog lumena i dijametra distalnog normalnog segmenta unutrašnje karotidne arterije (NASCET 1991). U slučajevima kada distalni deo normalnog segmenta unutrašnje karotidne arterije nije

očuvan arterija je okarakterisana sa stepenom stenozе od 95 %. S toga je stepen stenozе od 70 % po ECST isti kao i stepen stenozе od 50% po NASCET (Rothwell i sar., 1994). Zbog razlike u načinu procene stepena stenozе korišćena je formula ($\% \text{ ECST} = 0,6 \times \% \text{ NASCET} + 40 \%$) da bi se dobile ekvivalentne vrednosti stepena stenozе (Rothwell i sar., 1994). Klinička indikacija za karotinu endarterektomiju postavljena je na osnovu kliničke manifestacije i rezultata ultrazvučnog pregleda prema važećim pravilima za lečenje ekstrakranijalne bolesti karotidnih arterija, a nakon pregleda neurologa i vaskularnog hirurga.

3.2.2 Definicija simptomatske karotidne stenozе

Podela bolesnika sa KP na asimptomatske (koji nisu imali neurološki deficit) odnosno simptomatske vršena je od strane lekara na osnovu prethodnih kliničkih simptoma: ako je bolesnik pretrpeo ipsilateralni moždani udar, tranzijentni ishemijski napad ili amaurozis fugaks (kratki gubitak vida u jednom ili oba oka). Klasifikacija je zasnovana na osnovu anamneze uzete od strane bolesnika i/ili zabeležene u zdravstvenom kartonu.

3.2.3 Karakterizacija bolesnika sa IM

Dijagnoza akutnog IM je zasnovana na kliničkim simptomima, elektrokardiogramskim promenama, i/ili kardijačnim biohemijskim markerima nekroze (Troponin M, kreatinin kinaza, kreatinin kinaza MB) u skladu sa uputstvom Svetske Zdravstvene Organizacije (White i sar., 2008). Dijagnoza nestabilne angine pektoris data je usled prisustva bola u grudima, sa EKG znacima ishemije (sve osim ST elevacije: ST denivelacija i/ili promene T talasa) i prisustva povišenog nivoa markera nekroze miokarda. Svi bolesnici su bili podvrgnuti perkutanoj koronarnoj intervenciji (PCI) tokom koje je izvršena balon dilatacija na mestu aterosklerotskog suženja arterije i ugradnja stenta. Bolesnici su podvrgnuti primarnoj ili odloženoj PCI. Tokom PCI bolesnici su ispitani na koronarnu ateroskleroze srca, koja je definisana kao prisustvo stenozе $\geq 50\%$ u jednoj ili više koronarnih arterija (leva glavna arterija, desna koronarna arterija, leva prednja spuštajuća arterija, cirkmfleksna arterija).

Kriterijumi za neključivnje bolesnika sa IM u studiju bili su: prethodni IM, prethodna operacija ili trauma, istorija febrilnih stanja, istorija autoimunih oboljenja sa ili bez imunosupresivne terapije, prethodna renalna disfunkcija prema međunarodnoj klasifikaciji (klirens kreatinina <60 mL/min, kreatinin >200 mmol/L) ili hepatička disfunkcija (prema klasifikaciji *Child Pugh* razred B ili C), malignitet ili izostanak saglasnosti bolesnika da učestvuje u ispitivanju.

3.2.4 Anamnestički podaci bolesnika sa KP i IM

Bolesnicima su uzeti anamnestički podaci koji uključuju:

- 1) demografske podatke: pol, starost, telesna težina i visina (indeks telesne mase);
- 2) prethodna aterosklerotska bolest: angina pektoris, IM, prethodna PKI ili CABG;
- 3) faktori rizika za nastanak ateroskleroze: hipertenzija, dijabetes, pušenje, hiperlipoproteinemija, konzumacija alkohola;
- 4) komorbiditeti: periferna arterijska bolest, bubrežna insuficijencija, hronična opstruktivna bolest pluća (HOBP).

Dijagnoza arterijske hipertenzije je definisana kao vrednosti arterijskog krvnog pritiska $\geq 140/90$ mmHg ili uzimanje antihipertenzivne terapije. *Diabetes mellitus* (DM) je definisana kao nivo glukoze ≥ 7 mmol/L ili uzimanje insulina ili oralnih antidijabetika. Osobe koje u zadnjih 6 meseci puše više od 5 cigareta na dan okarakterisani su kao pušači. U studiju su uključeni bolesnici sa komorbiditetima koji nisu bili jedan od kriterijuma za isključivanje iz studije.

3.2.5 Laboratorijske analize krvi

Analiza biohemijskih faktora rizika za nastanak karotidnog plaka, odnosno biomarkera nekroze izvršena je standardnim laboratorijskim procedurama u institucijama u trenutku hospitalizacije bolesnika odnosno pregleda zdravih kontrola.

3.2.6 Ekstrakcija DNK iz ćelija pune periferne krvi fenol-hloroformskom metodom

Ekstrakcija DNK je urađena fenol hloroformskom metodom po Kunkelu i saradnicima (Kunkel i sar., 1977), iz 3 ml krvi uzetog u vakutajner tubi sa EDTA kao antikoagulansom.

Reagensi:

Etanol, 96% (Zorka Pharma)

Etilendiamin tetrasirćetna kiselina, dinatrijumova so, dihidrat (EDTA Sigma)

Ekvilibrisani fenol, pH=6,7 (USB)

Hloroform (Kemika)

Izoamilalkohol (Merk)

Magnezijum hlorid ($MgCl_2 \times 6H_2O$, Sigma)

Natrijum acetat ($C_2H_3O_2Na \times H_2O$, Zorka Pharma)

Natrijum dodecil sulfat ($C_{12}H_{25}O_4S \times Na$, Sigma)

Natrijum hlorid (Zorka Pharma)

Proteinaza K (Sigma)

Saharoza (Lachner)

Sirćetna kiselina (Zorka Pharma)

T-oktilfenoksipolietoksietanol (Triton X-100, Sigma)

Tris (trihidroksimetil) aminometan (Sigma)

Rastvori:

1. Lizogeni rastvor:

0,32 mol/l saharoza

10 mmol/l Tris-HCl, pH 7,5

5 mmol/l $MgCl_2$

1% Triton X-100

2. Rastvor II:

0,024 mmol/l EDTA, pH 8,0

0,075 mmol/l NaCl

3. 10 mg/ml, proteinaza K
4. 3 mmol/l, pH 5,0, Na-acetat
5. TE (Tris-EDTA) pufer:
10 mmol/l Tris, pH 7,6
1 mmol/l EDTA

Protokol:

1. Uzorak od 3 ml krvi pomešan je sa 24 ml lizogenog rastvora.
2. Smeša je zatim centrifugirana u sorval centrifugi na 800 rcf, 10 minuta, 4°C
3. Nakon odlivanja supernatanta talogu je dodato 125 µl rastvora II, nakon čega je talog resuspendovan.
4. Smeši je dodato 62,5 µl 10% SDS-a (deterdžent koji razlaže ćelijske membrane).
5. Dodato je 50 µl proteinaze K (10 mg/ml) i smeša je inkubirana 12-18h na 37°C.
6. Nakon inkubacije dodato je 0,5 ml ekvilibrisanog fenola nakon čega je usledilo centrifugiranje na 10800 rpm, 19 minuta, 18°C. Fenol rastvara proteine i omogućava razdvajanje proteina od DNK.
7. Posle centrifugiranja izvučena je gornja faza, dodato je 0,4 ml smeše fenol:hloroform (1:1) i smeša je centrifugirana na 10800 rpm, 19 minuta, 18°C.
8. Nakon centrifugiranja, gornja faza je izvučena, dodata je ista zapremina smeše hloroform:izoamilalkohol (24:1) i ponovljeno je centrifugiranje na 10800 rpm, 19 minuta, 18°C. Hloroform uklanja fenol. Izoamilalkohol smanjuje penu koja potiče od SDS-a.
9. Izvučena je gornja faza kojoj je dodat hladni ohlađeni 96% etanol i 3M natrijum acetat pH 5,0 (dve zapremine 96% C₂H₅OH i 1/10 zapremine 3M CH₃COONa, pH 5,0). DNK se precipitira i pojavljuje u vidu končića.
10. DNK je staložena na dnu mikropruvete, centrifugiranjem na 11900 rcf, 19 minuta, 4°C. Preostali sadržaj je odliven iz tube, a talog DNK ispran u etanolu (70%)

11. DNK se rastvarala u 200 µl TE pufera (pH 8,0).
12. Uzorci DNK čuvani su na + 4°C do trenutka korišćenja.

3.2.7 Ekstrakcija DNK iz periferne krvi na aparatu ABI PRISMTM™ 6100 Nucleic Acid PrepStation

Ekstrakcija DNK iz periferne krvi vršena je pomoću na aparatu ABI PRISMTM 6100 Nucleic Acid PrepStation (*Applied Biosystems*, SAD) omogućava ekstrakciju DNK iz 94 uzorka.

Reagensi:

Proteinaza K (Sigma)

Digestioni pufer za proteinazu K: PK Digestion Buffer (DNA BloodPrep™, Applied Biosystems)

Rastvor za prečišćavanje DNK: BloodPrep DNA Purification Solution (DNA BloodPrep™, Applied Biosystems)

Rastvor za ispiranje DNK: BloodPrep DNA Wash Solution (DNA BloodPrep™, Applied Biosystems)

Rastvori za eluciju DNK: Elution Solution 1 (DNA BloodPrep™, *Applied Biosystems*, SAD)

Elution Solution 2 (DNA BloodPrep™, *Applied Biosystems*, SAD)

Materijal:

Plastični nosač: ABI PRISMTM Splash Guard (*Applied Biosystems*, SAD)

Nosač sa filter-membranama za ekstrakciju i prečišćavanje DNK: DNA Purification Tray II (*Applied Biosystems*, SAD)

Mikroploča: 96-Well Reaction Plate with Barcode (*Applied Biosystems*, SAD)

Protokol:

1. U tubicu zapremine 1,5 ml sipano je 15 µl rastvora proteinaze K (20mg/ml) i 85 µl digestionog pufera (*PK Digestion Buffer*).
2. Smeši je dodato 150 µl krvi nakon čega je promešana provlačenjem kroz nastavak

- pipete.
3. Smeša je inkubirana na 58°C 10 min, da bi degradovali proteini.
 4. Dodato je 500 µl rastvora za prečišćavanje DNK (BloodPrep DNA Purification Solution) i smeša je promešana provlačenjem kroz nastavak pipete.
 5. Na aparatu su postavljeni plastični nosač (ABI PRISM™ Splash Guard) i nosač sa filter-membranama za ekstrakciju i prečišćavanje DNK (DNA Purification Tray II)
 6. U bunariće na nosaču DNA Purification Tray II sipano je po 650 µl smeše svakog pripremljenog uzorka i aktiviran je vakuum 80% u trajanju od 300 sekundi.
 6. U bunariće je dodato po 650 µl rastvora BloodPrep DNA Purification Solution i aktiviran je vakuum 80% u trajanju od 400 sekundi.
 7. U bunariće je dodato po 650 µl rastvora BloodPrep DNA Wash Solution i aktiviran je vakuum 80% u trajanju od 60 sekundi.
 8. U bunariće je dodato po 600 µl BloodPrep DNA Wash Solution i aktiviran je vakuum 80% u trajanju od 60 sekundi.
 9. U bunariće je dodato po 300 µl BloodPrep DNA Wash Solution i aktiviran je vakuum 80% u trajanju od 60 sekundi. Aktiviran je „pre-elution“ vakuum 100% u trajanju od 120 sekundi. Mikroploča (96-Well Reaction Plate with Barcode) je postavljena u poziciju „collection“ na aparatu i izvedeni su sledeći postupci:
 11. U bunariće je dodato po 100 µl Elution Solution 1 i aktiviran je vakuum 60% u trajanju od 120 sekundi.
 12. U bunariće je dodato po 100 µl Elution Solution 2 i aktiviran je vakuum 60% u trajanju od 120 sekundi.
 13. Uzorci DNK čuvani su na +4 °C.

3.2.8 Merenje koncentracije i provera čistoće izolovane DNK

Koncentracija rastvorene DNK izražena je u ng/µl i merena je spektrofotometrijski na aparatu Biospec-nano (Shimadzu). Merenjem apsorbance na 260nm talasne dužine u uzorku u odnosu na rastvarač (TE pufer) određena je koncentracija DNK u uzorku. Pored koncentracije merena je i zagađenost rastvora proteinima i neorganskim solima merenjem apsorbance na 280 i 230 nm. Uzorci koji su

imali zadovoljavajuću čistoću imali su odnos A260/A280 i odnos A260/A230 u opsegu 1,8-2,2. Koncentracija je merena iz jednog mikrolitra (dužina putanje ultraljubičastog zraka 0.2 mm) uzorka DNK razbalaženja, nanetog pipetom na okular aparata Biospec-nano (Shimadzu).

3.2.9 Genotipizacija varijante rs36212560 I/D u genu *HACD4*

Za određivanje genotipa inserciono/delecione varijante rs36212560 u genu *HACD4* korišćena je metoda lančane reakcije polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR). Deleciona varijanta u genu *HACD4* iznosi 5 bp, -TATAA). PCR je urađena korišćenjem para prajmera koji su dizajnirani tako da amplifikuju sekvencu koja uokviruje varijantu rs36212560 I/D i koja ima dužinu 123 bp ako je u pitanju sekvenca sa deletiranim alelom ili 128 bp ukoliko sekvenca sadrži inserciju. U tabeli 3.1. prikazane su sekvence amplimera korišćenih za genotipizaciju varijante rs36212560. Amplimeri su dizajnirani korišćenjem Primer 3 (v. 0.4.0) softvera sa otvorenim pristupom i NC_000009.12 kao referentnom sekvencom genoma (Untergasser i sar. 2012). Optimalni uslovi za PCR odabrani su podešavanjem finalnih koncentracija komponenti i temperaturnih uslova reakcije (Tabela 3.2.).

Tabela 3.1. Sekvence oligonukleotidnih amplimera korišćenih u PCR reakciji amplifikacije fragmenta gena *HACD4*.

Oznaka varijante	Sekvenca amplimera'	Smer amplimera
rs36212560 I/D [TATAA/-]	5'CTCACAGAAAGAATAATCATCCT- 3'	Vodeći lanac
	5'TAACCATATCCAATAGATTC-3'	Prateći lanac

I insercija; D delecija

Tabela 3.2. Komponente reakcije PCR za detekciju varijante rs36212560 I/D u genu *HACD4*.

Komponente PCR reakcije	Koncentracija u reakciji	Zapremina u reakciji (μl)
Pufer za PCR (10x)	1x	2
MgCl ₂	2,5mM	4
dNTP	0,25 mM	4
Amplimer F	(0,5 μM) 10 pmol	1
Amplimer R	(0,5 μM) 10 pmol	1
Genomska DNK	200 ng	1
<i>Taq</i> polimeraza	0,5 U	0,2
ddH ₂ O		6,8
Ukupno		20 μl

Temperaturni profil PCR reakcije imao je sledeće karakteristike: inicijalna denaturacija 95°C 5 min, 30 ciklusa: denaturacije na 95°C 45 s, hibridizacije amplimera na 61°C 1 min i elongacije na 72°C 45 s, i finalna ekstenzija na 72°C 5 minuta.

3.2.10 Elektroforeza na poliakrilamidnom (PAA) gelu

Za razdvajanje amplifikovanih fragmenata DNK i detekciju genotipova korišćena je vertikalna elektroforeza na 10% nedenaturišućem poliakrilamidnom gelu. Uzorci su naliveni sa 6x loading dye (*Thermo-scientific*) i kretali se pod uticajem električnog polja 2 sata pri voltaži 12V/cm dužine gela. Produkti PCR su dužine 123 bp (alelna varijanta delecije) ili 128 bp (alelna varijanta insercije).

Reagensi:

- Akrilamid (Sigma)
- Amonijum persulfat (Serva)
- Azotna kiselina (Kemika)
- Boratna kiselina (USB)
- Etanol (Zorka Pharma)

Etilendiamin tetrasirćetna kiselina, EDTA (Sigma)

Formaldehid (Sigma)

Natrijum karbonat (Sigma)

N,N'-metilenbisakrilamid (Sigma)

N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin, TEMED (Bio-Rad)

Sirćetna kiselina 99% (Zorka Pharma)

Srebro nitrat (Sigma)

Spravljanje nedenaturišućeg 10% PAA gela

Za spravljanje 10% nedenaturišućeg poliakrilamidnog gela korišćen je 40% rastvor akrilamida (akrilamid i bisakrilamid u odnosu 19 : 1), 10x Tris-boratni pufer, 10% amonijum persulfat i TEMED. Nakon završetka elektroforeze DNA fragmenti su vizuelizovani bojenjem gela srebro-nitratom.

Protokol bojenja PAA gela srebronitratom

gel je sukcesivno potapan u:

1. 10% etanol, 10 min
2. 1% rastvor azotne kiseline, 3 min
3. destilovanu vodu (radi ispiranja)
4. rastvor 12 mmol/l srebronitrata, 20 min
5. rastvor 0,28 mol/l natrijum karbonata sa 0,018% formaldehida do trenutka vizualizacije DNK fragmenata

Nakon pojavljivanja traka reakcija je prekinuta dodavanjem 10% sirćetne kiseline. Gel je ispran destilovanom vodom fotografisan sistemom GDS8000 (UVP Inc, Upland).

3.2.11 Genotipizacija varijanti rs1075278 i rs518394 u genu *ANRIL*, rs2275888 u genu *HACD4*

PCR u realnom vremenu (eng. *real-time* PCR, RT-PCR) omogućava praćenje amplifikacije DNK molekula tokom same reakcije. RT-PCR Metoda alelske

diskriminacije (eng. *Allelic discrimination real time PCR*) omogućava detektovanje alelskih varijanti na nivou pojedinačnih nukleotida. Zasniva se na korišćenju para amplimera i dve oligomerne probe od kojih je svaka specifična za određenu alelnu varijantu. U našim reakcijama koristili smo takmanove eseje, sa TaqMan® MGB (eng. Minor Groove Binding) probama koje specifično prepoznaju polimorfno mesto pojedinačnog nukleotida. Probe su specifično obeležene fluorescentnom bojom na 5' kraju.

Za genotipizaciju smo koristili komercijalno dostupne eseje (*Applied Biosystems, SAD*). Amplimeri i probe su dizajnirani tako da se vezuju u okviru ciljne sekvence, pri čemu se TaqMan® MGB probe vezuju za sekvencu između mesta vezivanja amplimera. Ciljne sekvence proba i nukleotidi koji određuju specifičnost vezivanja prikazani su u tabeli 3.3.

Tabela 3.3. Tabela prikazuje sekvence proba za određivanje alela, poziciju alelnih varijanti kao i kataloški broj komercijalnog eseja koji je korišćen.

Varijanta (MAF) Oznaka eseja	Ciljna sekvenca vezivanja probe [Specifična boja koja obeležava probu] {Lokacija nukleotida na hromozomu 9 u NC_000009.12}
rs10757278 (G) C__11841860_ 10	GTCAGGGTGTGGTCATTCCGGTA[A/G]GCAGCGATGCAGAATC- AAGACAGAG [VIC/FAM] {22124477}
rs518394 (C) C__2618035_ 10	GGGGTCTAGAGCTCAGGGAGGA[G/C]TGTGTATCCCTAATTTA- GACTAATT ^{Rev} [VIC/FAM] {22019673}
rs2275888 (C) C__16087171_ 10	CATGATGTCAGGTCATCCCTTAA[C/T]TGAAGAGGACAGAGGG- GAAAATCTC [VIC/FAM] {21017884}

MAF ređi alel (eng. *minor allele frequency*) odnosi se na ređi alel određene alelne varijante; VIC/FAM fluorescentne boje vezane za alel specifične probe; ^{Rev} aleli se nalaze u reverznoj orijentaciji u odnosu na smer konsenzus DNK lanca u genomu;

Sve RT PCR reakcije sadržale su istu količinu master mixa, DNK i odgovarajućeg eseja. Finalne koncentracije eseja i master mixa u svakoj reakcionoj smeši bile su 1x (po uputstvu proizvođača). Za amplifikaciju je korišćen aparat 7500 RT PCR (Applied Biosystems ,SAD) i SDS Software 1.4.0. kompjuterski program. U tabeli 3.4. prikazani su korišćeni temperaturni uslovi, preporučeni od strane proizvođača za sve TaqMan® eseje.

Tabela 3.4. Temperaturni profil RT PCR reakcija korišćen za detekciju genotipova i nivoa ekspresije informacionih RNK pomoću TaqMan® proba

Broj ciklusa	Faza reakcije	Temperatura (°C)	Vreme trajanja faze (min/sek)
1	“Pre-read run”, skenira se početni nivo fluorescence	60	1
1	Inicijalna denaturacija	95	10
40	Denaturacija,	95	15 sekundi
	hibridizacija amplimera i proba, elongacija	60	1
1	“Post-read run”, skenira nivo fluorescence i poništava početni nivo fluorescence	60	1

3.2.12 Ekstrakcija celokupne RNK iz mononuklearnih ćelija periferne krvi

3.2.12.1 Izdvajanje mononuklearnih ćelija iz pune periferne krvi

Od bolesnika i kontrola uzeto je po 3 ml periferne krvi i ekstrakcija totalne RNK iz mononukleara je obavljena istog dana radi očuvanja kvaliteta i kvantiteta RNK. Uzorci su prikupljeni u vakutanerima sa EDTA kao antikoagulantom i držani na ledu do trenutka ekstrakcije RNK. Iz krvi se centrifugiranjem izdvajaju mononuklearne ćelija (limfociti, monociti). Krv se pažljivo nalije (uz zid epruvete) na medijum za separaciju limfocita (eng. *Lymphocyte separation medium*) koji sadrži fikol. Tokom centrifugiranja

izdvajaju se slojevi od kojih svaki sadrži određeni tip ćelija. Jasno je uočljiv sloj mononuklearnih ćelija između dve faze, donje koja sadrži medijum za separaciju i gornje faze koju čini krvna plazma. Eritrociti su staloženi na dnu epruvete. Procedura omogućava da se izdvoji oko 60% mononuklearnih ćelija iz uzorka krvi. Protokol je preuzet i modifikovan iz Böyum A. (Böyum A., 1968)

Reagensi:

LSM eng. *Lymphocyte Separation Medium*, (PAA-proizvođač)

Fiziološki rastvor (0,9% NaCl) (Hemofarm)

Protokol:

1. Zapremina od 3 ml krvi (pomešane sa EDTA u vakutajneru) razblažena je sa 3 ml fiziološkog rastvora (0,9% NaCl)
2. U epruvetu u kojoj se nalazi 3 ml LSM sipano je razblaženje krvi, lagano uz zid epruvete da nebi došlo do mešanja dve faze.
3. Uzorak je centrifugiran 800 g na sobnoj temperaturi, 20 minuta.
4. Mononuklearne ćelije su vizuelizovane u interfazi. Interfaza je pasterovom pipetom prebačena u drugu epruvetu.
5. Izdvojene mononuklearne ćelije su isprane sa 6 ml fiziološkog rastvora i precipitirane centrifugiranjem pri brzini od 250 g, 10 minuta.

3.2.12.2 Ekstrakcija ukupne RNK iz mononuklearnih ćelija primenom TRI Reagent Solution

Ekstrakcija ukupne RNK korišćenjem TRI Reagent Solution-a uradjena je po protokolu proizođača. Protokol predstavlja modifikovanu metodu ekstrakcije (Chomczynski i Sacchi, 1987).

Reagensi:

Etanol (Zorka Pharma)

Izopropanol (LachNer)

Hloroform (Kemika)

Voda bez ribonukleaza (Ambion®)

TRI Reagent Solution (Ambion®)

Protokol:

1. Precipitiranim mononuklearnim ćelijama dodat je 1 ml TRI Reagent Solution i sadržaj je sipan u tubu zapremine 1,5 ml, u koju su dodavani reagensi u narednim koracima.
2. Smeša je inkubirana 5 minuta na sobnoj temperaturi (dolazi do lize ćelija).
3. Smeši je dodato 200 µl hloroforma.
4. Smeša je snažno promućkana, nakon čega je inkubirana na sobnoj temperaturi 15 minuta.
5. Uzorak je centrifugiran pri 12000 g, 15 min, na 4°C. Vodena (gornja) faza sa rastvorenim RNK preneti je u drugu epruvetu.
6. Dodato 500 µl izopropanola, nakon čega je vorteksovan desetak sekundi i inkubiran 10 minuta na sobnoj temperaturi.
7. Uzorak je centrifugiran pri 12000 g, 8 min, na temperaturi od 4°C. Tokom centrifugiranja, RNK se staložila na dnu tube (vizuelizovana je kao beli talog).
8. Supernatant je odliven i ispran dodavanjem 1 ml 75% etanola (apsolutni etanol je razblažen komercijalno dostupnom vodom bez ribonukleaza). Nakon dodavanja 1 ml 75% etanola pipetom se provuče nekoliko puta talog da bi se bolje isprao.
9. Uzorak je centrifugiran pri 7500 g, 5 min, na 4°C da bi se talog zalepio za dno tube.
10. Pipetom je uklonjen alkohol i RNK je ostavljena da se osuši na vazduhu 10 minuta.
11. Osušena RNK je rastvorena u 25 µl Ambion® vode bez nukleaza, inkubacijom 10 minuta na 60°C.
12. Uzorci ekstrahovane RNK čuvani su na -70°C.

3.2.13 Ekstrakcija ukupne RNK iz tkiva karotidnog plaka

Protokol:

Oko 100 µg tkiva karotidnog aterosklerotskog plaka usitnjeno je tučkom u tečnom azotu u avanu. Usitnjenom tkivu dodat je 1 ml Tri Reagent Solution-a. Uzorak je inkubiran do 15 minuta na sobnoj temperaturi. Potrebno je do deset minuta da je uzorak odleđi pošto je avan ohladjen tečnim azotom. Nakon odmrzavanja uzorak je pipetom prebačen u tubicu od 1,5 ml. Protokol ekstrakcije od ovog koraka je identičan protokolu od koraka 3 ekstrakcije ukupne RNK iz mononuklearnih leukocita periferne krvi, opisanom u poglavlju 3.2.12.1.

3.2.14 Merenje koncentracije i provera kvaliteta ekstrahovanih RNK

Integritet uzoraka ekstrahovane RNK provereni su korišćenjem kita RNA 6000 Nano Kit (Agilent) na aparatu 2100 Bioanalyzer (Agilent). RNK sa dobim kvalitetom imale su jasno uočljive frakcije ukupne ćelijske RNK na elektroforetogramima. RNK uzorci sa zadovoljavajućim integritetom imali su vrednosti parametra RIN (skr. od eng. *RNA Integrity Number*) iznad 4. Koncentracija DNK i RNK ispitivanih uzoraka merena je na aparatu Bio-Spec-Nano (Shimadzu) spektrofotometrijski.

3.2.15 Tretman uzoraka RNK dezoksiribonukleazom I (DNKazaI)

Tretiranje uzoraka DNKazom I uklanja jednolančane i dvolančane molekule DNK.

Reagensi:

Dezoksiribonukleaza I (DNKaza I), *DNaseI* (Fermentas)

10x DNKaza I reakcioni pufer (Fermentas)

EDTA 25mM (Fermentas)

Voda bez ribonukleaza (Ambion®)

Protokol:

Reakcija DNKaznog tretmana rađena je sa 1 µg ukupne RNK. Reakcije su rađene u serijama od po 10 do 15 uzoraka i svaka serija je sadržala po jednu negativnu kontrolu (reakcija u koju je umesto RNK uzorka dodata ista zapremina vode bez ribonukleaza). Zapremina RNK uzorka je preračunata tako da sadrži odgovarajuću količinu RNK. U svaki uzorak su dodati reagensi prikazani u tabeli 3.5.

Tabela 3.5. Reagensi korišćeni za DNKazni tretman.

10x DNKza I reakcioni pufer	1 µl
1 µg RNK	odgovarajuća zapremina koja sadrži 1 µg RNK
DNKaza I (1U/µl)	1 µl
Ambion® voda	do ukupne zapremine reakcione smeše (10 µl)

1. Uzorci su inkubirani 30 minuta na 37°C.
2. Uzorci su prebačeni na led i svakom uzorku je dodavano po 1 µL 25mM EDTA.
3. Uzorci su inkubirani 10 minuta na 65°C.
4. Uzorci su prebačeni led 1 minut, nakon čega su kratko centrifugirani na 200 rpm.

3.2.16 Reverzna transkripcija (RT) uzoraka RNK, nakon tretmana DNKazom I

Reakcija reverzne transkripcije imala je za cilj sintezu jednolančane DNK (cDNK) od molekula RNK. U reakciji RT korišćen je oligo-dT amplimer kojim su selektovane samo iRNK (frakcija RNK koja poseduje poliA rep). Molekuli RNK od interesa za dalju (kvantitativnu) analizu pripadaju frakciji iRNK.

Reagensi:

dNTP mix (10 mM) (Fermentas)

Oligo(dT)18 amplimer (0,5 µg/µl) (Fermentas)

5x pufer reverzna transkriptaze (Fermentas)

RNKazni inhibitor RiboLock (40U/µl) (Fermentas)

Reverzna transkriptaza RevertAid (200 U/µl) (Fermentas)

Voda bez ribonukleaza (Ambion®)

Protokol:

1. Svakom uzorku je dodat jedan mikrolitar oligo(dT) 18 amplimera. Uzorci su potom inkubirani na 70°C 5 min.
2. Uzorci su prebačeni na led, gde im je dodat 5x reakcioni pufer (4µl), 10mM dNTPs (1 µl), ribonukleazni inhibitor (0,5 µl), reverzna transkriptaza (1 µl) i voda bez ribonukleaza (do krajnje zapremine reakcije). Sve pomenute komponente su prethodno izmešane i dodata je odgovarajuća količina mešavine svakom uzorku da bi se ubrzao proces. Krajnja zapremina reakcije iznosila je 20 µl.
3. Uzorci su inkubirani na 50°C 30 minuta.
4. Reakcija je zaustavljena zagrevanjem na 85°C 5 min, a zatim hlađenjem na ledu.
5. Dobijena cDNK čuvana je na -20°C.

3.2.17 Određivanje nivoa iRNK gena *CDKN2B*, *HACD4* i *FOCAD* metodom kvantitativnog PCR u realnom vremenu (eng. *real-time PCR*)

Za određivanje nivoa iRNK gena *CDKN2B*, *HACD4* i *FOCAD* korišćena je metoda relativne ekspresije kojom je određena razlika u nivou cDNK (prethodno dobijene reverznom transkripcijom ukupne iRNK) između odabranih grupa uzoraka. Pre poređenja, nivo iRNK ispitivanih gena normalizovan je na izmereni nivo endogene kontrole u svakom uzorku. Za određivanje nivoa iRNK svih gena korišćeni su komercijalni *TaqMan*® eseji (*Applied Biosystems*, SAD). *TaqMan*® eseji podrazumevaju korišćenje para amplimera i jednu fluorescentno obeleženu *TaqMan*®

MGB probu. Tokom trajanja reakcije detektovan je porast intenziteta fluorescencije i registrovan je ciklus označen kao “ threshold cycle” (Ct) u trenutku kada umnožavanje cDNK fragmenta udje u eksponencijalnu fazu. Ct vrednost je automatski određivan korišćenjem SDS software (v1.4.0).

Reagensi:

TaqMan® Gene Expression Master Mix (2x) (*Applied Biosystems*, SAD)

TaqMan® Gene Expression Assay (20x) (*Applied Biosystems*, SAD) (eseji za specifične stranskripe)

Voda bez nukleaza: Nuclease-Free Water (*Ambion*®)

Protokol:

Temprturni uslovi reakcije bili su isti kao i za metodu alelske diskriminacije (3.2.11) Količina i naziv komponenti reakcije relativne amplifikacije prikazani su u Tabeli 3.6. Eseji korišćeni u reakcijama relativne kvantifikacije prikazani su u tabeli 3.7. Svi uzorci su analizirani u duplikatu. Reakcija amplifikacije cDNK ciljnog gena i endogene kontrole radjene su istovremeno na istom plejtu da bi se što više smanjile razlike u uslovima reakcije. Za normalizaciju nivoa iRNK ciljnog gena korišćen je transkript gena *CYCLA*, drugog naziva peptidil-prolil izomeraza alfa (PPIA). Gen *CYCLA* stabilno se ekspremira u većini tkiva uključujući i tkivo karotidnog plaka i mononuklearne ćelije.

Tabela 3.6. Komponente koišćene u reakciji kvantitativnog PCR-a.

Komponenta	Zapremina u reakciji (µl)
<i>TaqMan</i> ® Gene Expression Master Mix (2x)	6,25
<i>TaqMan</i> ® Gene Expression Assay (20x)	0,625
cDNK prethodno dobijena reakcijom RT i razblažena u odnosu 1:5)	2,5
Voda bez nukleaza	3,125
Ukupna zapremina reakcije	12,5

Tabela 3.7. Eseji korišćeni za detekciju i kvantifikaciju nivoa iRNK ciljnih gena.

Gen	Esej	NCBI pristupni br. sekvence transkripta	Egzoni (pozicija probe)	Dužina sekvence obuhvaćene amplimerima (bp)
HACD4	Hs00416988_m1	NM_001010915.4	5-6	115
CDKN2B	Hs00793225_m1	NM_004936.3	1-2	140
FOCAD	Hs00215057_m1	NM_017794.4	45-46	64
CYCA (endogena kontrola)	Hs99999904_m1	NM_001300981.1	5-5	98

3.3 Statistička analiza rezultata

Učestalost genotipova i alela određena je metodom prebrojavanja. Hi kvadrat test (χ^2) je korišćen da bi se ispitalo da li je distribucija učestalosti genotipova u skladu sa očekivanim učestalostima po Hardi-Vajnbergovoj ravnoteži. Vrednosti parametara su predstavljene broјčano i procentualno, ili kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom (SD). Razlika u učestalosti alela i genotipova između odgovarajućih grupa ispitana je Pirsonovim χ^2 testom (*Pearson's χ^2 test*). Za testiranje normalnosti distribucije kontinualnih varijabli korišćen je Šapiro Vilc test (*Shapiro-Wilk test*). Za utvrđivanje razlike između srednjih vrednosti kontinualnih varijabli koje imaju normalnu raspodelu korišćen je Studentov t-test (*Student's t-test*) ili Man Vitni (*Mann-Whitney U test*), neparametrijski test za varijable čije vrednosti nisu u normalnoj raspodeli. ANOVA test je korišćen da bi se ispitala razlika između tri ili više grupa koje imaju normalnu distribuciju varijabli. Za poređenje tri ili više grupa koje nisu u normalnoj distribuciji korišćena je analiza rangova pomoću Kruskal-Valis (Kruskal-Wallis) ANOVA testa. Jačina veze između varijabli od interesa ispitana je logističkom regresionom analizom. Mera jačine asocijacije predstavljena je kao odnos šansi OR (eng. *Odds Ratio*), sa intervalom pouzdanosti od 95% ($\pm 95\%$ CI, eng. *Confidence Interval*). Generalizovani logistički model korišćen je da bi se ispitala nezavisnost asocijacije varijabli od intresa. U svim statističkim testovima vrednost $p < 0,05$

smatrana je statistički značajnom. Statistički testovi su urađeni u programu STATISTICA 8.0.

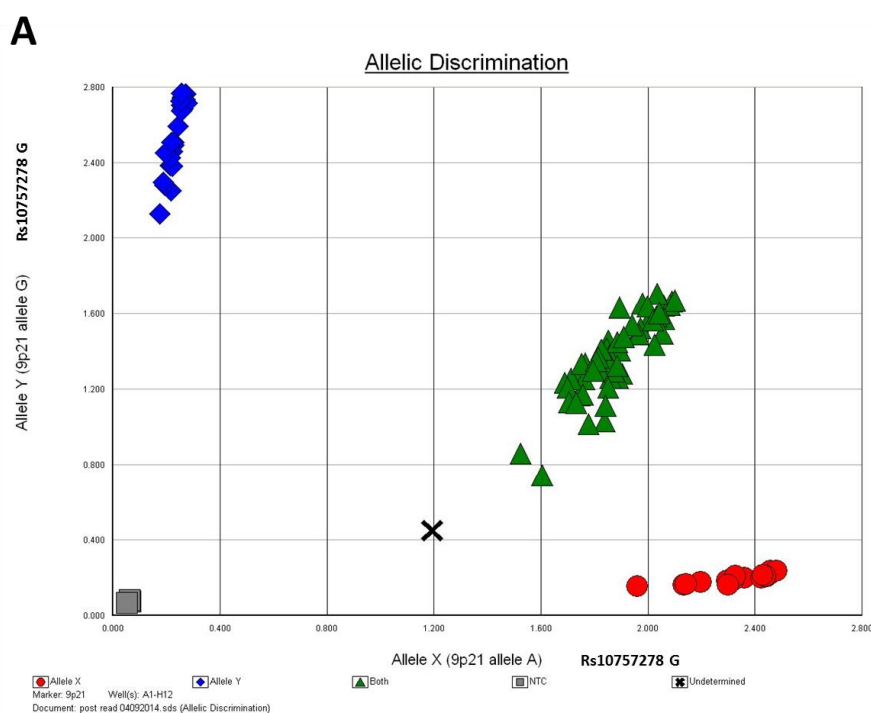
Za analizu asocijacije haplotipova korišćen je kompjuterski program Thesias (Tregouer i Garelle, 2007). Baziran je na modelu maksimizacije verovatnoće (Tregouer i sar., 2002) koji se može primeniti i na analize kvantitativnih i kvalitativnih varijabli i povezan je sa logaritmom maksimalnog stohastičkog predviđanja SEM (eng. *Stochastic Expectation-Maximization*) (Tregouer i sar., 2004). Thesias omogućava izračunavanje i analizu učestalosti haplotipova, asocijaciju haplotipova sa fenotipom kao i efekat haplotipova na fenotip korigovan u odnosu na modifikujuće faktore. Mera asocijacije haplotipova sa fenotipom od interesa izražena je u vidu OR ili korigovanog OR \pm 95% CI. Efekat haplotipova na fenotip od interesa određen je u odnosu na najčešći haplotip.

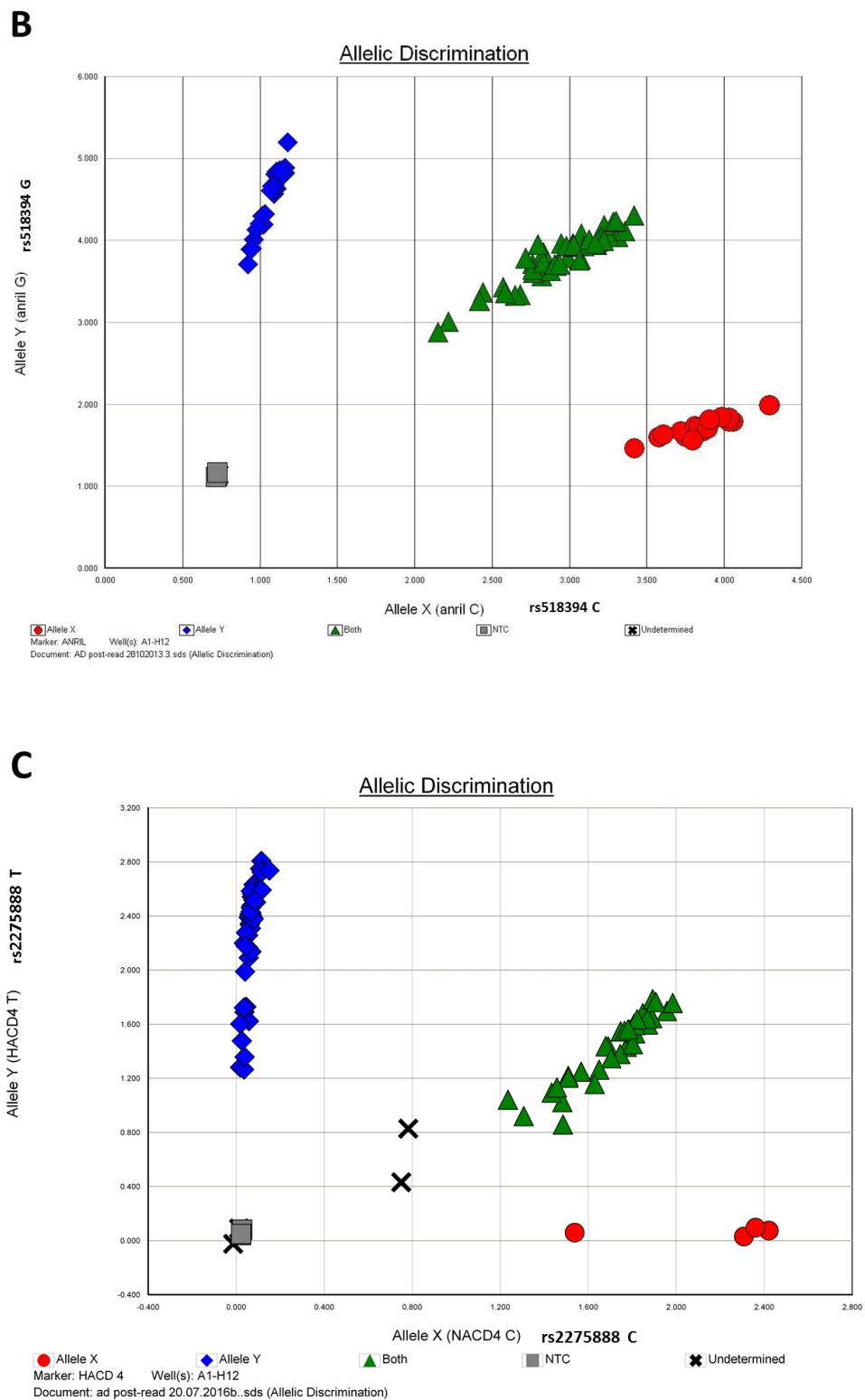
Programski paket REST (*REST Software*, QIAGEN) (Pfaffl i sar., 2002) korišćen je za kvantitativnu analizu transkripcije, putem ekspresije na nivou iRNK ispitivanih gena i endogene kontrole, na osnovu vrednosti Ct (eng. *Cycle threshold*) i efikasnosti PCR reakcije u ispitivanim grupama uzoraka. Testiranje razlike u nivou iRNK između testiranih grupa uzoraka podrazumevala je normalizaciju u odnosu na referentnu endogenu kontrolu. Vrednosti nivoa iRNK gena *CDKN2B*, *HACD4* i *FOCAD* normalizovane su na nivo iRNK za endogenu kontrolu (*CYCLA*). Razlika u nivou relativne ekspresije između ispitivanih grupa predstavljena je kao stepen promene FC (eng. *Fold Change*) sa intervalom pouzdanosti od 95%. FC izražava koliko je puta nivo iRNK u jednoj grupi veći u odnosu na nivo u drugoj grupi. Vrednosti $p < 0.05$ smatrane su statistički značajnim.

4 REZULTATI

4.1 Genotipizacija varijanti rs10757278 i rs518394 u genu *ANRIL*, rs2275888 i rs36212560 u genu *HACD4*

Genotipizacija varijanti rs10757278, rs518394 i rs2275888 urađena je pomoću komercijalnih TaqMan® eseja (*Applied Biosystems*, SAD) i prikazana je u vidu grafikona (slika 5.). Analiziranim uzorcima su određeni genotipovi poređenjem normalizovanih vrednosti intenziteta fluorescencije ispitivanih uzoraka u odnosu na kontrole (uzorci koji nisu sadržali DNK).

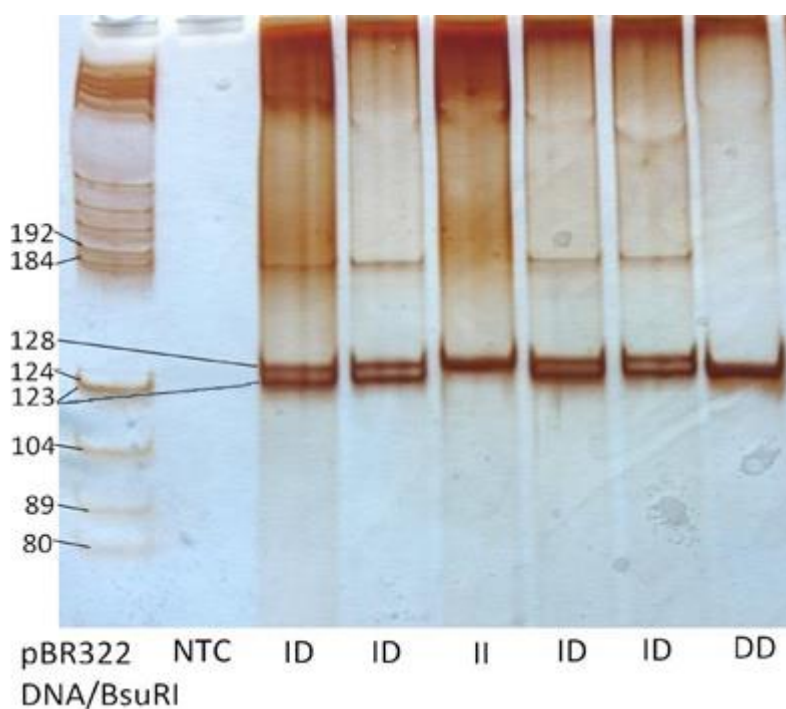




Slika 5. Grafički prikaz genotipizacije varijanti: A) rs10757278 A/G; B) rs518394 C/G; C) rs2275888 T/C, konstruisan pomoću ABI PRISM 7500 SDS Software (*Applied Biosystems*, SAD). Homozigoti za alel kome odgovara Y osa prikazani su plavim

romboidima, heterozigoti zelenim trouglovima i homozigoti za alel kome odgovara X osa crvenim krugovima. Sivi kvadrati predstavljaju kontrolne uzorke (bez DNK). X označava neuspešno genotipizovane uzorke.

Genotipizacija varijante rs36212560 uradjena je pomoću PCR metode. Fragmenti dobijeni PCR amplifikacijom segmenata molekula DNK (koji uokviruju 5 bp inserciono–delecionu gensku varijantu) analizirani su elektroforezom u 1,8% nedenaturišućem poliakrilamidnom gelu (Slika 6.). Genotip je određen na osnovu migracije traka detektovanih na gelu.



Slika 6. Prikaz rezultata genotipizacije varijante rs36212560 na 10% nedenaturišućem poliakrilamidnom gelu. Genotip II prikazan je trakom veličine 128 bp, genotip ID dvema trakama veličine 123 i 128 bp, genotip DD trakom 123 bp. Kod heterozigotnih uzoraka javljala se jedna nespecifična traka na visini od približno 180 bp.

4.2 Asocijacija genetičkih varijanti sa kliničkim i biohemijskim faktorima rizika za nastanak ateroskleroze

Asocijacija genetičkih varijanti sa kliničkim i biohemijskim faktorima rizika, ispitana je u grupi kontrola kao i u grupama bolesnika sa KP i infarktom miokarda. Nije ustanovljena statistički značajna asocijacija ispitivanih varijanti. Pored osnovnih biohemijskih parametara koji su ispitani u obe grupe bolesnika, kod bolesnika sa karotidnim plakom ispitana je asocijacija varijanti sa faktorima inflamacije i hemostaze, kao i relevantnim kliničkim parametrima koronarne bolesti (Moždani udar, Tranzitorni Ishemijski Napad (TIA), simptomatska bolest). Rezultati su prikazani u priložima 1-4.

4.3 Asocijacija analiziranih genetičkih varijanti sa nastankom karotidnog plaka

U okviru studije analizirane su osnovne karakteristike učesnika. Relevantni faktori rizika uključeni su u statističku analizu rezultata da bi se odredio nezavisni rizik koji nose testirane genske varijante. Vrednosti standardnih demografskih i biohemijskih parametara kao i statistički značajna razlika između kontrola i bolesnika prikazana je u tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Osnovne karakteristike kontrola i bolesnika sa karotidnim plakom u celokupnoj i grupama podeljenim po polu.

Cela grupa	Kontrole, n = 317	Bolesnici, n = 486	p
Godine	59,1 ± 14,3	66,1 ± 8,0	<0,01 [#]
Pol Ž/M, n (%)	45,11/54,89	40,74/59,26	ns
BMI, kg/m ²	25,1 ± 3,7	26,6 ± 3,3	<0,01 [#]
TH, mmol/L	5,61 ± 1,30	5,74 ± 1,27	ns [#]
LDL, mmol/L	3,31 ± 1,23	3,69 ± 1,08	<0,01 [#]
HDL, mmol/L	1,47 ± 0,86	1,21 ± 0,35	<0,01 [#]
TG, mmol/L	1,58 ± 1,09	1,89 ± 1,26	<0,01 [#]
Hipertenzija, %	34,35	86,13	<0,01 [#]
Pušači, %	55,04	72,25	<0,01 [#]

Dijabetes, %	0	22,25	N/A
Žene	Kontrole, n = 143	Bolesnici, n = 198	p
Godine	56,7 ± 14,8	65,0 ± 7,9	<0,01 [#]
BMI, kg/m ²	24,2 ± 4,1	27,3 ± 3,3	<0,01 [#]
TH, mmol/L	5,69 ± 1,42	5,95 ± 1,18	0,024 [#]
LDL, mmol/L	1,40 ± 0,90	1,83 ± 0,84	<0,01 [#]
HDL, mmol/L	1,55 ± 0,52	1,3 ± 0,37	<0,01 [#]
TG, mmol/L	3,34 ± 1,34	3,82 ± 1,05	0,01 [#]
Hipertenzija, %	25,38	82,89	<0,01 [#]
Pušači, %	50,77	64,47	ns
Dijabetes, %	0	23,68	N/A
Muškarci	Kontrole, n = 174	Bolesnici, n = 288	p
Godine, years	61,02 ± 13,5	66,7 ± 8,0	<0,01 [#]
BMI, kg/m ²	26,1 ± 2,9	26,1 ± 3,2	ns
TH, mmol/L	5,53 ± 1,78	5,60 ± 1,30	ns
LDL, mmol/L	3,27 ± 1,09	3,59 ± 1,09	0,01 [#]
HDL, mmol/L	1,39 ± 1,11	1,15 ± 0,31	<0,01 [#]
TG, mmol/L	1,78 ± 1,25	1,92 ± 1,47	0,04 [#]
Hipertenzija, %	42,41	88,26	<0,01 [#]
Pušači, %	59,38	77,39	<0,01 [#]
Dijabetes, %	0	21,30	N/A

Vrednosti parametara su predstavljene kao srednja vrednost ±SD za godine, BMI, TH, LDL, HDL, TG; [#]Mann–Whitney *U* testom su upoređene razlike u vrednostima varijabli, koje nemaju normalnu raspodelu, između kontrola i bolesnika; Pirsonovim χ^2 testom su testirane vrednosti kategorijskih varijabli; vrednosti $p < 0,05$ smatraju se statistički značajnim. ns nije značajno; N/A ne može se izračunati.

U svim testiranim grupama nije ustanovljeno statistički značajno odstupanje od Hardy-Vajnbergove ravnoteže. Učestalosti genotipova i alela varijante rs10757278 (*ANRIL*) kod bolesnika sa KP i zdravih kontrola prikazane su u tabeli 4.2. Učestalosti

genotipova i alela varijante rs518394 (*ANRIL*) u celokupnom uzorku i gupama podeljenim po polu prikazane su u tabeli 4.3. Rezultati pokazuju da nema statistički značajne razlike u distribuciji učestalosti genotipova i alela između kontrola i bolesnika u celokupnoj grupi i grupi muškaraca za obe varijante. Po recesivnom modelu nasleđivanja za varijantu rs10757278, žene nosioci GG genotipa imale su povišen rizik za nastanak karotidnog plaka (OR = 1,83; 95% CI = 1,12 – 2,97; p = 0,015). OR korigovan na godine, BMI, TH, LDL, HDL, TG i prisustvo hipertenzije iznosi 2,42 uz 95% CI = 1,20 – 4,90 i p = 0,013 (Tabela 4.4.). U grupi žena, alel G bio je značajno učestaliji kod bolesnika (p = 0,03; OR = 1,40; 95% CI = 1,03 – 1,90).

Učestalosti genotipova i alela varijante rs2275888 (*HACD4*) kod bolesnika sa KP i zdravih kontrola prikazane su u tabeli 4.5. Uočen je statistički trend u asocijaciji sa nastankom KP po kodominantnom (p = 0,07) i recesivnom modelu nasleđivanja (p = 0,05) u grupi muškaraca (Tabela 4.5.). Asocijacija nije bila statistički značajna nakon korekcije na faktore rizika.

Učestalosti genotipova i alela varijante rs36212560 (*HACD4*) kod bolesnika sa KP i zdravih kontrola prikazane su u tabeli 4.6. Uočen je statistički trend u asocijaciji genetičke varijante rs36212560 (*HACD4*) sa nastankom KP u celokupnom uzorku (p = 0,08) i statistički značajna asocijacija u grupi muškaraca (p = 0,02). Po dominantnom modelu nasleđivanja detektovana je značajna asocijacija u celoj grupi (OR = 1,38; 95% CI = 1,03 – 1,85; p = 0,03) ali nakon korekcije na faktore rizika rezultat više nije bio statistički značajan (OR = 1,33; 95% CI = 0,95 – 1,91; p = 0,08). Rezultat je bio korigovan na godine, BMI, TH, Tg, HDL, LDL, status hipertenzije i pušenja. Značajna asocijacija je ustanovljena u grupi muškaraca. Ispitana je interakcija pola sa genotipom, koja nije bila statistički značajna za nastanak karotidnog plaka (p = 0,19). Statistički najznačajnija asocijacija ustanovljena je za dominantni model nasleđivanja, po kome su muškarci, nosioci alela D, imali veći rizik za nastanak KP (korigovani OR = 1,76; 95% CI = 1,11–2,78; p = 0,015) (Tabela 4.7.). Rezultat je korigovan na godine, BMI, TH, TG, LDL, HDL, status hipertenzije i pušenja. Alel D bio je statistički značajno češći kod bolesnika u odnosu na kontrole u celoj grupi (OR = 1,27; CI = 1,01 – 1,61; p = 0,036) i u grupi muškaraca (OR = 1,42; 1,03 – 1,94; p = 0,028; Tabela 4.7.).

Tabela 4.2. Asocijacija varijante rs10757278 u genu *ANRIL* sa nastankom karotidnog plaka.

rs10757278	Cela grupa		p (χ^2)	Muškarci		p (χ^2)	Žene		p (χ^2)
	Kontrole (%) n = 317	Bolesnici (%) n = 486		Kontrole (%) n = 174	Bolesnici (%) n = 288		Kontrole (%) n = 143	Bolesnici (%) n = 198	
Genetički Model									
Kodominantni									
AA	73 (23,03)	114 (23,46)		40 (22,99)	77 (26,74)		33(23,08)	37(18,69)	
AG	154 (48,58)	218 (44,86)	0,52	77 (44,25)	127 (44,1)	0,58	77(53,85)	91(45,96)	0,05
GG	90 (28,39)	154 (31,69)		57 (32,76)	84 (29,17)		33 (23,08)	70 (35,35)	
Recesivni									
AA+AG	227 (71,61)	332 (68,31)	0,32	117 (67,24)	204 (70,83)	0,41	110 (76,92)	128 (64,65)	0,015
GG	90 (28,39)	154 (31,69)		57 (32,76)	84 (29,17)		33 (23,08)	70 (35,35)	
Aleli A/G	0,47/0,53	0,46/0,54	0,71	0,45/0,55	0,48/0,52	0,27	0,50/0,50	0,42/0,58	0,03

p (χ^2) Pirsonov Hi kvadrat test**Tabela 4.3.** Asocijacija varijante rs518394 u genu *ANRIL* sa nastankom karotidnog plaka.

rs518394	Cela grupa		p (χ^2)	Muškarci		p (χ^2)	Žene		p (χ^2)
	Kontrole (%) n = 317	Bolesnici (%) n = 486		Kontrole (%) n = 174	Bolesnici (%) n = 288		Kontrole (%) n = 143	Bolesnici (%) n = 198	
Genetički Model									
Kodominantni									
CC	53(16,79)	69(14,15)		26(15,13)	46(15,83)		27(18,75)	23(11,63)	
CG	146(46,07)	234(48,26)	0,62	86(49,34)	133(46,33)	0,83	60(42,19)	101(51,16)	0,15
GG	118(37,14)	183(37,59)		62(35,53)	109(37,84)		56(39,06)	74(37,21)	
Aleli C/G	0,40/0,60	0,38/0,61	0,55	0,40/0,60	0,39/0,61	0,85	0,40/0,60	0,37/0,63	0,46

p (χ^2) Pirsonov Hi kvadrat test

Tabela 4.4. Korigovani odnos šansi varijante rs10757278 (*ANRIL*) i kliničkih faktora rizika za nastanak KP u multivarijantnom regresionom modelu, kod žena.

Faktori	β	\pm SE (β)	OR^a (\pm 95% CI)	p
AA + AG vs. GG (rs10757278)	0.89	0.36	2.42 (1.20–4.90)	0.013 ^b
Godine, years	0.08	0.01	1.08 (1.06–1.12)	<0.01
BMI, kg/m ²	0.29	0.15	1.34 (1.00–1.80)	0.04
TH, mmol/L	0.16	0.10	1.17 (0.97–1.42)	ns
LDL, mmol/L	0.07	0.16	1.07 (0.79–1.46)	ns
HDL, mmol/L	-0.83	0.49	0.44 (0.16–1.15)	ns
TG, mmol/L	0.11	0.21	1.12 (0.74–1.69)	ns
Hipertenzija	2.12	0.31	8.32 (4.51–15.33)	<0.01

OR odnos šanse; CI interval poverenja; β -beta; SE standardna greška; ns nije značajno; a OR korigovan na sve faktore uključene u multivarijantnu regresionu analizu

Tabela 4.5. Asocijacija varijante rs2275888 u genu *HACD4* sa nastankom karotidnog plaka.

rs2275888	Cela grupa		p (χ^2)	Muškarci		p (χ^2)	Žene		p (χ^2)
	Kontrole (%) n = 303	Bolesnici (%) n = 477		Kontrole (%) n = 167	Bolesnici (%) n = 283		Kontrole (%) n = 136	Bolesnici (%) n = 194	
Genetički Model									
Kodominantni									
TT	160 (52,74)	258 (54,14)		89 (53,13)	156 (55,05)		71 (52,72)	102 (52,72)	
TC	118 (39,04)	177 (37,15)	0,87	70 (41,88)	98 (34,49)	0,07	48 (35,61)	79 (41,30)	0,13
CC	25 (8,22)	42 (8,70)		8 (5)	29 (10,45)		17 (12,12)	13 (5,98)	
Recesivni									
TT+TC	278 (91,78)	428 (91,29)	0,81	159 (95)	254 (89,55)	0,05	119 (87,88)	94 (50,02)	0,054
CC	25 (8,22)	42 (8,70)		8 (5)	29 (10,45)		17 (12,12)	13 (5,98)	
Aleli T/C	0,72/0,28	0,73/0,27	0,85	0,74/0,26	0,72/0,28	0,67	0,70/0,30	0,73/0,27	0,49

p (χ^2) Pirsonov Hi kvadrat test

Tabela 4.6. Asocijacija varijante rs36212560 u genu *HACD4* sa nastankom karotidnog plaka.

rs36212560	Cela grupa		p (χ^2)	Muškarci		p (χ^2)	Žene		p (χ^2)
	Kontrole (%) n = 303	Bolesnici (%) n = 477		Kontrole (%) n = 167	Bolesnici (%) n = 283		Kontrole (%) n = 136	Bolesnici (%) n = 194	
Genetički Model									
Kodominantni									
II	174 (59,43)	235 (49,27)		103 (61,68)	138 (48,76)		71 (52,21)	97 (50)	
ID	106 (34,98)	198 (41,51)	0,08	52 (31,14)	123 (43,46)	0,02	54 (39,71)	75 (38,66)	0,62
DD	23 (7,59)	44 (9,22)		12 (7,19)	22 (7,77)		11 (8,09)	22 (11,34)	
Dominantni									
II	174 (59,43)	235 (49,27)	0,026	103 (61,68)	138 (48,76)	0,008	71 (52,21)	97 (50)	0,69
ID + DD	129 (42,57)	242 (50,73)		64 (38,32)	145 (51,24)		65 (47,79)	97 (50)	
Aleli I/D	0,75/0,25	0,70/0,30	0,04	0,77/0,23	0,70/0,30	0,03	0,72/0,28	0,69/0,31	0,45

Tabela 4.7. Asocijacija varijante rs36212560 sa rizikom za nastanak karotidnog plaka, kod muškaraca.

rs36212560						
Genetički model	OR	95% CI	p	OR*	95% CI	p
Kodominantni						
II	ref.			ref.		
ID	1,76	1,16–2,67	0,007	1,81	1,12–2,93	0,014
DD	1,36	0,64–2,91	0,41	1,56	0,64–3,7	0,31
Dominantni						
II						
ID + DD	1,69	1,14–2,49	0,008	1,76	1,11–2,78	0,015
Aleli I/D	1,42	1,03–1,94	0,028	/	/	/

OR odnos šansi; CI interval poverenja; ref. referentni genotip; *rezultat je korigovan na godine, BMI, TH, HDL, LDL, status hipertenzije i pušenja.

4.3.1 Asocijacija haplotipova varijanti rs36212560 i rs2275888 u genu *HACD4* sa nastankom karotidnog plaka

Zbog udaljenosti od 456 bp genske varijante rs2275888 T>C od rs36212560 I>D, u genu *HACD4*, analizirane su pojedinačno i u haplotipu. Haplotip IT je zbog najveće učestalosti označen kao referentan. DT haplotip bio je značajno asociran sa nastankom karotidnog plaka. Korigovani OR iznosi 1,35 uz 95% CI = 1,1 – 1,80 i p = 0,037 (Tabela 4.8.). Nakon analize u grupama podeljenim po polu utvrđeno je da je haplotip DT je statistički značajno asociran sa povećanim rizikom za nastanak karotidnog plaka u grupi muškaraca (korigovani OR = 1,64; 95% CI = 1,12 – 2,42; p = 0,011) (Tabela 4.8.). Rezultat je korigovan na godine, BMI, TH, LDL, HDL, Tg, status hipertenzije i pušenja.

Tabela 4.8. Asocijacija haplotipova varijanti rs36212560 i 2275888 sa rizikom za nastanak karotidnog plaka.

Haplotip	Učestalost haplotipa, (%)		Efekat haplotipa na nastanak KP			
	Kontrole n=303	Bolesnici n=477	OR (\pm 95% CI)	p	OR* (\pm 95% CI)	p
Cela grupa						
IT	0,477	0,429	ref.		ref.	
IC	0,275	0,268	1,07 (0,83–1,37)	0,58	1,10 (0,83–1,46)	0,49
DT	0,244	0,297	1,33 (1,04–1,71)	0,022 [§]	1,35 (1,01–1,80)	0,037
DC	0,003	0,004	NA		NA	
Muškarci	n=167	n=283				
IT	0,521	0,429	ref.		ref.	
IC	0,256	0,276	1,29 (0,91–1,83)	0,15	1,22 (0,83–1,8)	0,30
DT	0,218	0,292	1,61 (1,16–2,26)	0,005	1,64 (1,12–2,42)	0,011
DC	0,005	0,003	NA		NA	
Žene	n=136	n=194				
IT	0,425	0,430	ref.		ref.	
IC	0,298	0,259	0,86 (0,59–1,24)	0,41	1,17 (0,72–1,88)	0,51
DT	0,275	0,307	1,09 (0,75–1,59)	0,62	1,06 (0,63–1,77)	0,81
DC	0,001	0,004	NA		NA	

OR Odnos Šansi; CI Interval Poverenja; NA nije računat efekat haplotipa zbog malog uzorka; ref. referentni haplotip; * rezultat je korigovan na godine, BMI, TH, LDL, HDL, Tg, status hipertenzije i pušenja.

4.4 Asocijacija genetičkih varijanti sa kliničkim komplikacijama karotidne aterosklerotske bolesti

4.4.1 Asocijacija varijanti u genima *ANRIL* i *HACD4* sa fenotipom karotidnog plaka (ehogeni i eholucentni)

Genske varijante rs518394 u genu *ANRIL*, rs2275888 i rs36212560 u genu *HACD4* nisu bile statistički značajno asociirane sa fenotipom karotidnog plaka (ehogeni i eholucentni). Testiranje je urađeno u grupama podjeljenim po polu i po genetičkim modelima nasleđivanja. Kod bolesnika sa KP, po kodominantnom modelu nasleđivanja, nije ustanovljena značajna asocijacija genske varijante rs10757278 sa fenotipom plaka u celokupnoj, kao i u grupama podjeljenim po polu. Kod muškaraca je ustanovljen trend značajnosti po kodominantnom modelu nasleđivanja ($p = 0,078$) i statistički značajna asocijacija po dominantnom modelu nasleđivanja ($p = 0,016$) (Tabela 4.9.). Muškarci nosioci alela G po dominantnom modelu nasleđivanja imali su korigovani OR = 2,4 uz 95% CI = 1,17 – 4,94 i $p = 0,02$ za nastanak komplikovanog plaka u grupi bolesnika sa KP (Tabela 4.10.). Nije ustanovljena statistički značajna asocijacija u grupi žena.

Tabela 4.9. Distribucija učestalosti genotipova varijante rs10757278 u odnosu na fenotip karotidnog aterosklerotskog plaka (ehogeni i eholucentni) kod bolesnika sa karotidnim plakom, u grupi muškaraca

Genetička varijanta	Genetički Model	Ehogeni KP n=143(%)	Eholucentni KP n=73(%)	p (χ^2)	
rs10757278	Kodominantni				
	AA	48(33,57)	13(17,81)	0,078	
	AG	55(38,46)	37(50,68)		
	GG	40(27,97)	23(31,51)		
	Dominantni				
	AA	48(33,57)	13(17,81)	0,016	
	AG + GG	95(66,43)	60(82,19)		
Aleli A/G	0,53/0,47	0,43/0,57	0,06		

KP karotidni plak; $p(\chi^2)$ Pirsonov χ^2 test

Tabela 4.10. Asocijacija varijante rs10757278 sa rizikom za nastanak eholucentnog karotidnog plaka kod muških bolesnika sa karotidnim plakom.

Genetička varijanta	Genetički Model	OR	95% CI	p	OR*	95% CI	p
rs10757278							
	kodominantni						
	AA	ref.			ref.		
	AG	1,42	0,97–2,08	0,07	1,47	0,94–2,32	0,09
	GG	2,02	0,94–4,33		2,18	0,88–5,38	
	dominantni						
	AA	ref.			ref.		
	AG+GG	2,33	1,16–4,68	0,02	2,4	1,17–4,94	0,02
	Aleli A/G	1,47	0,98–2,2	0,06	/	/	/

OR – odnos šansi; 95% CI interval poverenja; ref. referentni genotip; *rezultat je korigovan na godine, BMI, TH, HDL, LDL, status hipertenzije i pušenja

4.4.2 Asocijacija analiziranih genetičkih varijanti sa simptomatskom karotidnom bolešću

Varijante rs10757278 i rs518394 u genu *ANRIL* nisu bile statistički značajno asociirane sa simptomatskom karotidnom bolešću u grupi bolesnika sa karotidnim plakom. Ustanovljena je statistički značajna asocijacija haplotipa varijanti rs36212560 i rs2275888 u genu *HACD4*. Haplotip IC pokazivao je protektivan efekat kada je u pitanju simptomatska bolest (korigovani OR = 0,63; CI = 0,44 – 0,92; p = 0,016) (Tabela 4.11.). U grupama podeljenim po polu, haplotip IC pokazao je protektivan efekat kod muškaraca (korigovani OR = 0,50; CI = 0,31 – 0,81; p = 0,005). Rezultat je korigovan na starost, BMI, HDL, LDL, Tg, status hipertenzije i pušenja (Tabela 4.11.).

Table 4.11. Asocijacija haplotipova varijanti rs36212560 i rs2275888 u genu *HACD4* sa simptomatskom karotidnom bolešću, kod bolesnika sa karotidnim plakom.

Haplotip	Učestalost (%)		Efekat haplotipa			
	Kontrole n=224	Bolesnici n=145	OR (\pm 95% CI)	p	OR (\pm 95% CI)*	p
Cela grupa						
IT	0,937	0,462	ref.		ref.	
IC	0,295	0,214	0,63 (0,44–0,92)	0,016	0,63 (0,44–0,92)	0,016
DT	0,302	0,316	0,91 (0,63–1,30)	0,61	0,90 (0,62–1,29)	0,56
DC	0,004	0,006	NA		NA	
Muškarci	n=138	n=87				
IT	0,369	0,502	ref.		ref.	
IC	0,306	0,198	0,51 (0,32–0,82)	0,006	0,50 (0,31–0,81)	0,005
DT	0,318	0,296	0,70 (0,42–1,14)	0,15	0,69 (0,42–1,12)	0,13
DC	0,005	0,002	NA		NA	
Žene	n=86	n=58				
IT	0,442	0,404	ref.		ref.	
IC	0,276	0,345	0,89 (0,49–1,63)	0,73	0,92 (0,50–1,70)	0,80
DT	0,276	0,238	1,31 (0,75–2,29)	0,33	1,29 (0,74–2,25)	0,36
DC	0,004	0,011	NA		NA	

NA nije računat efekat haplotipa zbog malog uzorka; ref. referentni haplotip; *rezultat je korigovan na godine, BMI, TH, LDL, HDL, Tg, status hipertenzije i pušenja

4.4.3 Asocijacija analiziranih genetičkih varijanti sa rizikom za nastanak ulceracije karotidnog plaka

Varijante rs10757278 i rs518394 u genu *ANRIL* nisu bile statistički značajno asociirane sa ulceracijom karotidnog plaka. Ustanovljena je statistički značajna asocijacija sa haplotipovima varijanti rs36212560 i rs2275888 gena *HACD4*. U odnosu na referentni haplotip IT protektivni efekat na nastanak ulceracije imao je haplotip IC (korigovani OR = 0,59; CI = 0,36 – 0,98; p = 0,044) i haplotip DT (korigovani OR = 0,54; CI = 0,31 – 0,95; p = 0,032) (Tabela 4.12.). Rezultat je bio korigovan na godine, BMI, LDL, HDL, TG, status pušenja i hipertenzije.

Tabela 4.12. Asocijacija haplotipova varijanti rs26212560 i rs2275888 sa rizikom za nastanak ulceracije na karotidnom plaku

Haplotip	Učestalost (%)	haplotipova	Efekat haplotipa							
			Bez ulc. n=329	Ulceracija n=51	OR (CI)	(± 95% CI)	p	OR* (CI)	(± 95% CI)	p
Cela grupa										
IT	0,401	0,552	ref.			ref.				
IC	0,277	0,212	0,54 (0,31–0,94)		0,032	0,59(0,36–0,98)			0,044	
DT	0,318	0,233	0,59 (0,36–0,96)		0,033	0,54(0,31–0,95)			0,032	
DC	0,002	0,001	NA			NA				
Muškarci	n=194	n=37								
IT	0,404	0,527	ref.			ref.				
IC	0,278	0,194	0,055(0,32–1,01)		0,055	0,59(0,33–1,05)			0,07	
DT	0,316	0,277	0,67 (0,35–1,27)		0,22 [§]	0,66(0,34–1,28)			0,22	
DC	/	/	NA			NA				
Žene	n=13	n=14								
IT	0,396	0,620	ref.			ref.				
IC	0,276	0,264	0,66 (0,25–1,72)		0,40	0,66(0,25–1,76)			0,41	
DT	0,321	0,110	0,24 (0,05–1,03)		0,056	0,24(0,05–1,16)			0,076	
DC	0,006	0,005	NA			NA				

NA nije računat efekat haplotipa zbog malog uzorka; ref. referentni haplotip; *rezultat je korigovan na godine, godine, BMI, TH, LDL, HDL, status hipertenzije i pušenja

4.5 Asocijacija analiziranih genetičkih varijanti sa nastankom infarkta miokarda

U tabeli 4.13. prikazane su osnovne karakteristike kontrola i bolesnika sa infarktom miokarda. Tabela prikazuje i grupe razdvojene po polu.

Tabela 4.13. Osnovne karakteristike kontrola i bolesnika sa infarktom miokarda u celokupnoj i grupama podeljenim po polu.

Cela grupa	Kontrole, n = 317	Bolesnici, n = 520	p
Godine	59,12 ± 14,32	58,48 ± 11,40	ns [#]
Pol Ž/M, n (%)	45,11/54,89	29,53/70,47	<0,01 [#]
BMI, kg/m ²	25,1 ± 3,7	27,27 ± 4,01	<0,01 [#]
TH, mmol/L	5,61 ± 1,30	5,58 ± 1,15	ns
LDL, mmol/L	3,31 ± 1,23	3,65 ± 1,03	<0,01 [#]
HDL, mmol/L	1,47 ± 0,86	1,1 ± 0,33	<0,01 [#]
TG, mmol/L	1,58 ± 1,09	1,87 ± 1,23	<0,01 [#]
Hipertenzija, %	34,35	64,48	<0,01 [#]
Pušači, %	55,04	69,12	0,002 [#]
Dijabetes, %	0	21,25	N/A
Žene	Kontrole, n = 143	Bolesnici, n = 157	p
Godine, years	56,7 ± 14,8	63,23 ± 10,97	ns [#]
BMI, kg/m ²	24,2 ± 4,1	27,59 ± 3,8	<0,01 [#]
TH, mmol/L	5,69 ± 1,42	5,79 ± 1,19	0,22 [#]
LDL, mmol/L	3,34 ± 1,34	3,79 ± 1,06	0,01 [#]
HDL, mmol/L	1,55 ± 0,52	1,23 ± 0,33	<0,01 [#]
Tg, mmol/L	1,4 ± 0,9	1,71 ± 1,15	0,02 [#]
Hipertenzija, %	25,38	77,30	<0,01 [#]
Pušači, %	50,77	58,04	ns
Dijabetes, %	0	24,11	N/A

Muškarci	Kontrole, n = 174	Bolesnici, n = 363	p
Godine, years	61,02 ± 13,5	56,45 ± 10,99	ns [#]
BMI, kg/m ²	26,1 ± 2,9	26,5 ± 4,43	<0,01 [#]
TH, mmol/L	5,53 ± 1,78	5,50 ± 1,12	ns
LDL, mmol/L	3,27 ± 1,09	3,59 ± 1,01	<0,01 [#]
HDL, mmol/L	1,39 ± 1,11	1,04 ± 0,32	<0,01 [#]
Tg, mmol/L	1,78 ± 1,25	1,93 ± 1,25	ns
Hipertenzija, %	42,41	59,25	<0,01 [#]
Pušači, %	59,38	73,70	<0,01 [#]
Dijabetes, %	0	20,06	N/A

Vrednosti parametara su predstavljene kao srednja vrednost ±SD za godine, BMI, TH, LDL, HDL, Tg; [#]*Mann–Whitney U* testom su upoređene razlike u vrednostima varijabli, koje nemaju normalnu raspodelu, između kontrola i bolesnika; χ^2 testom su testirane vrednosti kategorijskih varijabli; vrednosti p < 0,05 smatraju se statistički značajnim, ns nije značajno; N/A ne može se izračunati

U testiranim grupama nije bilo statistički značajnog odstupanja od Hardy–Vajnbergove ravnoteže. Distribucija genotipova i alela varijante rs10757278 (*ANRIL*) kod bolesnika sa IM i kontrola u celokupnom uzorku, kao i u grupama podeljenim po polu prikazana je u tabeli 4.14. Nije ustanovljena statistički značajna asocijacija genske varijante rs10757278 sa nastankom IM (Tabela 4.14.). Statistički značajna asocijacija nije ustanovljena ni testiranjem po genetičkim modelima nasleđivanja. U tabeli 4.14. je prikazan i recesivni genetički model nasleđivanja.

Distribucija genotipova i alela genske varijante rs518394 kod kontrola i bolesnika sa IM u celokupnom uzorku, kao i u grupama podeljenim po polu prikazana je u tabeli 4.15. Nije ustanovljena statistički značajna asocijacija genetičke varijante rs518394 (*ANRIL*) sa nastankom IM (4.15.).

Distribucija genotipova i alela varijante rs2275888 (*HACD4*) kod bolesnika sa IM i kontrola u celokupnom uzorku, kao i u grupama podeljenim po polu prikazana je u tabeli 4.16. Nije ustanovljena statistički značajna asocijacija varijante rs2275888 (*HACD4*) sa nastankom IM u celoj grupi i grupi žena (Tabela 4.16.). Detektovana je

statistički značajna asocijacija u grupi muškaraca po aditivnom modelu nasleđivanja ($p = 0,034$) (Tabela 4.16.). Rezultat nije bio statistički značajan nakon korekcije na faktore rizika. Testiranje je izvršeno i po dominantnom i recesivnom genetičkom modelu nasleđivanja gde nije ustanovljena statistički značajna asocijacija.

Distribucija genotipova i alela varijante rs36212560 (*HACD4*) kod bolesnika sa infarktom miokarda i kontrola u celokupnom uzorku i grupama podeljenih po polu prikazane su u tabeli 4.17. Uočena je statistički značajna asocijacija genetičke varijante u celokupnoj grupi i grupi muškaraca (Tabela 4.17.). Interakcija pola sa genotipom nije bila statistički značajna za nastanak bolesti ($p = 0,14$). Rezultat kod bolesnika sa IM replicirao je asocijaciju dobijenu kod bolesnika sa KP. U celokupnom uzorku, po dominantnom modelu nasleđivanja nosioci alela D imali su korigovani OR = 1,42 uz 95% CI = 1,05 – 1,91 i $p = 0,02$. Rezultat je bio korigovan na godine, pol, TH, HDL, LDL, Tg, status hipertenzije i pušenja. I ovde, kao i kod bolesnika sa KP, asocijacija je poticala od razlika u distribuciji učestalosti genotipova u grupi muškaraca. U tabeli 4.18. prikazani su odnosi šansi za asocijaciju rs36212560 (*HACD4*) sa IM po genskim modelima nasleđivanja u grupi muškaraca. Po dominantnom modelu nasleđivanja nosioci alela D imaju korigovani OR = 2,01 uz CI = 1,27 – 3,19 i $p = 0,013$. Rezultat je bio korigovan na godine, BMI, LDL, HDL, Tg, status hipertenzije, pušenja i rs2275888 (*HACD4*). U grupi muškaraca, alel D je statistički značajno učestaliji kod bolesnika ($p = 0,003$; OR = 1,62; 95% CI = 1,17 – 2,2) (Tabela 4.18.).

Tabela 4.14. Asocijacija varijante rs10757278 u genu *ANRIL* sa nastankom infarkta miokarda.

rs10757278	Cela grupa		p (χ^2)	Muškarci		p (χ^2)	Žene		p (χ^2)
	Kontrole (%) n = 317	Bolesnici (%) n = 507		Kontrole (%) n = 174	Bolesnici (%) n = 359		Kontrole (%) n = 143	Bolesnici (%) n = 150	
Genetički model									
Kodominantni									
AA	73 (23,0)	108 (21,3)		40 (23,0)	76 (21,2)		33 (23,1)	32 (21,3)	
AG	154 (48,6)	249 (49,0)	0,81	77 (44,2)	176 (49,2)	0,56	77 (53,8)	70 (46,7)	0,4
GG	90 (28,4)	151 (29,7)		57 (32,8)	106 (29,6)		33 (23,1)	45 (30,0)	
Aleli A/G	47,3/52,7	45,8/54,2	0,53	45,1/54,9	45,8/54,2	0,83	50,0/50,0	45,6/54,46	0,28

p (χ^2) Pirsonov Hi kvadrat test**Tabela 4.15.** Asocijacija varijante rs518394 u genu *ANRIL* sa nastankom infarkta miokarda.

rs518394	Cela grupa		p (χ^2)	Muškarci		p (χ^2)	Žene		p (χ^2)
	Kontrole (%) n = 317	Bolesnici (%) n = 507		Kontrole (%) n = 174	Bolesnici (%) n = 359		Kontrole (%) n = 143	Bolesnici (%) n = 150	
Genetički model									
Kodominantni									
CC	53 (16,6)	69 (13,6)		29 (16,6)	53 (14,9)		24 (16,7)	15 (10,3)	
CG	145 (45,8)	232 (45,6)	0,47	84 (48,2)	154 (43,0)	0,36	62 (43)	79 (52,4)	0,19
GG	119 (37,6)	207 (40,8)		61 (35,3)	151 (42,1)		57 (40,3)	56 (37,2)	
Aleli A/G	39,6/60,4	36,4/63,6	0,19	40,8/59,2	36,3/63,7	0,15	38,5/61,5	36,3/63,6	0,59

p (χ^2) Pirsonov Hi kvadrat test

Tabela 4.16. Asocijacija varijante rs2275888 u genu *HACD4* sa nastankom infarkta miokarda.

rs2275888	Cela grupa		p (χ^2)	Muškarci		p (χ^2)	Žene		p (χ^2)
	Kontrole n = 314, (%)	Bolesnici n = 520, (%)		Kontrole n = 172, (%)	Bolesnici n = 367, (%)		Kontrole n = 142, (%)	Bolesnici n = 153, (%)	
Genetički model									
Kodominantni									
TT	160(50,96)	276(53,08)		89(51,74)	202(55,04)		71(50,0)	74(48,37)	
TC	130(41,40)	193(37,12)	0,34	75(43,60)	128(34,88)	0,034	55(38,73)	65(42,48)	0,54
CC	24(7,64)	51(9,81)		8(4,65)	37(10,08)		16(11,27)	14(9,15)	
Aleli T/C	0,72/0,28	0,72/0,28	0,99	0,74/0,26	0,73/0,27	0,71	0,70/0,30	0,70/0,30	0,71

Tabela 4.17. Asocijacija varijante rs36212560 u genu *HACD4* sa nastankom infarkta miokarda.

rs36212560	Cela grupa		p (χ^2)	Muškarci		p (χ^2)	Žene		p (χ^2)
	Kontrole n = 303, (%)	Bolesnici n = 507, (%)		Kontrole n = 167, (%)	Bolesnici n = 361, (%)		Kontrole n = 136, (%)	Bolesnici n = 146, (%)	
Genetički model									
Kodominantni									
II	174(57,43)	237(46,72)		103(61,68)	164(45,36)		71(52,21)	73(50,00)	
ID	106(34,98)	227(44,79)	0,011	52(31,14)	167(46,45)	0,002	54(39,71)	60(40,79)	
DD	23(7,59)	43(8,49)		12(7,19)	30(8,20)		11(8,09)	13(9,21)	
Dominantni									
II	174(57,43)	237(46,72)	0,003	103(61,68)	164(45,36)	0,0005	71(52,21)	73(50,0)	0,70
ID + DD	129(42,57)	270(53,28)		64(38,32)	197(54,64)		65(47,79)	73(50,0)	
Aleli I/D	0,75/0,25	0,69/0,31	0,01	0,77/0,22	0,69/0,31	0,004	0,72/0,28	0,71/0,29	0,69

p (χ^2) Pirsonov Hi kvadrat test

Tabela 4.18. Asocijacija varijante rs36212560 u genu *HACD4* sa rizikom za nastanak infarkta, kod muškaraca.

rs36212560						
Genetički model	OR	95% CI	p	OR*	95% CI	p
Kodominantni						
II	ref.			ref.		
ID	2,02	1,36–3,01	0,0005	1,91	1,27–2,88	0,0017
DD	1,55	0,75–3,17	0,22	1,53	0,74–3,16	0,24
Dominantni						
II	ref.			ref.		
ID + DD	1,93	1,33–2,82	0,0005	1,83	1,25–2,7	0,0018
Aleli I/D	1,55	1,15–2,10	0,004	/	/	/

OR odnos šansi; CI interval poverenja; ref. referentni genotip; *OR korigovan na godine, BMI, TH, HDL, LDL, TG, status hipertenzije i pušenja

4.5.1 Asocijacija haplotipova varijanti rs36212560 i rs2275888 u genu *HACD4* sa nastankom infarkta miokarda

U haplotipskoj analizi varijanti rs36212560 I/D i rs2275888 T/C, haplotip IT je zbog najveće učestalosti definisan kao referentan. U poređenju sa haplotipom IT, haplotip DT je značajno asociran sa rizikom za nastanak IM, ali nakon korekcije na faktore rizika rezultat više nije bio statistički značajan (Tabela 4.19.). Nakon testiranja u grupama podeljenim po polu, kod DT haplotip je bio značajno i nezavisno asociran sa povećanim rizikom za nastanak IM samo kod muškaraca, pri čemu je korigovani OR iznosio 1,64 uz 95% CI = 1,12 – 2,42 i p = 0,011 (4.19.). Rezultat je bio korigovan na godine, BMI, TH, LDL, HDL, Tg, status pušenja i hipertenzije.

Tabela 4.19. Asocijacija haplotipova varijanti rs36212560 i rs2275888 u genu *HACD4* sa rizikom za nastanak infarkta miokarda.

Haplotip	Učestalost haplotipova (%)		Efekat haplotipa na nastanak IM			
	Kontrole n=303	Bolesnici n=507	OR (± 95% CI)	p	OR* (± 95% CI)	p
Cela grupa						
IT	0.480	0.417	ref.		ref.	
IC	0.272	0.277	1,16 (0,91–1,49)	0,22	1.18 (0.91–1.54)	0.21
DT	0.241	0.299	1,42 (1,10–1,82)	0,006	1.35 (1.04–1.76)	0.023
DC	0.004	0.006	NA		NA	
Muškarci	n=167	n=361				
IT	0.524	0.419	ref.		ref.	
IC	0.253	0.271	1,37 (0,97–1,94)	0,07	1,33 (0,94–1,89)	0,11
DT	0.215	0.305	1,83 (1,32–2,54)	0,0003	1,73 (1,24–2,41)	0,001
DC	0.006	0.005	NA		NA	
Žene	n=136	n=146				
IT	0,427	0,412	ref.		ref.	
IC	0.296	0.292	1,00 (0,68– 1,47)	0,98	1,26 (0,77–2.05)	0,35
DT	0.273	0.285	1,06 (0,71–1,58)	0,76	1.02 (0,61–1,68)	0,95
DC	0.003	0.009	NA		NA	

NA nije računat efekat haplotipa zbog malog uzorka; ref. referentni haplotip; *rezultat je korigovan na godinegodine, BMI, TH, LDL, HDL, status hipertenzije i pušenja

4.5.2 Asocijacija analiziranih genetičkih varijanti sa brojem obolelih koronarnih arterija kod bolesnika sa infarktom miokarda

Genske varijante rs518394 i rs10757278 u genu *ANRIL*, rs2275888 i rs36212560 u genu *HACD4* nisu bile statistički značajno asocirane sa brojem obolelih koronarnih arterija kod bolesnika sa IM. Statistički značajna asocijacija bila je ustanovljena za varijantu rs518394 nakon korekcija na genotip varijante rs10757278 (Tabela 4.20.). Nosioi alela G po dominantnom modelu imaju težu kliničku sliku, izraženu u vidu većeg broja obolelih sudova. Nakon korekcije na faktore rizika (godine, pol, Tg, LDL, HDL, status pušenja i hipertenzije) rezultat više nije bio statistički značajan (Tabela 4.20.). Učestalosti genotipova varijante rs518394 u odnosu na broj obolelih krvnih sudova prikazan je u tabeli 4.21.

Tabela 4.20. Asocijacija varijante rs518394 u genu *ANRIL* sa brojem obolelih arterija, kod bolesnika sa IM.

rs518394	1 KS n=238	2KS+3KS n=251	OR (95% CI)	p	OR* (95% CI)	p	OR** (95% CI)	p
Genetički model								
CC	37(59,68)	25(40,32)	ref.		ref.		ref.	
CG+GG	201(47,07)	226(52,93)	(0,96–2,86)	0,065	1,81 (1,0–3,32)	0,05	1,57 (0,83–2,97)	0,16
Aleli C/G	0,64/0,36	0,56/0,43	1,36 (1,03–1,78)	0,026	/	/	/	/

KS Koronarni krvni Sud (broj obolelih krvnih sudova 1, 2 ili 3); OR odnos šansi; CI interval poverenja; ref. referentni genotip *rezultat korigovan na rs10757278; **rezultat korigovan na rs10757278, godine, pol, HDL, LDL, Tg, status pušenja i hipertenzije.

Tabela 4.21. Učestalost genotipova i alelavarijante rs518394 u genu *ANRIL* u odnosu na broj obolelih arterija, kod bolesnika sa IM.

rs518394	Cela grupa, n=489			
Genetički Model	1KS n=238(%)	2KS n=162(%)	3KS n=89(%)	p (χ^2)
Kodominantni				
CC	37(59,68)	15(24,19)	10(16,13)	
CG	98(43,95)	84(37,67)	41(18,39)	0,19
GG	103(50,49)	63(30,88)	38(18,63)	
Aleli A/G	0,36/0,64	0,35/0,65	0,34/0,66	ns

KS Koronarni krvni Sud (broj obolelih krvnih sudova 1,2 ili 3), ns nije značajno

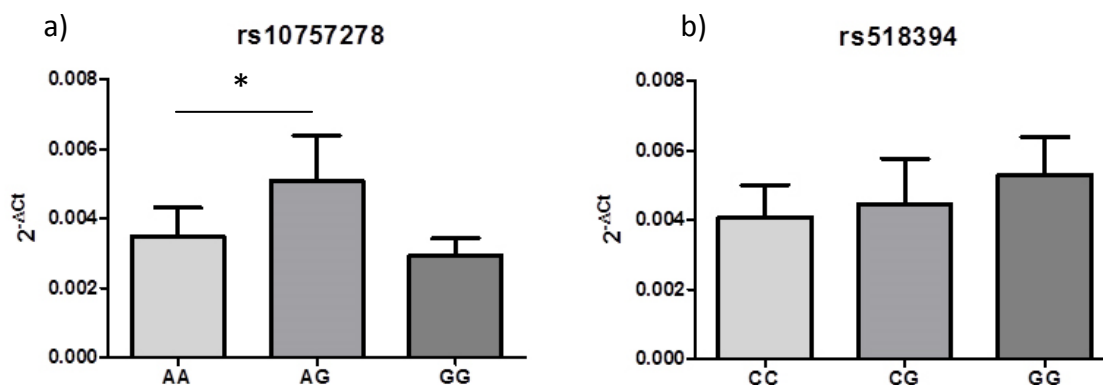
4.6 Rezultati određivanja relativne ekspresije ispitivanih gena na nivou iRNK u tkivu karotidnog plaka

Nivo ekspresije analiziranih gena određen je indirektno, putem detekcije razlika u nivoima relativne ekspresije ispitivanih gena na nivou RNK. U analiziranim uzorcima kao endogena kontrola za normalizaciju rezultata ekspresije korišćena je iRNK gena *CYCLA*. Vrednosti relativne ekspresije su prikazane u vidu normalizovanih vrednosti $2^{-\Delta Ct}$, gde je $\Delta Ct = Ct$ (ispitivani gen) - Ct (endogena kontrola).

4.6.1 Rezultati ispitivanja asocijacije nivoa ekspresije analiziranih gena u odnosu na genotipove varijanti u tkivu karotidnog plaka

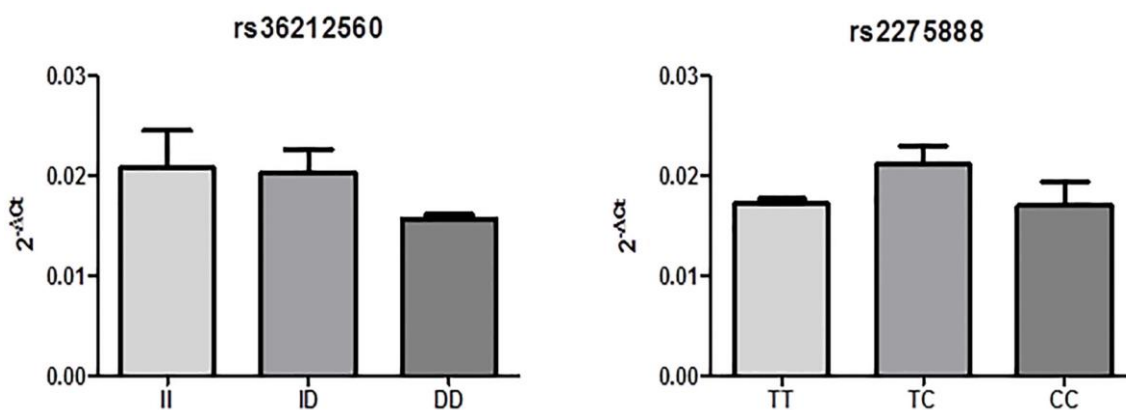
Relativna ekspresija *CDKN2B* iRNK pokazuje trend razlike u odnosu na genotipove varijante rs10757278 u tkivu KP (Grafik 1). U odnosu na genotip AA nosioci genotipa AG imali su statistički trend povećanja nivoa relativne ekspresije *CDKN2B* iRNK (FC = 2,42; CI = 0,75 – 7,18; p = 0,06) (Grafik 2a). Nije uočena statistički značajna razlika u nivou relativne ekspresije *CDKN2B* iRNK kod nosilaca GG u odnosu na nosioce AA i AG genotip varijante rs10757278. Relativna ekspresija *CDKN2B* iRNK nije se statistički značajno razlikovala u odnosu na genotipove varijante rs518394 u tkivu KP (Grafik 2b). Nije ustanovljena ni statistički značajna asocijacija nivoa ekspresije *HACD4* iRNK sa genetičkim varijantama rs2275888 i rs36212560 u tkivu karotidnog plaka (Grafik 2).

Grafik 1. Relativna ekspresija *CDKN2B* iRNK u tkivu KP u odnosu na genotipove varijanti rs10757278 i rs518394 u genu *ANRIL*.



Rezultat je predstavljen vidu srednje vrednosti $2^{-\Delta Ct} \pm SE$. *p = 0,06 (REST software); rs10757278: AA (n = 10); AG (n = 10); GG (n = 10); rs518394: CC (n = 5), CG (n = 9), GG (n = 11)

Grafik 2. Relativna ekspresija *HACD4* iRNK u tkivu KP u odnosu na genotipove varijanti rs36212560 i rs2275888.

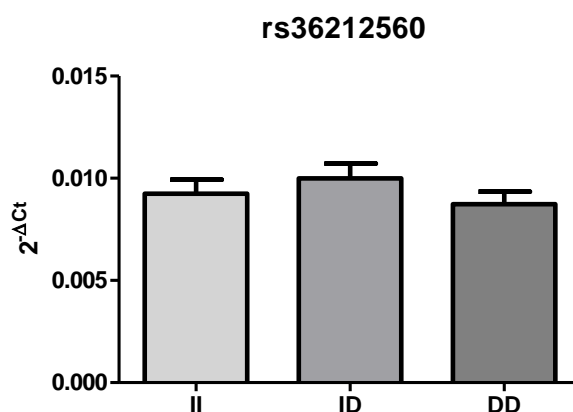


Rezultat je predstavljen grafički u vidu srednje vrednosti $2^{-\Delta Ct} \pm SE$. rs36212560: II (n = 20), ID (n = 18), DD (n = 2); rs2275888: TT (n = 21), TH (n = 17), CC (n = 2)

Nije ustanovljena statistički značajna asocijacija relativne ekspresije *FOCAD* iRNK sa varijantom rs36212560 u tkivu karotidnog plaka (Grafik 4). Relativna ekspresija *FOCAD* iRNK nije se statistički značajno razlikovala u odnosu na

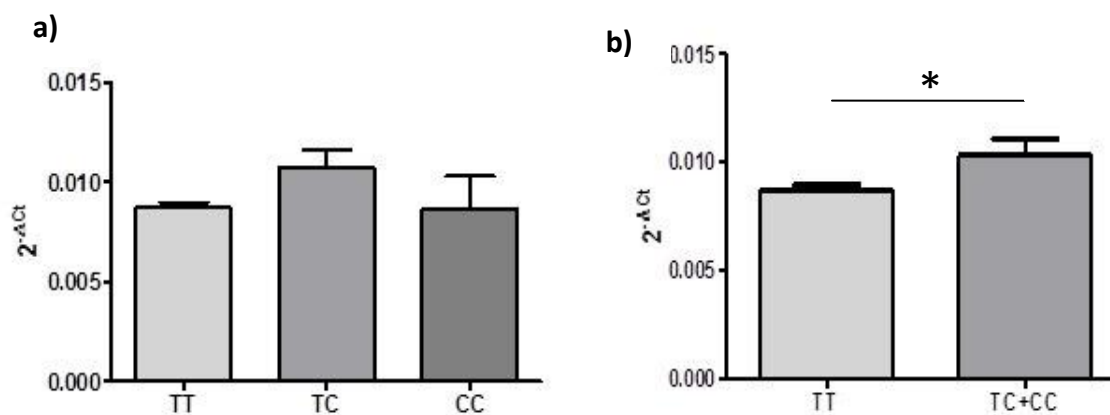
genotipove varijante rs2275888 po aditivnom modelu nasleđivanja ($p = 0,09$; *Kruskal–Wallis ANOVA*) (Grafik 5a). Po dominantnom modelu nasleđivanja ustanovljen je statistički značajno viši nivo *FOCAD* iRNK kod nosilasa C alela ($FC = 1,16$; $CI = 0,93 - 1,48$; $p = 0,029$, *REST software*) (Grafik 4).

Grafik 4. Relativna ekspresija *FOCAD* iRNK u tkivu KP u odnosu na genotipove varijante rs36212560.



Rezultat je predstavljen grafički u vidu srednje vrednosti $2^{-\Delta Ct} \pm SE$. II ($n = 20$); ID ($n = 18$); DD ($n = 2$)

Grafik 5. Relativna ekspresija *FOCAD* iRNK u tkivu KP u odnosu na genotipove varijante rs2275888.

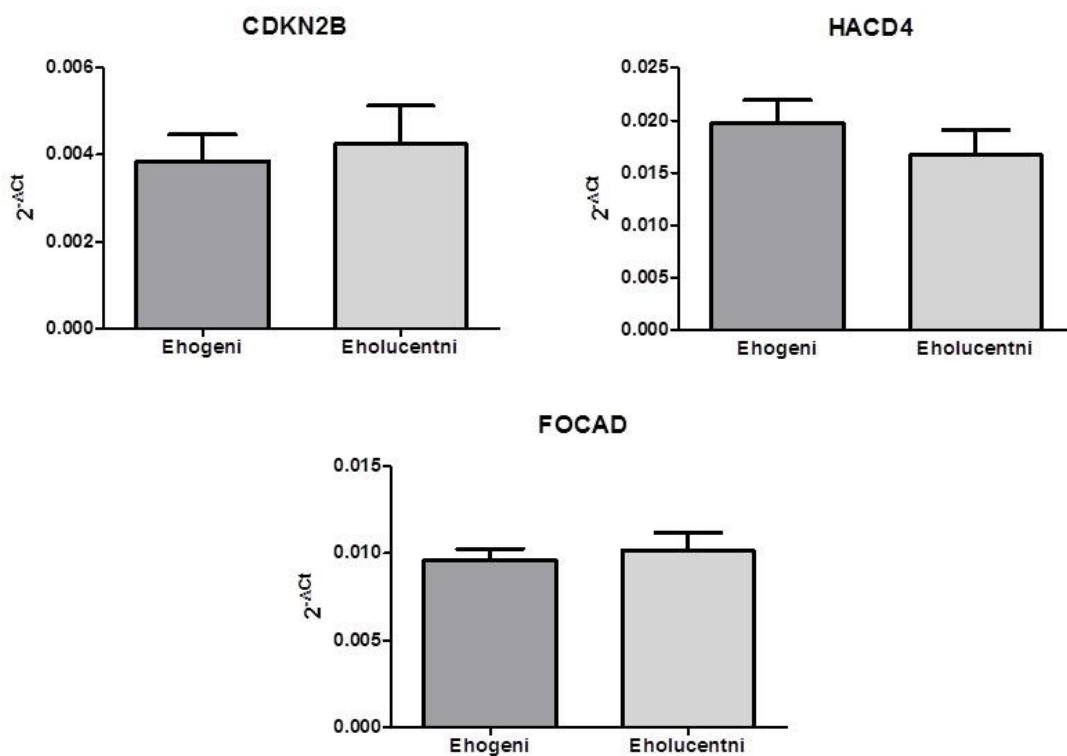


Rezultat je predstavljen grafički u vidu srednje vrednosti $2^{-\Delta Ct} \pm SE$ po: a) aditivnom; b) dominantnom modelu nasleđivanja. $*p = 0,029$; TT ($n = 21$); TH ($n = 17$); CC ($n = 2$)

4.6.2 Relativna ekspresija iRNK ispitivanih gena u odnosu na fenotip karotidnog plaka

Nije ustanovljena statistički značajna razlika u nivou relativne ekspresije iRNK gena *CDKN2B*, *HACD4* i *FOCAD* u odnosu na fenotip karotidnog plaka (ehogeni i eholucentni) (Grafik 6)

Grafik 6. Relativna ekspresija iRNK gena *CDKN2B*, *HACD4* i *FOCAD* u tkivu KP u odnosu na ehosonografski definisan tip plaka.



Rezultat je predstavljen grafički u vidu srednje vrednosti $2^{-\Delta C_t} \pm SE$. Ehogeni plak (n = 24); Eholucentni plak (n = 16)

4.7 Rezultati određivanja ekspresije ispitivanih gena na nivou iRNK u mononuklearnim ćelijama periferne krvi

Nivo ekspresije gena određen je indirektno, putem detekcije razlika u nivou relativne ekspresije ispitivanih gena na nivou RNK. U analiziranim uzorcima kao endogena kontrola za normalizaciju rezultata ekspresije korišćena je iRNK gena *CYCLA*. Vrednosti relativne ekspresije prikazane su u vidu normalizovanih vrednosti $2^{-\Delta Ct}$, gde je $\Delta Ct = Ct$ (ispitivani gen) - Ct (endogena kontrola).

4.7.1 Relativna ekspresija ispitivanih gena na nivou iRNK u MĆPK kod kontrola i bolesnika sa infarktom miokarda, 6 meseci nakon akutnog događaja

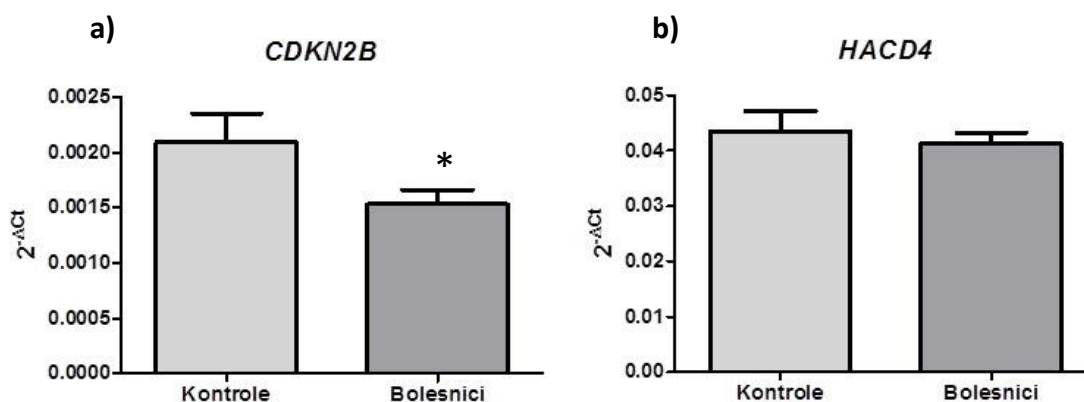
Ustanovljen je statistički značajno niži nivo *CDKN2B* iRNK kod bolesnika sa IM u odnosu na kontrole (FC = 0,67; CI = 0,229 – 1,495; p = 0,006) (Grafik 7a). Nije ustanovljena statistički značajna razlika u nivou *HACD4* iRNK između zdravih kontrola i bolesnika sa IM (6 meseci nakon akutnog događaja) (Grafik 7.b). Osnovne karakteristike kontrola i bolesnika sa infarktom miokarda uključenih u analizu relativne ekspresije prikazane su u tabeli 4.22.

Tabela 4.22. Osnovne karakteristike kontrola i bolesnika sa infarktom miokarda uključenih u analizu relativne ekspresije.

Parametar	Kontrole n = 26	Bolesnici n = 72	p
pol, ž/m (%)	13(50)/13(50)	19(26.4)/53(73.4)	0.03 [#]
Starost (godine)	49,42 ± 9,12	55.27 ± 7.95	0.026 [*]
BMI	26,34 ± 3,41	27.1 ± 4.19	ns [*]
Hipertenzija, n (%)	8 (30,77)	33 (45.83)	0.18 [#]
TH (mol/l)	6,01 ± 0,94	5.65 ± 1.12	ns ^t
HDL (mol/l)	1,53 ± 0,29	3.65 ± 1.08	<0.001 ^t
LDL (mol/l)	3,89 ± 0,86	1.88 ± 1.29	<0.001 ^t
Tg (mol/l)	1,41 ± 0,85	1.13 ± 0.27	0.097 [*]
Pušači, n (%)	10(38,4)	15(21,0)	ns [#]

* *Mann–Whitney U* test; ^t *Studentov t* test; [#] p Pirsonov χ^2 test; ns– nije statistički značajna razlika

Grafik 7. Relativna ekspresija iRNK gena *CDKN2B* i *HACD4* u MČPK kontrola i bolesnika sa IM.



Rezultat je predstavljen grafički vidu srednje vrednosti $2^{-\Delta Ct} \pm SE$. * $p = 0,006$; Kontrole (n = 27); bolesnici sa IM (n = 72)

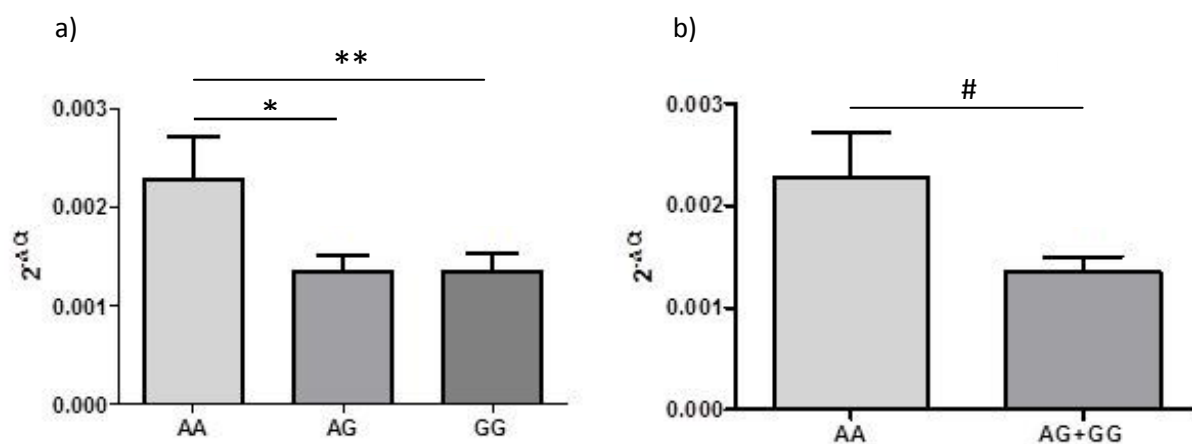
4.7.2 Rezultati ispitivanja asocijacije nivoa ekspresije analiziranih gena u odnosu na genotipove varijanti kod bolesnika sa IM

Relativna ekspresija *CDKN2B* iRNK se statistički značajno razlikovala u odnosu na genotipove varijante rs10757278 u MČPK (Grafik 8). U odnosu na genotip AA statistički značajno niži nivo iRNK imali su nosioci genotipa AG (FC = 0,576; CI = 0,216 – 1,447; $p = 0,015$) i nosioci GG genotipa (FC = 0,584; CI = 0,225 – 1,466; $p = 0,03$) (Grafik 8a). Po dominantom modelu nasleđivanja (AA vs. AG+GG) nosioci alela G imali su statistički značajno niži nivo iRNK *CDKN2B* (FC = 0,579; CI = 0,217 – 1,448; $p = 0,009$) (Grafik 8b).

U odnosu na najčešći genotip varijante rs518394 (GG), nosioci genotipa CG (n = 37) imali su statistički trend povećanja relativne ekspresije *CDKN2B* iRNK (FC = 1,44; CI = 0,51 – 3,8, $p = 0,055$) (Grafik 9). U ovom radu, nije utvrđena statistički značajna razlika između drugih ispitivanih grupa.

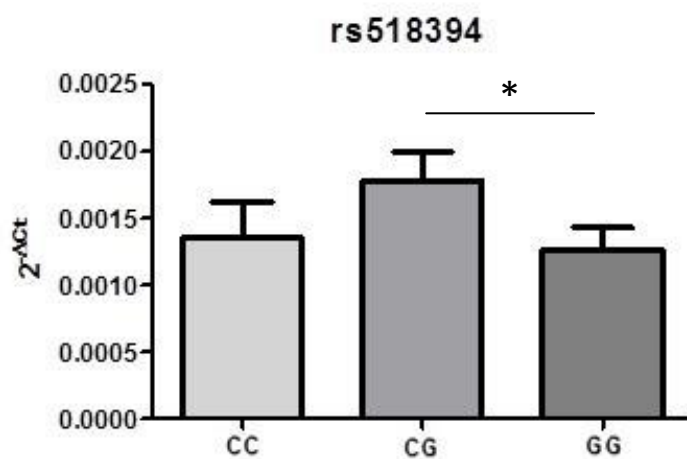
Nije ustanovljena statistički značajna asocijacija relativne ekspresije *HACD4* iRNK sa genotipovima varijanti rs36212560 i rs2275888 u MČPK (Grafik 10).

Grafik 8. Relativna ekspresija *CDKN2B* iRNK u MČPK bolesnika sa IM u odnosu na genotipove varijante rs10757278.



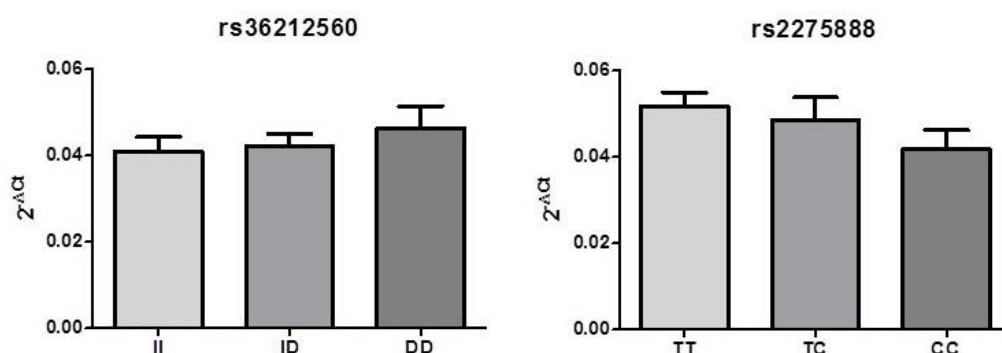
Rezultat je predstavljen grafički u vidu srednje vrednosti $2^{-\Delta Ct} \pm SE$. *p = 0,015; **p = 0,035; #p = 0,009; AA (n = 14); AG (n = 38); GG (n = 20)

Grafik 9. Relativna ekspresija *CDKN2B* iRNK u MČPK bolesnika sa IM u odnosu na genotipove varijante rs518394.



Rezultat je predstavljen grafički u vidu srednje vrednosti $2^{-\Delta Ct} \pm SE$. *p = 0,055; CC (n = 7); CG (n = 37); GG (n = 28)

Grafik 10. Relativna ekspresija *HACD4* iRNK u MČPK bolesnika sa IM u odnosu na genotipove varijanti rs36212560 i rs2275888.



Rezultat je predstavljen grafički vidu srednje vrednosti $2^{-\Delta C_t} \pm SE$. rs36212560: II (n = 32); ID (n = 33); DD (n = 7); rs2275888: TT (n = 40); TC (n = 28); CC (n = 4)

U multivarijantnom regresionom modelu, koji je uključivao značajne faktore detektovane univarijantnom analizom, relativna ekspresija *CDKN2B* iRNK bila je statistički značajno niža kod bolesnika sa IM 6 meseci nakon kliničkog događaja u odnosu na kontrolnu grupu ($p = 0,01$) (Tabela 4.23.).

Tabela 4.23. Multivarijantna regresiona analiza značajnih genetičkih i kliničkih faktora između kontrola i bolesnika sa infarktom miokarda, 6 meseci nakon IM.

Faktori	β	$\pm SE (\beta)$	p
$2^{-\Delta C_t}$ iRNK <i>CDKN2B</i>	-0.40	0.13	0.003
Godine	0.18	0.12	ns
Pol	-0.03	0.11	ns
rs10757278	-0.13	0.11	ns
HTA	0.08	0.11	ns
Tg, mmol/L	-0.02	0.11	ns
HDL, mmol/L	-0.14	0.15	ns
LDL, mmol/L	0.04	0.11	ns

β beta; SE standardna greška; ns nije značajno

5 DISKUSIJA

Ateroskleroza je kompleksna, multifaktorijalna, progresivna, hronična inflamatorna bolest zida arterijskih krvnih sudova (Hansson i sar., 2005) na čiji nastanak i progresiju utiču brojni nenasledni i nasledni (genski) faktori, kao i njihova interakcija (Talmud i sar., 2007; O'Donnell CJ., i Elosua R. 2008; Roberts R., i Stewart AF., 2012). Nezavisno od mehanizma delovanja, genske varijantne predstavljaju potencijane markere koji se mogu koristiti za ranu procenu rizika nastanka, ali i praćenje toka bolesti. Pokazano je da je hromozomski region 9p21 asociran sa povišenim rizikom za nastanak i progresiju ateroskleroze nezavisno od poznatih faktora rizika, što je značajan preduslov da bi se mogao uvrstiti u algoritam procene rizika za nastanak bolesti (Roberts R., i Stewart AF., 2012; Knowles i sar., 2018).

Genetske varijante hromozomskog regiona 9p21 koje nose rizik za nastanak KBS su identifikovane prvi put tek nakon primene GWAS tehnologije, 2007. godine. Od tada, razvoj GWAS tehnologija doveo je do otkrića i replikacije više od 50 novih varijanti u genomu koje nose rizik za nastanak KBS, od kojih se za 35 ne zna mehanizam kojim dovode do nastanka bolesti (Roberts i sar., 2014). Varijante HR 9p21 najznačajnije asocirane sa KAB i IM su kasnije validirane u studijama asocijacije slučajeva i kontrola (Abdullah i sar., 2008; Assimes i sar., 2008; Broadbent i sar., 2008; Hinohara i sar., 2008; Schunkert i sar., 2008; Shen i sar., 2008; Shen i sar 2008; Talmud i sar., 2008).

U okviru ove doktorske disertacije sprovedena je genetičko-epidemiološka studija četiri varijante, locirane u hromozomskom regionu 9p21, sa rizikom za nastanak karotidne i koronarne ateroskleroze i njenim kliničkim manifestacijama i komplikacijama, kod čoveka. Takođe, urađena je analiza ekspresije na nivou iRNK gena *CDKN2B*, *HACD4* i *FOCAD* u relevantnim tkivima (karotidni aterosklerotski plak, MĆPK). Sprovođenje asocijacione studije kontrola i bolesnika, koji ispoljavaju bolest u dva različita ogranka vaskularnog sistema (karotidna i koronarna cirkulacija) imalo je za cilj da pruži dodatne informacije kojima bi se bolje razumeo uticaj ispitanih genetičkih varijanti na rizik za nastanak podfenotipova u aterosklerozi, a naročito u populaciji Srbije u kojoj iste nisu do sada ispitane U ovoj studiji analizirane su genske

varijante koje se nalaze u HR 9p21: rs10757278 A/G i rs518394 C/G u genu *ANRIL*; rs36212560 I/D i rs2275888 T/C u genu *HACD4*.

Mnogi demografski, antropometrijski i biohemijski faktori rizika koji značajno utiču na nastanak i tok kardiovaskularnih bolesti su definisani prethodnih decenija i danas ih označavamo kao konvencionalne faktore rizika. Najveći značaj za nastanak KVB imaju hipertenzija, pušenje, indeks telesne mase, godine starosti, šećerna bolest, pol, visok nivo triglicerida i LDL-a i nizak nivo HDL-a, kao i način života (sedentarni) i konzumacija alkohola. Faktori rizika samostalno ili u međusobnom sadejstvu povećavaju rizik od KVB (Tendera i sar., 2011). U dosadašnjim gensko-epidemiološkim istraživanjima varijante hromozomskog regiona 9p21 su okarakterisane kao nezavisni faktor rizika za KVB. Ispitivana je asocijacija varijanti sa različitim konvencionalnim faktorima rizika, ali do sada nije detektovana značajna asocijacija. Rezultati naše studije pokazuju da varijanta rs10757278 nije značajno asocirana sa faktorima rizika kod bolesnika sa KP i IM, kao ni kod kontrola, što je u skladu sa rezultatima prethodnih studija (Helgadottir i sar., 2007; McPheres i sar., 2007; Samani i sar., 2007; Abdullah i sar., 2008, Lemmens i sar., 2009, Nimic i sar., 2012). Takođe, varijante rs518394, rs2275888 i rs36212560 nisu značajno asocirane sa faktorima rizika. Genska varijanta rs518394 je do sada ispitana u nekoliko studija u kojima je testirana asocijacija sa kardiovaskularnim fenotipovima ili ekspresijom gena *INK/ARF* lokusa ali autori nisu objavili asocijaciju sa kardiovaskularnim faktorima rizika (Samani i sar., 2007; Schunkert i sar., 2007; Yan i sar., 2009; Fan i sar., 2013;). O genskim varijantama rs2275888 i rs36212560 nema podataka koji bi potvrdili ili opovrgli rezultat doktorske disertacije.

Asocijacija varijante rs10757278 sa povišenim rizikom za nastanak KBS i IM je prvobitno detektovana u okviru GWAS 2007.godine (Helgadottir i sar., 2007). Asocijacija sa IM je validirana u velikom broju studija slučajeva i kontrola (Shen i sar., 2008; Abdullah i sar., 2008, Zhang i sar., 2009; Koch i sar., 2011), kao i u meta-analizi u koju su uključene uglavnom severne i zapadne Evropske, i Azijske populacije (Chen i sar., 2011). Genetička varijanta rs10757278 je uz rs1333049 od strane CARDIoGRAM (Coronary ARtery Disease Genome-Wide Replication And Meta-Analysis) konzorcijuma označena kao varijanta koja nosi najveći rizik za nastanak KBS (Preuss i sar., 2010), i nije u LD sa varijantama u kodirajućim regionima DNK. Dodatni razlog za

odabir varijante rs10757278 za analizu u disertaciji je njegova pozicija u okviru pojačivača, kao i rezultat da utiče na vezivanje regulatornih proteina transkripcije, na primer STAT1 (Jarínova i sar., 2009, Harismendy i sar., 2011).

S obzirom da IM i moždani udar dele nekoliko faktora rizika i patoloških mehanizama (Pasternak i sar., 2004; Adams i sar., 2003), ispitivana je asocijacija varijante rs10757278 sa obe patologije. U okviru disertacije ispitani su bolesnici sa infarktom miokarda i bolesnici sa karotidnim plakom koji imaju visok stepen stenozе (>70%) i podvrgnuti su operaciji endarterektomije. Ovo je prva studija urađena na grupi bolesnika sa tako visokim stepenom stenozе karotidnih krvnih sudova i, prva studija asocijacije varijanti iz HR 9p21 sa rizikom za nastanak KVB u populaciji Srbije. Rezultat ne uklazuju na značajnu asocijaciju rs10757278 sa rizikom za nastanak IM i KP. Meta-analiza koja je obuhvatala rezultate 21 studije pokazala je da postoji značajna asocijacija između 9p21.3 varijanti i rizika za nastanak CVI, ali da asocijacija varira među različitim etničkim populacijama (Zhang i sar., 2014). Lemmens R. i saradnici su prijavili značajnu asocijaciju rs10757278 sa koronarnom arterijskom bolešću, ali ne sa CVI u Belgijskoj populaciji (Lemmens i sar., 2009). Studija na 229 bolesnika sa CVI ili TIA i istim brojem uparenih kontrola nije pokazala statistički značajnu asocijaciju događaja sa varijantom rs10757278 (Sheila i sar., 2011). Naši rezultati pokazuju da žene nosioci genotipa GG rs10757278 imaju povišeni rizik za nastanak karotidnog plaka ali da nema značajne asocijacije sa karotidnim plakom u celokupnoj grupi bolesnika, kao ni u grupi muškaraca. U nekim studijama je detektovana asocijacija koja je pokazala polnu specifičnost. U populaciji Han kineza, rs1333049 je značajno asociiran sa zedebljanjem sloja intima-medija i prisustvom karotidnog plaka kod muškaraca, ali ne i kod žena (Lin i sar., 2010).

U studiji sprovedenoj na bolesnicima sa KAB u populaciji Han Kineza, detektovana je značajna asocijacija ređeg homozigota varijante rs1333049 sa koronarnom stenozom (50% stenozе u makar jednom krvnom sudu) u grupi žena mlađih od 55 godina i grupi žena između 55 i 65 godina dok kod muškaraca mlađih od 55 nije detektovana asocijacija (Lian i sar., 2014). Rezultati naše studije pokazuje sličan obrazac distribucije genotipova kao i u studiji Lian i saradnika, ipak, u našoj studiji razlika nije statistički značajna. U meta-analizi Palomki i saradnika, najveći uticaj HR

9p21 na KBS je zabeležen kod osoba mlađih od 55 (OR = 1,35) dok je nešto slabiji u grupi između 56 i 75 godina starosti (OR = 1,21), što ukazuje da je uticaj genotipova veći u mlađem životnom dobu (Palomki i sar., 2010). Poznato je da žene obolevaju od kardiovaskularnih bolesti kasnije u odnosu na muškarce (George i sar., 2015), kao i da faktori rizika za moždani udar i infarkt miokarda imaju drugačiju distribuciju između muškaraca i žena (Jousilahti i sar., 1999; Yusuf i sar., 2004). Takođe, genske varijante mogu imati polno specifičan efekat na rizik za KVB (Silander i sar., 2008). Iako rezultat nije prikazan u doktorskoj disertaciji, selektovali smo uzorak bolesnika za rani IM (<55 godina starosti za muškarce) gde smo uočili veću učestalost alela G nego u celoj grupi muškaraca, ali bez statistički značajne asocijacije. Oba navedena rezultata naše studije ukazuju na potrebu da se analiza ponovi na većem broju uzoraka. Bez obzira na starost, više autora je objavilo studije u kojima nije ili je detektovana marginalna asocijacija rs10757278 sa IM (Lin i sar., 2011; Branushali i sar., 2011, Maksimov i sar., 2012, Shen i sar., 2008, Dehghan i sar., 2008, Virani i sar., 2012). U dve studije, u populaciji Turske (59,4% učestalost C alela) i Irana (58,5% učestalost C alela), detektovana je inverzija u učestalosti i protektivan efekat rs1333049 C alela na nastanak KAB (Cakmak i sar., 2015; Foroughmand i sar., 2015). U populaciji Srbije, kod kontrola, detektovali smo relativno visoku učestalost ređeg, rs10757278 G alela (53%) u poređenju sa drugim Evropskim populacijama. Primećuje se da učestalost raste sa smanjenjem geografske širine, pri čemu je najmanja učestalost (43%) detektovana u populaciji Islanda (Helgadottir i sar., 2007) i populaciji Nemačke populaciji (Koch i sar., 2011), a najveća u populaciji Italije populaciji (50%) (Shen i sar., 2008). Za sada nema drugih studija sprovedenih u populacijama sa Balkanu sa kojima bi uporedili rezultate naše studije.

Treba naglasiti da analiza pojedinačnih genetičkih varijanti u studijama asocijacije sama po sebi predstavlja ograničenje. Uprkos tome što rs10757278 predstavlja jednu od vodećih varijanti HR 9p21, i jednog od definisanih haplotipskih blokova, u pojedinim populacijama su druge varijante lokusa pokazale značajniju asocijaciju (na primer rs2383206 u populaciji istočne Azije, ali i u Evropi u populaciji Španaca (Assimens i sar., 2008). Iako se varijante koje smo prethodno pomenili (rs10757278, rs10757274, rs2383206 i rs1333049) nalaze u značajnom LD, u pojedinim studijama je detektovana asocijacija neke od njih, dok druge nisu bile asociirane sa

ispitanim kardiovaskularnim fenotipom. Hsiu-Fen Lin i saradnici su detektovali asocijaciju varijanti rs10757274 i rs2383206 sa nastankom IM, ali ne i asocijaciju genetičke varijante rs1333049 u populaciji Tajvana (Hsiu-Fen i sar., 2011). U arapskoj populaciji detektovana je asocijacija genetičke varijante rs2383207 sa CAB, ali ne i asocijacija varijanti rs10757278 i rs10757274 (El-Menyar i sar., 2015). Navedeno ukazuje na postojanje određenih međupopulacionih razlika i potrebu za nastavkom ispitivanja uticaja drugih varijanti ili haplotipova, da bi se dobio potpuniji uvid u značaj HR 9p21 za nastanak ateroskleroze u populaciji Srbije.

U meta-analizi koja uključuje dvadeset jednu sudiju, pružen je verodostojan dokaz o povećanom riziku za nastanak moždanog udara kod nosilaca ređeg genotipa, uz OR meta-analize od 1,1 (Zhang i sar., 2014). Kao što je slučaj i sa IM, u nekoliko studija nije detektovana asocijacija sa moždanim udarom (Lemens i sar., 2011, Plant i sar., 2011). Pored toga, u studijama asocijacije sa subkliničkim fenotipovima karotidne ateroskleroze (kao što je zadebljanje sloja intima-medija) nisu dobijeni konzistentni rezultati u asocijaciji sa genetičkih varijanti rs10757278 i rs1333049 sa intermedijarnim aterosklerotskim fenotipovima (Zhang i sar., 2013; Plichart i sar., 2012, Lin i sar., 2010, Cunnington i sar., 2009; Yamagishi i sar., 2009; Samani i sar., 2008; Cunnington i sar., 2009; Ze i sar., 2009; Holdt i sar., 2010). Precizno definisanje različitih intermedijarnih fenotipova i kliničkih manifestacija ateroskleroze je neophodno, uz polnu i starosnu stratifikaciju bolesnika u daljem istraživanju HR 9p21 u aterosklerozi. U većini GWAS koje su među prvima detektovale asocijaciju 9p21 sa kardiovaskularnim bolestima nisu predstavljeni rezultati analiza koje bi uključile navedene stratifikacije.

Treba skrenuti pažnju i na određena ograničenja koja naša studija poseduje. Kontrole uključene u studiju nisu obolele od dijabetesa koji predstavlja značajan faktor rizika, a koji je prisutan u značajnoj meri kod bolesnika. Takođe, studija nema dovoljno veliku snagu studije (eng. *study power*) da bi odbacila hipotezu o značaju varijante rs10757278 za nastanak IM i KP u populaciji Srbije. Ne treba zanemariti ni mogući uticaj haplotipske pozadine na značaj varijante rs10757278. Region na hromozomu 9p21.3 asociran sa KBS je lociran u dva haplotipska bloka sa snažnom neravnotežom vezanosti između i unutar haplotipskih blokova (Shamani 2007, Welcome trust 2007). Haplotip (ACAC) četiri genske varijante (redom rs7044859-A, rs1292136-C,

rs7865618-A i rs1333049-C) iz ova dva bloka daje najznačajniji signal u asocijaciji sa IM, ipak asocijacija alela C genetičke varijante rs1333049 je najznačajnija ukoliko su genotipovi prethodne tri varijante ACA-, ali ukoliko je haplotip TTA- asocijacija nije značajna. Ovo je još jedan rezultat koji sugerira da pojedinačni aleli ne mogu u celosti objasniti asocijaciju sa KBS i da je potrebno detektovati spektar varijacija da bi se identifikovale uzročne varijante koje deluju na rizik (Schunkert i sar., 2008).

Genska varijanta rs518394 je prethodno detektovana u dve odvojene GWAS i okarakterisana kao genska varijanta od sekundarnog značaja za nastanak KBS i IM (Samani i sar., 2007; McPherson i sar., 2007). Ovo je prva studija u kojoj je ispitana asocijacija varijante rs518394 sa rizikom za nastanak karotidnog plaka, kao i prva studija slučajeva i kontrola u kojoj je ispitana asocijacija sa IM. Naši rezultati pokazuju da nema statistički značajne asocijacije sa pomenutim patologijama. McPheers i saradnici su detektovali nominalno značajnu asocijaciju ($p < 0,025$) genetičke varijante rs518394 sa koronarnom bolešću srca (McPheers 2007). Oni su koristeći “*microarray*” analizu uradili fino mapiranje regiona veličine 350 kb (175 kb sa svake strane 58 kb centralnog 9p21 regiona koji nosi najveći rizik za kardiovaskularne bolesti) skenirajući varijante na svakih 5 kb. Studija je sprovedena na 500 zdravih kontrola i 500 bolesnika sa KBS koji su učestvovali u “Ottawa Heart Study” u Kanadi. Replikacija u prospektivnoj “ARIC” studiji, na populaciji od 11000 kavkazoida nije pokazala značajan rezultat u asocijaciji rs518394 sa incidencom KBS (McPheers i sar., 2007).

U HR 9p21 mogu se razlikovati četiri haplotipska bloka od kojih su dva označena kao primarni nosioci asocijacije sa KBS. Jedan, koji reprezentuje varijanta rs10757278 je asociiran sa nastankom KBS, ali nije asociiran sa nastankom IM u grupi bolesnika sa KBS. Drugi haplotipski blok, reprezentujuća varijanta rs518394, asociiran je sa nastankom IM kod bolesnika kojima je prethodno dijagnostikovana koronarna ateroskleroza (Fan i sar., 2013). Ovaj rezultat je replikovano u populaciji Saudijske Arabije (AbdulAzeez i sar., 2016). Potencijalni mehanizmi koji bi doveli do ovog efekta su još uvek nepoznati. Musunuru i saradnici su pokazali da varijante drugog haplotipskog bloka utiču na reaktivnost krvnih pločica (Musunuru i sar., 2010), koje predstavljaju ključni element aterotromboze. Njihova adhezija i agregacija utiče na nastanak kardiovaskularnih događaja nakon ruptur plaka (Schulz i sar., 2012). Na taj

način bi varijante haplotipskog bloka koji sadrži rs518394 mogle doprineti nastanku IM, putem uticaja na krvne pločice.

U okviru naše studije, uočili smo trend u asocijaciji varijante rs518394 sa brojem obolelih koronarnih arterija. Trend u asocijaciji je uočen između alela C –kod koga su nosioci češće imali 2 ili 3 obolela koronarna suda dok je nakon korekcije na rs10757278 uočena granična, ali statistički značajna asocijacija. Fan i saradnici su ustanovili asocijaciju alela C varijante rs513894 sa većim brojem obolelih sudova u grupi bolesnika sa koronarnom bolešću (Fan i sar., 2013). Iako možemo reći da je naš rezultat u skladu sa prethodim, svakako da bi bilo potrebno povećati uzorak bolesnika da bi se dobila jasnija slika o značaju varijante. genetičkih Nismo ustanovili asocijaciju varijante rs10757278 sa brojem obolelih koronarnih sudova. Dodatna ispitivanja, uz analizu drugih genetičkih varijanti bi trebalo sprovesti da bi se dobio potpuniji uvid u značaj HR 9p21 na težinu kliničke slike. Nije isključeno da rs518394 može imati plejotropni efekat na nastanak IM, obzirom da utiče na reaktivnost i agregabilnost trombocita (Musunuru i sar., 2010), a pokazana je i asocijacija sa agresivnim periodontitisom koji je, kao i ateroskleroza, inflamatorna bolest (Schaefer i sar., 2011). Takodje, skorašnja studija je pokazala značajnu asocijaciju rs518394 sa koronarnom arterijskom kalcifikacijom, fenotipom koji se javlja kod bolesnika sa KBS (Vargas i sar., 2016).

U okviru studije ispitana je asocijacija varijanti rs36212560 i rs2275888 lociranih u genu *HACD4* sa rizikom za nastanak karotidne bolesti i infarkta miokarda. Ovo je prva studija slučajeva i kontrola u kojoj je ispitana asocijacija ove dve varijante sa kliničkim patološkim fenotipom. Cilj je bio da se ispituju varijante koje su udaljene od centralnog dela HR 9p21 (58 kb), a kojima bi mogao da se objasni deo heritabilnosti oboljenja. Uloga *HACD4* u patogenezi bolesti čoveka je do sada izučavana u malom broju studija, naročito kada su u pitanju kardiovaskularne bolesti. Skorašnja istraživanja su pokazala da nakon stimulacije monocita lipopolisaharidima bakterija, varijanta rs2275888 ima ulogu eQTL za interferon β i gene u njegovoj signalnoj kaskadi (Fairfax i sar., 2014). Ova varijanta je anotirana u rSNP bazi “rSNPbase” kao regulatorna (Guo i sar., 2014), a u tibijalnoj arteriji kao eQTL za *HACD4* i *FOCAD* gene (GTEx Consortium, 2015).

Varijanta rs36212560 je od strane rSNP base okarakterisana kao regulatorna i takođe bez drugih regulatornih varijanti u bliskom LD ($r^2 = 0,8$) (Guo i sar., 2014). Takođe, u regulom bazi podataka „RegulomeDB“, koja koristi podatke ENSEMBL projekta, varijanta rs36212560 ima regulatornu ulogu, odnosno skor koji ukazuje da verovatno vezuje regulatorne proteine transkripcije je jako visok (2b)(CFOS na primer) (Boyle i sar., 2012). Statistički značajnu asocijaciju smo pronašli između genetičke varijante rs36212560 i rizika za nastanak karotidnog plaka u celoj grupi bolesnika i u grupi muškaraca.

Nije detektovana statistički značajna asocijacija varijante rs2275888 sa rizikom za nastanak IM, dok je granično značajna asocijacija detektovana po recesivnom modelu nasleđivanja kod muškaraca. Ipak, ovaj rezultat se mora uzeti sa velikom dozom rezerve zbog male učestalosti ređeg genotipa.

Varijante rs36212560 i rs2275888 nalaze se u istom intronu gena *HACD4* i udaljeni su svega 465 nukleotida. U okviru studije ispitan je haplotip ove dve varijante sa rizikom za nastanak bolesti. U odnosu na najčešći haplotip IT, nosioci haplotipa DT su imali povišeni rizik za nastanak karotidnog plaka u celokupnoj grupi i u grupi muškaraca. Sličan rezultat dobijen je i u asocijaciji sa infarkotom miokarda. Snaga studije „study power“ u asocijaciji sa KP i IM kod muškaraca je bila preko 80% u obe analize. S obzirom da do sada nisu objavljene studije koje su analizirale asocijaciju genetičkih varijanti rs36212560 i rs2275888 sa rizikom za nastanak i progresiju ateroskleroze, tj. kardiovaskularnih bolesti, nije moguće uporediti naše rezultate sa rezultatima iz drugih populacija. Varijanta rs36212560, kao inserciono deleciona varijacija nije mogla biti uključena u GWAS. Varijanta rs12344769 koja je u snažnom LD-u sa rs36212560 ($r^2 = 1$, na osnovu rezultata HapMap projekta) nije pokazala značajnu asocijaciju sa KBS i IM u CARDIOGRAM meta-analizi (Preuss i sar., 2010). Među drugim genskim varijantama u genu *HACD4* koje su analizirane do danas, rs2275887 (udaljen 56 nukleotida od rs2275888) je značajno asociiran sa koncentracijom kreatinina u serumu, u okviru GWAS sprovedene u populaciji Zuni indijanaca u asocijaciji sa hroničnom bolešću bubrega (Laston i sar., 2015).

Protein HACD4 katalizuje važan korak u sintezi MKVDL (Ikeda i sar., 2008). Homeostaza saturisanih MKVDL predstavlja bitan faktor u održavanju tkivnih i ćelijskih funkcija (Kihara i sar., 2012). Visok nivo MKVDL u krvi asociiran je sa KBS a

takođe je pokazano da je značajno viši kod muškaraca (Miyazaki i sar., 2014). U studiji Antoku i saradnika, povišeni nivo heksakozanoata (MKVDL sa 26 ugljenikovih atoma) u membrani eritrocita je značajno asociran sa bolestima koje u osnovi imaju aterosklerozu. Takođe, povišen nivo se češće javljao kod muškaraca u odnosu na žene (Miyazaki i sar., 2014). Prethodno navedeni rezultati sugerišu da bi efekat MKVDL na aterosklerozu mogao biti polno specifičan, ali ne može se reći tačno kojim mehanizmom. U ovom trenutku ne postoji dokaz da ispitivane varijante utiču na sintezu MKVDL. Za sada se ne zna dovoljno o biloškom značaju proteina HACD4, da li i na koji način bi mogao uticati na nastanak patoloških fenotipova.

Varijanta rs10757278 u genu *ANRIL* je asocirana sa ultrasonografski definisanim tipom karotidnog plaka. U dosadašnjim studijama rs10757278 je ispitivan u asocijaciji sa KP ili zadebljanjem sloja intima-medije kao intermedijernim fenotipom ateroskleroze. Ovo je prva studija u kojoj je ispitana asocijacija ove genetičke varijante sa kliničkim fenotipom uznapredovalih lezija: stabilni/nestabilni aterosklerotski (ehogeni/eholucentni) plak. U grupi muških bolesnika sa karotidnom plakom, po dominantnom modelu nasleđivanja, nosioci alela G su češće razvijali nestabilni (eholucentni) plak. Statistički značajna asocijacija nije pronađena kod žena. Imajući u vidu da postoje polne razlike u strukturnoj anatomiji karotidnih krvnih sudova (Goubergrits i sar., 2002) bolest može napredovati različitom brzinom kod muškaraca i žena (Iemolo i sar., 2004). Pokazano je da je alel C varijante rs1333049 (u LD sa rs10757278 G alelom) asociran sa debljinom karotidne intime-medije kod muškaraca, ali ne i kod žena (Lin i sar., 2010).

Nivo ehogenosti plaka može reflektovati njegov sadržaj (Gray-Weale i sar., 1988; Grønholdt i sar., 1998). Ipak, ultrasonografske procene i histološke analize fenotipa aterosklerotskog plaka pokazuju donekle kontradiktorne rezultate (Widder i sar., 1990; Goes i sar., 1990). Eholucentni, kao i ulcerisani plakovi mogu biti asocirani sa većim rizikom za moždani udar u odnosu na ehogene plakove (Langsfeld i sar., 1989; Gray-Weale i sar., 1988; Eliasziw i sar., 1994; Feeley i sar., 1991). Takođe, plakovi sa bogatim lipidnim jezgrom i/ili hemoragijom asocirani su sa povišenim rizikom za nastanak moždanog udara nezavisno od stepena arterijske stenozе (Mathiesen i sar., 2001, Polak i sar., 1998). Postoje saznanja koja svedoče o značajnoj naslednosti ehogenih karakteristika karotidnog plaka (Tarnoki i sar., 2012). Do sada nisu objavljene

studije u kojima su ispitivane varijante HR 9p21 sa ultrasonografski definisanom strukturom plaka. Međutim, nekoliko studija je pokazalo uticaj 9p21 genetičkih varijanti na brzinu progresije plaka (Shu i sar., 2008) ili na težinu aterosklerotske bolesti izražene u vidu broja obolelih koronarnih sudova (Chan i sar., 2013). Genske varijante HR 9p21 utiču na progresiju ateroskleroze (Shu i sar., 2008; Broadbent i sar., 2008), što bi bilo u skladu sa našim rezultatom o značaju rs10757278 na formiranje eholucentnog (komplikovanog) karotidnog plaka. S obzirom da je ultrazvučna karakterizacija rutinska, neinvazivna metoda koja se svakodnevno koristi u kliničkoj praksi za karakterizaciju karotidne bolesti, bilo nam je od interesa da ispitamo asocijaciju genetičkih varijanti upravo sa rezultatima te metode.

Naši rezultati pokazuju statistički značajnu asocijaciju haplotipa varijanti rs36212560 i rs2275888 u genu *HACD4* sa simptomatskom karotidnom bolešću. Prognoza, kao i lečenje karotidne bolesti zavisi od toga da li je simptomatska ili ne (Abbot i sar., 2015). Haplotip IC ispitanih varijanti je pokazao protektivan efekat na nastanak simptomatske bolesti u okviru grupe bolesnika sa karotidnim plakom. Uz to, ustanovili smo da haplotipovi IC i DT pokazuju protektivan efekat i za prisustvo ulceracije na karotidnom plaku. Postoje eksperimentalno dokazi da rs2275888 ima određen uticaj na progresiju bolesti putem modulacije inflamatornog odgovora (Fairfax i sar., 2014). Neke studije su pokazale da inflamacija može biti važan okidač za nastanak moždanog udara (Grau i sar., 1995; Bova i sar., 1996; Grau i sar., 1998). Nismo pronašli statistički značajnu asocijaciju varijanti rs10757278 i rs518394 sa rizikom za nastanak ulceracije na KP. Prisustvo ulceracije kod bolesnika sa simptomatskom bolešću dodatno povećava rizik za nastanak moždanog udara (Eliasziw i sar., 1994).

Ispitivanjem asocijacije varijante rs2275888 sa karotidnim plakom, detektovan je trend u asocijaciji kod muškaraca. Haplotip genetičkih varijanti rs2275888 i rs36212560 je značajno asociiran sa nastankom obe patologije. Za sada nema dovoljno dokaza koji bi govorili o mehanizmu kojim rs2275888 može uticati na nastanak kardiovaskularnih patologija. Hipoteza od koje smo pošli je da utiče na ekspresiju *HACD4*, kao i gena za *FOCAD* sa čijom ekspresijom smo utvrdili asocijaciju.

Iako se još uvek ne može sa sigurnošću reći, smatra se da velikim delom mehanizam delovanja varijanti 9p21 regiona podrazumeva njihov uticaj na ekspresiju

proksimalnih gena *CDKN2A*, *CDKN2B*, *p14^{ARF}* i *ANRIL* (Yan i sar., 2009; Jarinov i sar., 2009; Zhang i sar., 2009; Lesca i sar., 2010; Cunnington i sar., 2010; Pilbaw i sar., 2009). Različite genske varijante 9p21 regiona nezavisno utiču na ekspresiju *CDKN2A*, *CDKN2B* i *ANRIL* i u pitanju su genske varijante koje su asocirane sa rizikom za KBS, dijabetes i maligne bolesti (Cunnington i sar., 2010). Takođe, postoji međusobna korelacija u ekspresiji ova tri gena (Cunnington i sar., 2010; Yan i sar., 2019; Lesca i sar., 2010; Congrains i sar., 2012). Rezultati pojedinih studija sugerišu da genske varijante koje nose rizik za KBS utiču na ekspresiju *ANRIL*, koji zatim deluje na *CDKN2A* i *CDKN2B* putem modifikacije hromatina, interagujući sa protein remodelujućim kompleksima jedan i dva (Congrains i sar., 2012, Yu i sar., 2008). *CDKN2B* se smatra jednim od ključni molekula koji utiče na progresiju ateroskleroze. Ne samo da varijante koje nose rizik asociraju sa sniženom ekspresijom *CDKN2B* u karotidnom plaku, već je ustanovljeno, na modelu miša, da gubitak jedne kopije *Cdkn2b* pojačava apoptozu GMC i progresiju aneurizme (Leeper i sar., 2014). Takođe, gubitak *Cdkn2b* stimuliše process ateroskleroze povećavajući veličinu i kompleksnost nekrotičnog jezgra plaka bogatog lipidima (Kojima i sar., 2014).

Rezultati disertacije pokazuju da nema statistički značajne asocijacije rs518394 i rs10757278 sa nivoom iRNK gena *CDKN2B* u tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka. Asocijacija varijante rs518394 sa nivoom ekspresije gena *CDKN2B* u tkivu KP u prethodnim studijama nije bila ispitana. Do sada je ekspresija ispitana u jednoj studiji, u T limfocitima zdravih individua, gde nije ustanovljena statistički značajna asocijacija (Yan i sar., 2009). Weilli Zhang i saradnici sprovedli su studiju tkivne ekspresije na 42 karotidna plaka, pri čemu nisu pronašli statistički značajnu asocijaciju varijante rs10757278 sa nivoom iRNK za *CDKN2B* u tkivu KP (Zhang i sar., 2012). Genske varijante koje nose rizik za KBS asociraju sa nižom ekspresijom iRNK za *CDKN2B* u zdravom tkivu aorte (Pilbow i sar., 2012), kao i u VGMĆ, ćelijama koje predstavljaju važnu komponentu karotidnog plaka (Motterle i sar., 2010).

Značaj gena *HACD4* u nastanku različitih patologija je još uvek nepoznanica. Skorašnja otkrića su identifikovala njegov značaj kao onkogene u skvamoznim ćelijama ezofagusa (Zhu i sar., 2014). Godine 2014. objavljena su istraživanja sprovedena na eksperimentalnom modelu miša, u kome delecija 70 kb dugog regiona, ortolognog

humanom visokorizičnom segmentu HR 9p21, dovodi do razlike u ekspresiji iRNK gena *HACD4*, *CDKN2A*, *MTAP* i drugih (Kuo i sar., 2011). Uz to, delecija utiče i na dinamiku proliferacije vaskularnih glatkih mišićnih ćelija (Visel i sar., 2010).

U studiji koju smo sprovedeli je prvi put ispitana ekspresija iRNK gena *HACD4* u tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka i mononuklearnim ćelijama periferne krvi čoveka. U oba tkiva je detektovana ekspresija, ali bez statistički značajne asocijacije sa genotipovima varijanti u genu *HACD4*, kao i sa tipom karotidnog aterosklerotskog plaka. Naši rezultati pokazuju da mehanizam kojim ispitane genetičke varijante utiču na proces ateroskleroze ne podrazumeva regulaciju ekspresije gena *HACD4*. Ipak, rezultati se mogu tumačiti strogo kao preliminarni i trebalo bi ih potvrditi ili opovrgnuti u drugim studijama. Osim toga, karotidni plak je struktura koja se sastoji od različitih tipova ćelija i vanćelijskog materijala i potrebno je ispitati efekat genetičkih varijanti na ekspresiju gena u pojedinačnim tipovima ćelija, kao što su VGMĆ ili penaste ćelije. U našoj studiji nismo imali mogućnosti da laserskom disekcijom tkiva razdvojimo tipove ćelija i sprovedemo navedenu analizu.

Hipoteza koju smo postavili u okviru doktorske disertacije je da varijante rs36212560 i rs2275888 u genu *HACD4* utiču na njegovu ekspresiju, na nivou iRNK. Nismo ustanovili statistički značajnu asocijaciju u tkivu plaka. S obzirom da je varijanta rs2275888 ispitivana ranije i da je detektovana asocijacija sa ekspresijom gena *FOCAD* u tkivu tibijalne aorte od strane Gtex konzorijuma sprovedli smo replikacionu studiju u tkivu plaka (Ardlie i sar., 2015). U našoj studiji nosioci alela C su imali značajno viši nivo iRNK gena za *FOCAD* u tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka što je u skladu sa prethodnim rezultatom. Naša studija je za sada jedina objavila asocijaciju pomenute varijante sa ekspresijom iRNK *FOCAD* u tkivu karotidnog plaka čoveka. U skorašnjim studijama *FOCAD* je označen kao tumor supresor u glioblastomu i kolorektalnom karcinomu (Brockschmidt A 2012, Weren RD 2015). Iako je detektovan u srcu čoveka za sada se ne zna njegova uloga. *FOCAD* učestvuje u formiranju fokalnog adhezionog kompleksa (Brockschmidt i sar., 2012). Endotelne ćelije na račvajućim segmentima arterija reaguju na smicajući stres organizacijom citoskeleta i fokalnog kompleksa (Kazuo i sar., 2008). Fokalni adhezioni kompleks ima ulogu u ćelijskim procesima kao što su pokretljivost, proliferacija, diferencijacija, regulacija genske ekspresije i

preživljavanje (Dubash i sar., 2009). Tokom procesa aterogeneze glatke mišićne ćelije krvnih sudova podležu svim pomenutim procesima (diferencijacija, migracija, proliferacija). Iako se ne može reći koju funkciju ima FOCAD, pokazano je da interaguje sa genom za vinculin, koji ima ulogu u nastanku dilatacione kardiomiopatije (de Hoog i sar., 2004, Vasile i sar., 2006). Nismo detektovali statistički značajnu asocijaciju nivoa iRNK *CDKN2B* sa ultrasonografski definisanim tipom karotidnog plaka. Prethodno, Lesca i saradnici nisu detektovali asocijaciju u ekspresiji *CDKN2B* proteina sa fenotipom karotidnog plaka (Lesca i sar., 2011). Iako je rs10757278 značajno asociran sa tipom KP, na osnovu naših rezultata možemo reći da uticaj na ekspresiju *CDKN2B* nije mehanizam kojim se efekat ostvaruje. Ipak, kada se govori o ekspresiji kao o mehanizmu preko koga genske varijante ispoljavaju uticaj potrebno je istaći da pored *cis* uticaja, varijante mogu delovati i *trans* efektom na ekspresiju udaljenih gena (Cunnington i sar., 2010).

Uočljivo je da genske varijante koje su asocirane sa rizikom za ispoljavanje fenotipa mogu imati različiti *cis* efekat na ekspresiju proksimalnih gena u zavisnosti od tkiva u kome se ispituju. Genske varijante mogu imati efekat, tj. biti asocirane sa fenotipom i zavisno od drugih faktora rizika. U subkutanom adipoznom tkivu nije ustanovljena asocijacija između rs10757278 i ekspresije *CDKN2B*. Međutim, u modelu koji je korigovan na uticaj pola, godina i BMI pokazana je pozitivna korelacija između ekspresije *CDKN2B* i ređeg alela (Svensson i sar., 2014). Takođe, u istoj studiji prethodno ustanovljena asocijacija između BMI i *CDKN2B* postaje značajnija nakon korekcije na uticaj rs10757278 (Svenssen i sar., 2014). Autori su ustanovili inverznu korelaciju između ekspresije *CDKN2B* i gena koji utiču na adipogenezu i sintezu ektopičnih masti (Svensson i sar., 2014), koje povećavaju rizik za nastanak KVB (Lim S. i Meigs JB., 2014). Na taj način bi *CDKN2B* ekspresija i 9p21 genske varijante mogle imati indirektan uticaj na nastanak KVB.

U okviru ove doktorske disertacije, utvrdili smo statistički značajno sniženje relativne ekspresije iRNK gena *CDKN2B* u mononuklearnim ćelijama periferne krvi kod nosilaca rs10757278 G alela po dominantnom modelu nasleđivanja u grupi bolesnika sa IM. Ovaj rezultat je sličan rezultatu Yan i saradnika, koji su u T limfocitima periferne krvi detektovali sniženu ekspresiju na nivou iRNK kod nosilaca GG genotipa u odnosu na AA genotip u grupi zdravih ispitanika (Yan i sar., 2009). U

studiji koja je ispitivala asocijaciju haplotipova četiri genetičke varijante (rs10757274, rs2383206, rs2383297 i rs10757278) sa ekspresijom *CDKN2B* u MČPK detektovana je značajno povišena ekspresija kod nosioca haplotipa koji je asociiran sa povišenim rizikom za nastanak KBS (haplotip GGGG). Ovo je najveća studija koja je ispitivala ekspresiju u odnosu na genske varijante 9p21 u bilo kom tkivu čoveka (1098 uzoraka mononuklearnih ćelija periferne krvi) (Lesca i sar., 2010). U navedenoj studiji bolesnici kojima je izolovana RNK su imali različit stepen angiografski detektovane okluzije: od bolesnika bez detektovane koronarne bolesti srca sa angiografski normalnim koronarnim arterijama do bolesnika sa >50% stenozе u najmanje jednom krvnom sudu. Pri tom, niko od ispitanika nije doživeo infarkt miokarda (Lesca i sar., 2010). U našoj studiji smo ispitivali ekspresiju u MČPK bolesnika 6 meseci nakon prvog infarkta miokarda. Takođe, svi bolesnici uključeni u studiju su imali >50% stenozе. Treba imati u vidu i da su Lesca i saradnici testirali haplotip četiri genetičke varijante, dok je u okviru ove disertacije testirana samo jedna. Takođe, replikacija rezultata u punoj krvi (na 768 uzoraka) je pokazala snižen, ali ne statistički značajan, nivo ekspresije kod nosilaca GGGG haplotipa (Lesca i sar., 2010). U istoj studiji nije utvrđena statistički značajna asocijacija ekspresije iRNK za *CDKN2B* sa ispitivanim haplotipovima, u tkivu karotidnog plaka (Lesca i sar., 2010). Jarinova i saradnici su prijavili da nema značajne asocijacije varijante rs1333045 sa ekspresijom *CDKN2B* u punoj krvi zdravih individua (uzorak n = 124), ali kada su dodali uzorke 29 bolesnika sa KBS detektovali su sniženu ekspresiju (p = 0.038) kod homozigotnih nosilaca ređeg alela za rs1333045 (koji je u jakoj neravnoteži vezanosti sa rs1333049 odnosno rs10757278) (Jarinova i sar., 2009).

U početku su *CDKN2A* i *CDKN2B* smatrani primarnim genima kandidatima u ovom lokusu, ali situacija je znatno složenija. Iako u haplotipskom bloku važnom za rizik za KVB nema gena koji kodiraju proteine, region sadrži dugu nekodirajuću RNK, *ANRIL*, čija ekspresija je regulisana od strane genetičkih varijanti, i koja bi mogla da predstavlja ključni molekul koji utiče na patofiziologiju aterosklerotskog procesa (Lesca i sar., 2010; Cunnington i sar., 2010; Johnson i sar., 2013). Nekoliko studija je pokazalo da su aleli koji nose rizik često značajnije asociirani sa ekspresijom *ANRIL* nego sa drugim genima iz *INK/ARF* lokusa (Congrains i sar., 2012; Holdt i sar., 2010; Cunnington i sar., 2010). Predložen je mehanizam koji podrazumeva da 9p21 genske varijante posredstvom *ANRIL*-a deluju na ekspresiju *INK/ARF*, ali i drugih gena

(Kotake i sar., 2011; Yu i sar., 2008; Burdt i sar., 2010; Jarinova i sar., 2019; Yan i sar., 2009; Holdt i sar., 2010; Folkersen i sar., 2009). Postojanje mnogobrojnih pojačivača u 9p21.3 regionu sugerije da transkripti *CDKN2A/B/ANRIL* imaju kompleksnu vremensku i tkivno-specifičnu regulaciju (Harismendy i sar., 2011). Situaciju dodatno složenom čini to što *ANRIL* ima veliki broj različitih transkripcionih varijanti, koje su na različit način asocirane sa varijantama 9p21 i na različit način su korelisane sa ekspresijom drugih gena (Jarinova i sar., 2009, Cunnington i sar., 2010; Lesca i sar., 2010; Cristian i sar., 2010; Congrains i 2012; Zhang i sar., 2012). Takođe genske varijante koje su asocirane sa nastankom drugih patologija utiču i na ekspresiju *ANRIL*. Tako rs10811661-T i rs2383208-A iz 9p21, asocirane sa povišenim rizikom za nastanak dijabetesa, ali ne i sa KBS, asociraju sa sniženom ekspresijom *ANRIL*-a (Cunnington i sar., 2010). Ovo bi značilo da i drugi mehanizmi osim onih koji posreduju *ANRIL*-om utiču na nastanak bolesti.

Rezultat doktorske disertacije pokazuje da je ekspresija iRNK za *CDKN2B* snižena u MČPK bolesnika sa IM u odnosu na zdrave kontrole. Ovaj rezultat je u skladu sa rezultatima studije Shanker i saradnika iz 2014. godine, gde su u perifernoj krvi detektovali sniženu ekspresiju *CDKN2B* kod bolesnika sa KBS u odnosu na zdrave kontrole (Shanker i sar., 2014). Uz to, autori su pronašli i sniženu ekspresiju *CDKN2A*, *ARF* i *C9orf53* ali i *MTAP* i dve izoforme *ANRIL* (*NR_003529* i *EU741058*) (Shanker i sar., 2014). U drugoj studiji, ispitana je ekspresija *CDKN2A*, *CDKN2B* i *ANRIL* u mononuklearnim ćelijama periferne krvi kontrola i bolesnika sa ishemijskim moždanim udarom. Iako autori nisu uspeali da dobiju rezultat za *CDKN2B* zbog visokih Ct vrednosti, detektovali su sniženu ekspresiju *CDKN2A* i povišenu ekspresiju *ANRIL* kod bolesnika (Yang i sar., 2018). Može se smatrati da je i ovaj rezultat u skladu sa našim, s obzirom da su geni *INK/ARF* lokusa (*CDKN2A*, *CDKN2B* i *ANRIL*) ko-regulisani, sa *ANRIL*-om ekspresijom u suprotnom smeru (Congrains i sar., 2012; Cunnington i sar., 2010; Gil i sar., 2006; Pasmant i sar., 2007).

Genetičke varijante HR9p21, ispitane u ovoj studiji, su prvi put ispitane u populaciji Srbije. Rezultati studije govore u prilog postojanju polno specifičnih razlika u asocijaciji genetičkih varijanti rs10757278 i rs36212560, sa rizikom za nastanak KP i IM. Povećan rizik za nastanak KP kod nosioca ređeg genotipa varijante rs10757278 je detektovan samo kod žena, dok je u grupi muškaraca sa KP varijanta rs10757278

značajno asocirana sa ultrazvučno određenim fenotipom KP, odnosno formiranjem eholucentnog (komplikovanog) plaka kod muškaraca. Dodatne validacione studije na većem uzorku su potrebne da bi se potvrdili ovi rezultati.

Utvrđena je značajna asocijacija haplotipa genetičkih varijanti rs36212560 i rs2275888 sa povećanim rizikom za nastanak KP i IM kod muškaraca. Značajno je to što je ovaj rezultat repliciran u oba ispitana fenotipa (KP i IM) čime je povećan značaj pomenutih varijanti kao potencijalnih bioloških markera ateroskleroze. Ovo je prva studija u kojoj je ispitana i pokazana asocijacija pomenutih varijanti sa rizikom za nastanak ateroskleroze i kliničkih komplikacija (nastanak KP i IM, ulceracija KP i nastanak simptomatske karotidne bolesti) kod čoveka i potrebno je izvršiti dodatne replikacione studije, u drugim populacijama, kako bi se potvrdio značaj ispitivanih varijanti. Tek skorašnja studija je pripisala značaj proteina HACD4 u patologiji malignih tumora (Zhu i sar., 2014). Potrebno je svakako ispitati i funkcionalni značaj varijanti rs36212560 i rs2275888, naročito u tkivima relevantnim za nastanak ateroskleroze. U okviru ove studije utvrđeno je da alel G varijante rs10757278, koji nosi rizik za nastanak KP kod žena asocira sa sniženim nivoom iRNK *CDKN2B* gena u mononuklearnim ćelijama periferne krvi bolesnika sa IM, šest meseci nakon kliničkog događaja. Modulacija inflamatornog odgovora preko ekspresije *CDKN2B* bio mogao biti jedan od mehanizama kojim se ispoljava efekat rs10757278.

Genska varijanta rs2275888 je u grupi bolesnika sa karotidnim plakom bila značajno asocirana sa simptomatskom bolešću kod muškaraca. Ovo je genetički marker čiji značaj još uvek nije dovoljno istražen. S obzirom da smo pronašli asocijaciju rs2275888 sa nivoom iRNK gena *FOCAD* u tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka, ekspresija gena *FOCAD* bi bio potencijalni mehanizam kojim bi se modulirao nastanak i progresija ateroskleroze. *FOCAD* je još uvek nedovoljno istražen i naš rezultat ukazuje da bi ga trebalo detaljnije ispitati u budućim studijama.

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije sugerišu o potrebi za daljim integrativnim istraživanjem značaja i uloge genetičkih varijanti hromozomskog regiona 9p21 za rizik za nastanak i kliničke komplikacije ateroskleroze kod ljudi. Potrebno je sprovesti haplotipsku analizu efekta varijanti 9p21 na rizik za nastanak bolesti i kliničke komplikacije kao i na regulaciju transkripcije ciljnih gena. Nastavkom studije na većem uzorku bolesnika, sa proporcionalnim povećanjem broja učesnika u

fenotipskim podgrupama i podjednako zastupljenim učesnicima različitog pola, trebalo bi predložiti model izračunavanja rizika za nastanak ateroskleroze koji bi uključivao poligeni skor rizika (eng. *polygenic risk score*). Važno bi bilo nastaviti istraživanje asocijacije genetičkih varijanti sa ekspresijom gena u podfrakcijama ćelija krvi (mononuklearne ćelije krvi) *in vitro* i *ex vivo* u ćelijskom i tkivnom okruženju u kome su aktivirani procesi koji su aktivni tokom aterogeneze. Trebalo bi nastaviti prospektivno praćenje pacijenata nakon prvog IM u cilju procene asocijacije genetičkih varijanti sa srčanom insuficijencijom i ponovljenim kliničkim događajima. Integracija kliničkih i genetičkih podataka i rezultata je neophodna za nastavak istraživanja.

6 ZAKLJUČCI

1. Utvrđene su frekvencije alela i genotipova varijanti rs10757278 i rs518394 u genu *ANRIL*, rs36212560 i rs2275888 u genu *HACD4* u uzorku kontrola i bolesnika sa aterosklerozom iz populacije Srbije.
2. Nije detektovana značajna asocijacija varijante rs518394 sa nastankom karotidnog plaka i varijanti rs10757278 i rs518394 u genu *ANRIL* sa infarktom miokarda.
3. Uočena je polno specifična asocijacija genetičkih varijanti sa rizikom za nastanak ateroskleroze:
 - a. genotipa GG varijante rs10757278 u genu *ANRIL* sa povećanim rizikom za nastanak karotidnog plaka u grupi žena.
 - b. ređeg alela D varijante rs36212560 u genu *HACD4* sa povećanim rizikom za nastanak karotidnog plaka kod muškaraca i povećanim rizikom za nastanak infarkta miokarda u celoj grupi ispitanika i u grupi muškaraca.
4. Haplotip DT varijanti rs36212560 i rs2275888 u genu *HACD4* je nezavisni faktor rizika za nastanak karotidnog plaka i infarkta miokarda, u celoj grupi ispitanika i kod muškaraca.
5. Prisustvo alela G varijante rs10757278 u genu *ANRIL* predstavlja faktor rizika za razvoj komplikovanog (eholucentni) karotidnog plaka kod bolesnika sa karotidnim plakom.
6. Haplotip IC varijanti rs36212560 i rs2275888 u genu *HACD4* je protektivan za ispoljavanje simptoma bolesti kod bolesnika sa karotidnim plakom, u celom ispitanom uzorku i u grupi muškaraca.
7. Haplotipovi IC i DT varijanti rs36212560 i rs2275888 u genu *HACD4* imaju protektivan efekat za ulceraciju karotidnog plaka.

8. Nije utvrđena asocijacija varijanti rs10757278 i rs518394 u genu *ANRIL*, rs36212560 i rs2275888 u genu *HACD4* sa klasičnim kardiovaskularnim faktorima rizika.
9. Utvrđena je asocijacija alela C varijante rs2275888 u genu *HACD4* sa povišenim nivoom ekspresije gena *FOCAD* u tkivu karotidnog plaka
10. Utvrđen je snižen nivo ekspresije gena *CDKN2B* u mononuklearnim ćelijama periferne krvi kod bolesnika sa IM, 6 meseci nakon infarkta u odnosu na zdrave kontrole.
11. Utvrđena je asocijacija alela G varijante rs10757278 u genu *ANRIL* sa sniženim nivoom ekspresije gena *CDKN2B* u mononuklearnim ćelijama periferne krvi bolesnika sa IM, 6 meseci nakon infarkta;

7 LITERATURA

1. 1000 Genomes Project Consortium, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA, Abecasis GR. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68-74.
2. Abbott AL, Paraskevas KI, Kakkos SK, Golledge J, Eckstein HH, Diaz-Sandoval LJ, Cao L, Fu Q, Wijeratne T, Leung TW, Montero-Baker M, Lee BC, Pircher S, Bosc M, Dennekamp M, Ringleb P. Systematic of Guidelines for the Management of Asymptomatic and Symptomatic Carotid Stenosis. *Stroke*. 2015;46(11):3288-301.
3. AbdulAzeez S, Al-Nafie AN, Al-Shehri A, Borgio JF, Baranova EV, Al-Madan MS, Al-Ali RA, Al-Muhanna F, Al-Ali A, Al-Mansori M, Ibrahim MF, Asselbergs FW, Keating B, Koeleman BP, Al-Ali AK. Intronic Polymorphisms in the CDKN2B-AS1 Gene Are Strongly Associated with the Risk of Myocardial Infarction and Coronary Artery Disease in the Saudi Population. *Int J Mol Sci*. 2016;17(3):395.
4. Abdullah KG, Li L, Shen GQ, Hu Y, Yang Y, MacKinlay KG, Topol EJ, Wang QK. Four SNPs on chromosome 9p21 confer risk to premature, familial CAD and MI in an American Caucasian population (GeneQuest). *Ann Hum Genet*. 2008;72(5):654-7.
5. Ackers-Johnson M, Talasila A, Sage AP, Long X, Bot I, Morrell NW, Bennett MR, Miano JM, Sinha S. Myocardin regulates vascular smooth muscle cell inflammatory activation and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(4):817-28.
6. Adams RJ, Chimowitz MI, Alpert JS, Awad IA, Cerqueria MD, Fayad P, Taubert KA; Stroke Council and the Council on Clinical Cardiology of the American Heart Association; American Stroke Association. Coronary risk evaluation in patients with transient ischemic attack and ischemic stroke: a scientific statement for healthcare professionals from the Stroke Council and the Council on Clinical Cardiology of the American Heart Association/American Stroke Association. *Circulation*. 2003;108(10):1278-90.

7. Almontashiri NA, Fan M, Cheng BL, Chen HH, Roberts R, Stewart AF. Interferon- γ activates expression of p15 and p16 regardless of 9p21.3 coronary artery disease risk genotype. *J Am Coll Cardiol.* 2013;61(2):143-7.
8. Appelman Y, van Rijn BB, Ten Haaf ME, Boersma E, Peters SA. Sex differences in cardiovascular risk factors and disease prevention. *Atherosclerosis.* 2015;241(1):211-8.
9. Ardlie KG, Deluca DS, Segrè AV, Sullivan TJ, Young TR, Gelfand ET, et al. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilotanalysis: multitissue gene regulation in humans. *Science.* 2015;348(6235):648-60.
10. Assimes TL, Knowles JW, Basu A, Iribarren C, Southwick A, Tang H, Absher D, Li J, Fair JM, Rubin GD, Sidney S, Fortmann SP, Go AS, Hlatky MA, Myers RM, Risch N, Quertermous T. Susceptibility locus for clinical and subclinical coronary artery disease at chromosome 9p21 in the multi-ethnic ADVANCE study. *Hum Mol Genet.* 2008;17(15):2320-8.
11. Astrup A, Dyerberg J, Selbeck M, Stender S. Nutrition transition and its relationship to the development of obesity and related chronic diseases. *Obes Rev.* 2008;9 Suppl 1:48-52.
12. Boesten LS, Zadelaar AS, van Nieuwkoop A, Hu L, Jonkers J, van de Water B, Gijbels MJ, van der Made I, de Winther MP, Havekes LM, van Vlijmen BJ. Macrophage retinoblastoma deficiency leads to enhanced atherosclerosis development in ApoE-deficient mice. *FASEB J.* 2006;20(7):953-5.
13. Bova IY, Bornstein NM, Korczyn AD. Acute infection as a risk factor for ischemic stroke. *Stroke.* 1996;27(12):2204-6.
14. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968;97:77-89.
15. Bown MJ, Braund PS, Thompson J, London NJ, Samani NJ, Sayers RD. Association between the coronary artery disease risk locus on chromosome 9p21.3 and abdominal aortic aneurysm. *Circ Cardiovasc Genet.* 2008;1(1):39-42.

16. Bianchi T, Rufer N, MacDonald HR, Migliaccio M. The tumor suppressor p16Ink4a regulates T lymphocyte survival. *Oncogene*. 2006;25(29):4110-5.
17. Bies J, Sramko M, Fares J, Rosu-Myles M, Zhang S, Koller R, Wolff L. Myeloid-specific inactivation of p15Ink4b results in monocytosis and predisposition to myeloid leukemia. *Blood*. 2010;116(6):979-87.
18. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res*. 2014;114(12):1852-66. .
19. Bhanushali AA, Parmar N, Contractor A, Shah VT, Das BR. Variant on 9p21 is strongly associated with coronary artery disease but lacks association with myocardial infarction and disease severity in a population in Western India. *Arch Med Res*. 2011;42(6):469-74.
20. Byun J, Schwartz AG, Lusk C, Wenzlaff AS, de Andrade M, Mandal D, Gaba C, Yang P, You M, Kupert EY, Anderson MW, Han Y, Li Y, Qian D, Stilp A, Laurie C, Nelson S, Zheng W, Hung RJ, Gaborieau V, McKay J, Brennan P, Caporaso NE, Landi MT, Wu X, McLaughlin JR, Brhane Y, Bossé Y, Pinney SM, Bailey-Wilson JE, Amos CI. Genome-Wide Association Study of Familial Lung Cancer. *Carcinogenesis*. 2018. doi: 10.1093/carcin/bgy080. [Epub ahead of print]
21. Björck HM, Länne T, Alehagen U, Persson K, Rundkvist L, Hamsten A, Dahlström U, Eriksson P. Association of genetic variation on chromosome 9p21.3 and arterial stiffness. *J Intern Med*. 2009;265(3):373-81.
22. Braun-Dullaeus RC, Mann MJ, Dzau VJ. Cell cycle progression: new therapeutic target for vascular proliferative disease. *Circulation*. 1998;98(1):82-9..
23. Broadbent HM, Peden JF, Lorkowski S, Goel A, Ongen H, Green F, Clarke R, Collins R, Franzosi MG, Tognoni G, Seedorf U, Rust S, Eriksson P, Hamsten A, Farrall M, Watkins H; PROCARDIS consortium. Susceptibility to coronary artery disease and diabetes is encoded by distinct, tightly linked SNPs in the ANRIL locus on chromosome 9p. *Hum Mol Genet*. 2008;17(6):806-14.
24. Brockschmidt A, Trost D, Peterziel H, Zimmermann K, Ehrler M, Grassmann H, Pfenning PN, Waha A, Wohlleber D, Brockschmidt FF, Jugold M, Hoischen A, Kalla C, Waha A, Seifert G, Knolle PA, Latz E, Hans VH, Wick W, Pfeifer A,

- Angel P, Weber RG. KIAA1797/FOCAD encodes a novel focal adhesion protein with tumour suppressor function in gliomas. *Brain*. 2012;135(Pt 4):1027-41.
25. Cánepa ET, Scassa ME, Ceruti JM, Marazita MC, Carcagno AL, Sirkin PF, OgaraMF. INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life*. 2007;59(7):419-26. .
26. Cunningham KS, Gotlieb AI. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab Invest*. 2005;85(1):9-23. .
27. CARDIoGRAMplusC4D Consortium, Deloukas P, Kanoni S, Willenborg C, Farrall M, Assimes TL, Thompson JR, Ingelsson E, Saleheen D, Erdmann J, Goldstein BA, Stirrups K, König IR, Cazier JB, Johansson A, Hall AS, Lee JY, Willer CJ, Chambers JC, Esko T, Folkersen L, Goel A, Grundberg E, Havulinna AS, Ho WK, Hopewell JC, Eriksson N, Kleber ME, Kristiansson K, Lundmark P, Lytikäinen LP, Rafelt S, Shungin D, Strawbridge RJ, Thorleifsson G, Tikkanen E, Van Zuydam N, Voight BF, Waite LL, Zhang W, Ziegler A, Absher D, Altshuler D, Balmforth AJ, Barroso I, Braund PS, Burgdorf C, Claudi-Boehm S, Cox D, Dimitriou M, Do R; DIAGRAM Consortium; CARDIOGENICS Consortium, Doney AS, El Mokhtari N, Eriksson P, Fischer K, Fontanillas P, Franco-Cereceda A, Gigante B, Groop L, Gustafsson S, Hager J, Hallmans G, Han BG, Hunt SE, Kang HM, Illig T, Kessler T, Knowles JW, Kolovou G, Kuusisto J, Langenberg C, Langford C, Leander K, Lokki ML, Lundmark A, McCarthy MI, Meisinger C, Melander O, Mihailov E, Maouche S, Morris AD, Müller-Nurasyid M; MuTHER Consortium, Nikus K, Peden JF, Rayner NW, Rasheed A, Rosinger S, Rubin D, Rumpf MP, Schäfer A, Sivananthan M, Song C, Stewart AF, Tan ST, Thorgeirsson G, van der Schoot CE, Wagner PJ; Wellcome Trust Case Control Consortium, Wells GA, Wild PS, Yang TP, Amouyel P, Arveiler D, Basart H, Boehnke M, Boerwinkle E, Brambilla P, Cambien F, Cupples AL, de Faire U, Dehghan A, Diemert P, Epstein SE, Evans A, Ferrario MM, Ferrières J, Gauguier D, Go AS, Goodall AH, Gudnason V, Hazen SL, Holm H, Iribarren C, Jang Y, Kähönen M, Kee F, Kim HS, Klopp N, Koenig W, Kratzer W, Kuulasmaa K, Laakso M, Laaksonen R, Lee JY, Lind L, Ouwehand WH, Parish S, Park JE, Pedersen NL, Peters A,

- Quertermous T, Rader DJ, Salomaa V, Schadt E, Shah SH, Sinisalo J, Stark K, Stefansson K, Trégouët DA, Virtamo J, Wallentin L, Wareham N, Zimmermann ME, Nieminen MS, Hengstenberg C, Sandhu MS, Pastinen T, Syvänen AC, Hovingh GK, Dedoussis G, Franks PW, Lehtimäki T, Metspalu A, Zalloua PA, Siegbahn A, Schreiber S, Ripatti S, Blankenberg SS, Perola M, Clarke R, Boehm BO, O'Donnell C, Reilly MP, März W, Collins R, Kathiresan S, Hamsten A, Kooner JS, Thorsteinsdottir U, Danesh J, Palmer CN, Roberts R, Watkins H, Schunkert H, Samani NJ. Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nat Genet.* 2013;45(1):25-33.
28. CARDIoGRAMplusC4D Consortium, Deloukas P, Kanoni S, Willenborg C, Farrall M, Assimes TL. Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nat Genet.* 2013;45(1):25-33.
29. Chan K, Patel RS, Newcombe P, Nelson CP, Qasim A, Epstein SE, Burnett S, Vaccarino VL, Zafari AM, Shah SH, Anderson JL, Carlquist JF, Hartiala J, Allayee H, Hinohara K, Lee BS, Erl A, Ellis KL, Goel A, Schaefer AS, El Mokhtari NE, Goldstein BA, Hlatky MA, Go AS, Shen GQ, Gong Y, Pepine C, Laxton RC, Whittaker JC, Tang WH, Johnson JA, Wang QK, Assimes TL, Nöthlings U, Farrall M, Watkins H, Richards AM, Cameron VA, Muendlein A, Drexel H, Koch W, Park JE, Kimura A, Shen WF, Simpson IA, Hazen SL, Horne BD, Hauser ER, Quyyumi AA, Reilly MP, Samani NJ, Ye S. Association between the chromosome 9p21 locus and angiographic coronary artery disease burden: a collaborative meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2013;61(9):957-70.
30. Cakmak HA, evaluation of association between common genetic variants on chromosome 9p21 and coronary artery disease in Turkish population. *Anatol J Cardio.* 2015;15(3):196-203.
31. Congrains A, Kamide K, Oguro R, Yasuda O, Miyata K, Yamamoto E, Kawai T, Kusunoki H, Yamamoto H, Takeya Y, Yamamoto K, Onishi M, Sugimoto K, Katsuya T, Awata N, Ikebe K, Gondo Y, Oike Y, Ohishi M, Rakugi H. Genetic variants at the 9p21 locus contribute to atherosclerosis through modulation of ANRIL and CDKN2A/B. *Atherosclerosis.* 2012;220(2):449-55.
32. Cunnington MS, Mayosi BM, Hall DH, Avery PJ, Farrall M, Vickers MA, Watkins H, Keavney B. Novel genetic variants linked to coronary artery disease

- by genome-wide association are not associated with carotid artery intima-media thickness or intermediate risk phenotypes. *Atherosclerosis*. 2009;203(1):41-4.
33. Cunnington MS, Santibanez Koref M, Mayosi BM, Burn J, Keavney B. Chromosome9p21 SNPs Associated with Multiple Disease Phenotypes Correlate with ANRILExpression. *PLoS Genet*. 2010;6(4):e1000899.
34. Crowther MA. Pathogenesis of atherosclerosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005:436-41.
35. Danis VA, Millington M, Hyland VJ, Grennan D. Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptorantagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. *Clin Exp Immunol*. 1995;99(2):303-10.
36. Diabetes Genetics Initiative of Broad Institute of Harvard and MIT, LundUniversity, and Novartis Institutes of BioMedical Research, Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burt NP, de Bakker PI, Chen H, Roix JJ, Kathiresan S, Hirschhorn JN, Daly MJ, Hughes TE, Groop L, Altshuler D, Almgren P, Florez JC, Meyer J, Ardlie K, Bengtsson Boström K, Isomaa B, Lettre G, Lindblad U, Lyon HN, Melander O, Newton-Cheh C, Nilsson P, Orho-Melander M, Råstam L, Speliotes EK, Taskinen MR, Tuomi T, Guiducci C, Berglund A, Carlson J, Gianniny L, Hackett R, Hall L, Holmkvist J, Laurila E, Sjögren M, Sterner M, Surti A, Svensson M, Svensson M, Tewhey R, Blumenstiel B, Parkin M, Defelice M, Barry R, Brodeur W, Camarata J, Chia N, Fava M, Gibbons J, Handsaker B, Healy C, Nguyen K, Gates C, Sougnez C, Gage D, Nizzari M, Gabriel SB, Chirn GW, Ma Q, Parikh H, Richardson D, Riche D, Purcell S. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science*. 2007;316(5829):1331-6.
37. Dichgans M, Malik R, König IR, Rosand J, Clarke R, Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Mitchell BD, Assimes TL, Levi C, O'Donnell CJ, Fornage M, Thorsteinsdottir U, Psaty BM, Hengstenberg C, Seshadri S, Erdmann J, Bis JC, Peters A, Boncoraglio GB, März W, Meschia JF, Kathiresan S, Ikram MA, McPherson R, Stefansson K, Sudlow C, Reilly MP, Thompson JR, Sharma P, Hopewell JC, Chambers JC, Watkins H, Rothwell PM, Roberts R, Markus HS, Samani NJ, Farrall M, Schunkert H; METASTROKE Consortium;

- CARDIoGRAM Consortium; C4D Consortium; International Stroke Genetics Consortium. Shared genetic susceptibility to ischemic stroke and coronary artery disease: a genome-wide analysis of common variants. *Stroke*. 2014;45(1):24-36.
38. Ding H, Xu Y, Wang X, Wang Q, Zhang L, Tu Y, Yan J, Wang W, Hui R, Wang CY, Wang DW. 9p21 is a shared susceptibility locus strongly for coronary artery disease and weakly for ischemic stroke in Chinese Han population. *Circ Cardiovasc Genet*. 2009;2(4):338-46.
39. Dehghan A, Bis JC, White CC, Smith AV, Morrison AC, Cupples LA, Trompet S, Chasman DI, Lumley T, Völker U, Buckley BM, Ding J, Jensen MK, Folsom AR, Kritchevsky SB, Girman CJ, Ford I, Dörr M, Salomaa V, Uitterlinden AG, Eiriksdottir G, Vasán RS, Franceschini N, Carty CL, Virtamo J, Demissie S, Amouyel P, Arveiler D, Heckbert SR, Ferrières J, Ducimetière P, Smith NL, Wang YA, Siscovick DS, Rice KM, Wiklund PG, Taylor KD, Evans A, Kee F, Rotter JJ, Karvanen J, Kuulasmaa K, Heiss G, Kraft P, Launer LJ, Hofman A, Markus MR, Rose LM, Silander K, Wagner P, Benjamin EJ, Lohman K, Stott DJ, Rivadeneira F, Harris TB, Levy D, Yan Y, Rimm EB, Jukema JW, Völzke H, Ridker PM, Blankenberg S, Franco OH, Gudnason V, Psaty BM, Boerwinkle E, O'Donnell CJ. Genome-Wide Association Study for Incident Myocardial Infarction and Coronary Heart Disease in Prospective Cohort Studies: The CHARGE Consortium. *PLoS One*. 2016;11(3):e0144997.
40. Dehghan A, van Hoek M, Sijbrands EJ, Oostra BA, Hofman A, van Duijn CM, Witteman JC. Lack of association of two common polymorphisms on 9p21 with risk of coronary heart disease and myocardial infarction; results from a prospective cohort study. *BMC Med*. 2008;6:30.
41. del Zoppo GJ. The role of platelets in ischemic stroke. *Neurology*. 1998;51(3 Suppl 3):S9-14.
42. De Hoog CL, Foster LJ, Mann M. RNA and RNA binding proteins participate in early stages of cell spreading through spreading initiation centers. *Cell*. 2004;117(5):649-62.
43. Dubash AD, Menold MM, Samson T, Boulter E, García-Mata R, Doughman R, Burridge K. Chapter 1. Focal adhesions: new angles on an old structure. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2009;277:1-65.

44. Eliasziw M, Streifler JY, Fox AJ, Hachinski VC, Ferguson GG, Barnett HJ. Significance of plaque ulceration in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial. *Stroke*. 1994;25(2):304-8.
45. El-Menyar AA, Rizk NM, Al-Qahtani A, AlKindi F, Elyas A, Farag F, Bakhsh FD, Ebrahim S, Ahmed E, Al-Khinji M, Al-Thani H, Suwaidi JA. The cardiovascular implication of single nucleotide polymorphisms of chromosome 9p21 locus among Arab population. *J Res Med Sci*. 2015;20(4):346-52.
46. Emanuele E, Lista S, Ghidoni R, Binetti G, Cereda C, Benussi L, Maletta R, Bruni AC, Politi P. Chromosome 9p21.3 genotype is associated with vascular dementia and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2011;32(7):1231-5.
47. Erickson S, Sangfelt O, Heyman M, Castro J, Einhorn S, Grandér D. Involvement of the Ink4 proteins p16 and p15 in T-lymphocyte senescence. *Oncogene*. 1998;17(5):595-602.
48. Foroughmand AM, Nikkhah E, Galehdari H, Jadbabae MH. Association Study between Coronary Artery Disease and rs1333049 and rs10757274 Polymorphisms at 9p21 Locus in South-West Iran . *Cell Journal (Yakhteh)*. 2015;17(1):89-98.
49. Feeley TM, Leen EJ, Colgan MP, Moore DJ, Hourihane DO, Shanik GD. Histologic characteristics of carotid artery plaque. *J Vasc Surg*. 1991;13(5):719-24.
50. Finn AV, Nakano M, Narula J, Kolodgie FD, Virmani R. Concept of vulnerable/unstable plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(7):1282-92.
51. Folkersen L, Kyriakou T, Goel A, Peden J, Mälarstig A, Paulsson-Berne G, Hamsten A, Hugh Watkins, Franco-Cereceda A, Gabrielsen A, Eriksson P; PROCARDIS consortia. Relationship between CAD risk genotype in the chromosome 9p21 locus and gene expression. Identification of eight new ANRIL splice variants. *PLoS One*. 2009;4(11):e7677.
52. Foulkes WD, Flanders TY, Pollock PM, Hayward NK. The CDKN2A (p16) gene and human cancer. *Mol Med*. 1997 Jan;3(1):5-20. .

53. Foroud T, Koller DL, Lai D, Sauerbeck L, Anderson C, Ko N, Deka R, Mosley TH, Fornage M, Woo D, Moomaw CJ, Hornung R, Huston J, Meissner I, Bailey-Wilson JE, Langefeld C, Rouleau G, Connolly ES, Worrall BB, Kleindorfer D, Flaherty ML, Martini S, Mackey J, De Los Rios La Rosa F, Brown RD Jr, Broderick JP; FIA Study Investigators. Genome-wide association study of intracranial aneurysms confirms role of Anril and SOX17 in disease risk. *Stroke*. 2012;43(11):2846-52.
54. George J, Rapsomaniki E, Pujades-Rodriguez M, et al. How does cardiovascular disease first present in women and men? Incidence of 12 cardiovascular diseases in a contemporary cohort of 1,937,360 people. *Circulation* 2015;132:1320–8.
55. Gil J, Peters G. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(9):667-77.
56. Goes E, Janssens W, Maillet B, Freson M, Steyaert L, Osteaux M. Tissue characterization of atheromatous plaques: correlation between ultrasound image and histological findings. *J Clin Ultrasound*. 1990;18(8):611-7.
57. Gimbrone MA Jr, Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardeña G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;902:230-9; discussion 239-40.
58. Gu F, Pfeiffer RM, Bhattacharjee S, Han SS, Taylor PR, Berndt S, Yang H, Sigurdson AJ, Toro J, Mirabello L, Greene MH, Freedman ND, Abnet CC, Dawsey SM, Hu N, Qiao YL, Ding T, Brenner AV, Garcia-Closas M, Hayes R, Brinton LA, Lissowska J, Wentzensen N, Kratz C, Moore LE, Ziegler RG, Chow WH, Savage SA, Burdette L, Yeager M, Chanock SJ, Chatterjee N, Tucker MA, Goldstein AM, Yang XR. Common genetic variants in the 9p21 region and their associations with multiple tumours. *Br J Cancer*. 2013;108(6):1378-86.
59. Grainger DJ. Transforming growth factor beta and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(3):399-404.
60. Grange M, Giordano M, Mas A, Roncagalli R, Firaguay G, Nunes JA, Ghysdael J, Schmitt-Verhulst AM, Auphan-Anezin N. Control of CD8 T cell proliferation and terminal differentiation by active STAT5 and CDKN2A/CDKN2B. *Immunology*. 2015;145(4):543-57.

61. Grau AJ, Buggle F, Heindl S, Steichen-Wiehn C, Banerjee T, Maiwald M, Rohlf M, Suhr H, Fiehn W, Becher H, et al. Recent infection as a risk factor for cerebrovascular ischemia. *Stroke*. 1995;26(3):373-9.
62. Gray-Weale AC, Graham JC, Burnett JR, Byrne K, Lusby RJ. Carotid artery atheroma: comparison of preoperative B-mode ultrasound appearance with carotid endarterectomy specimen pathology. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 1988;29(6):676-81.
63. Grønholdt ML, Nordestgaard BG, Wiebe BM, Wilhjelm JE, Sillesen H. Echolucency of computerized ultrasound images of carotid atherosclerotic plaques are associated with increased levels of triglyceride-rich lipoproteins as well as increased plaque lipid content. *Circulation*. 1998;97(1):34-40.
64. Gschwendtner A, Bevan S, Cole JW, Plourde A, Matarin M, Ross-Adams H, Meitinger T, Wichmann E, Mitchell BD, Furie K, Slowik A, Rich SS, Syme PD, MacLeod MJ, Meschia JF, Rosand J, Kittner SJ, Markus HS, Müller-Myhsok B, Dichgans M; International Stroke Genetics Consortium. Sequence variants on chromosome 9p21.3 confer risk for atherosclerotic stroke. *Ann Neurol*. 2009;65(5):531-9.
65. Hartman J, Frishman WH. Inflammation and atherosclerosis: a role of interleukin-6 in the development of atherosclerosis and the potential for targeted drug therapy. *Cardiol Rev*. 2014;22(3):147-51.
66. Hannon GJ, Beach D. p15^{INK4B} is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*. 1994;371(6494):257-61.
67. Hayward NK. Genetics of melanoma predisposition. *Oncogene*. 2003;22(20):3053-62.
68. Hegele RA. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat Rev Genet*. 2009 Feb;10(2):109-21.
69. Helgadóttir A, Thorleifsson G, Manolescu A, Gretarsdóttir S, Blondal T, Jonasdóttir A, Jonasdóttir A, Sigurdsson A, Baker A, Palsson A, Masson G, Gudbjartsson DF, Magnusson KP, Andersen K, Levey AI, Backman VM, Matthíasdóttir S, Jonsdóttir T, Palsson S, Einarsdóttir H, Gunnarsdóttir S, Gylfason A, Vaccarino V, Hooper WC, Reilly MP, Granger CB, Austin H, Rader DJ, Shah SH, Quyyumi AA, Gulcher JR, Thorgeirsson G, Thorsteinsdóttir

- U, Kong A, Stefansson K. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science*. 2007;316(5830):1491-3.
70. Helgadóttir A, Thorleifsson G, Magnusson KP, Grétarsdóttir S, Steinthorsdóttir V, Manolescu A, Jones GT, Rinkel GJ, Blankensteijn JD, Ronkainen A, Jääskeläinen JE, Kyo Y, Lenk GM, Sakalihasan N, Kostulas K, Gottsäter A, Flex A, Stefansson H, Hansen T, Andersen G, Weinsheimer S, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Shah SH, Quyyumi AA, Granger CB, Reilly MP, Austin H, Levey AI, Vaccarino V, Palsdóttir E, Walters GB, Jonsdóttir T, Snorradóttir S, Magnusdóttir D, Gudmundsson G, Ferrell RE, Sveinbjornsdóttir S, Hernesniemi J, Niemelä M, Limet R, Andersen K, Sigurdsson G, Benediktsson R, Verhoeven EL, Teijink JA, Grobbee DE, Rader DJ, Collier DA, Pedersen O, Pola R, Hillert J, Lindblad B, Valdimarsson EM, Magnadóttir HB, Wijmenga C, Tromp G, Baas AF, Ruigrok YM, van Rij AM, Kuivaniemi H, Powell JT, Matthiasson SE, Gulcher JR, Thorgeirsson G, Kong A, Thorsteinsdóttir U, Stefansson K. The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. *Nat Genet*. 2008;40(2):217-24.
71. Hellerbrand C, Mühlbauer M, Wallner S, Schuierer M, Behrmann I, Bataille F, Weiss T, Schölmerich J, Bosserhoff AK. Promoter-hypermethylation is causing functional relevant downregulation of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) expression in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*. 2006;27(1):64-72.
72. Hellwege JN, Keaton JM, Giri A, Gao X, Velez Edwards DR, Edwards TL. Population Stratification in Genetic Association Studies. *Curr Protoc Hum Genet*. 2017;95:1.22.1-1.22.23.
73. Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circ Res*. 2016;118(4):535-46.
74. Hou L, Bergen SE, Akula N, Song J, Hultman CM, Landén M, Adli M, Alda M, Ardaur R, Arias B, Aubry JM, Backlund L, Badner JA, Barrett TB, Bauer M, Baune BT, Bellivier F, Benabarro A, Bengesser S, Berrettini WH, Bhattacharjee AK, Biernacka JM, Birner A, Bloss CS, Brichant-Petitjean C, Bui ET, Byerley W, Cervantes P, Chillotti C, Cichon S, Colom F, Coryell W, Craig DW,

- Cruceanu C, Czerski PM, Davis T, Dayer A, Degenhardt F, Del Zompo M, DePaulo JR, Edenberg HJ, Étain B, Falkai P, Foroud T, Forstner AJ, Frisén L, Frye MA, Fullerton JM, Gard S, Garnham JS, Gershon ES, Goes FS, Greenwood TA, Grigoriou-Serbanescu M, Hauser J, Heilbronner U, Heilmann-Heimbach S, Herms S, Hipolito M, Hitturlingappa S, Hoffmann P, Hofmann A, Jamain S, Jiménez E, Kahn JP, Kassem L, Kelsoe JR, Kittel-Schneider S, Kliwicki S, Koller DL, König B, Lackner N, Laje G, Lang M, Lavebratt C, Lawson WB, Leboyer M, Leckband SG, Yan C, Maaser A, Mahon PB, Maier W, Maj M, Manchia M, Martinsson L, McCarthy MJ, McElroy SL, McInnis MG, McKinney R, Mitchell PB, Mitjans M, Mondimore FM, Monteleone P, Mühleisen TW, Nievergelt CM, Nöthen MM, Novák T, Nurnberger JI Jr, Nwulia EA, Ösby U, Pfennig A, Potash JB, Propping P, Reif A, Reininghaus E, Rice J, Rietschel M, Rouleau GA, Rybakowski JK, Schalling M, Scheftner WA, Schofield PR, Schork NJ, Schulze TG, Schumacher J, Schweizer BW, Severino G, Shekhtman T, Shilling PD, Simhandl C, Slaney CM, Smith EN, Squassina A, Stamm T, Stopkova P, Streit F, Strohmaier J, Szelinger S, Tighe SK, Tortorella A, Turecki G, Vieta E, Volkert J, Witt SH, Wright A, Zandi PP, Zhang P, Zollner S, McMahon FJ. Genome-wide association study of 40,000 individuals identifies two novel loci associated with bipolar disorder. *Hum Mol Genet.* 2016;25(15):3383-3394.
75. Horne BD, Carlquist JF, Muhlestein JB, Bair TL, Anderson JL. Association of variation in the chromosome 9p21 locus with myocardial infarction versus chronic coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Genet.* 2008;1(2):85-92.
76. Hinohara K, Nakajima T, Takahashi M, Hohda S, Sasaoka T, Nakahara K, Chida K, Sawabe M, Arimura T, Sato A, Lee BS, Ban JM, Yasunami M, Park JE, Izumi T, Kimura A. Replication of the association between a chromosome 9p21 polymorphism and coronary artery disease in Japanese and Korean populations. *J Hum Genet.* 2008;53(4):357-9.
77. Holdt LM, Beutner F, Scholz M, Gielen S, Gäbel G, Bergert H, Schuler G, Thiery J, Teupser D. ANRIL expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(3):620-7.

78. Holdt LM, Sass K, Gäbel G, Bergert H, Thiery J, Teupser D. Expression of Chr9p21 genes CDKN2B (p15(INK4b)), CDKN2A (p16(INK4a), p14(ARF)) and MTAP in human atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis*. 2011;214(2):264-70.
79. Hunt JL, Fairman R, Mitchell ME, Carpenter JP, Golden M, Khalapyan T, Wolfe M, Neschis D, Milner R, Scoll B, Cusack A, Mohler ER 3rd. Bone formation in carotid plaques: a clinicopathological study. *Stroke*. 2002;33(5):1214-9.
80. Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanovi Batut“. Izveštaj za akutni koronarni sindrom u Srbiji 2010. <http://www.batut.org.rs/download/publikacije/Registar%20za%20akutni%20koronarni%20sindrom%20u%20Srbiji%202010.pdf>
81. Ishizu T, Seo Y, Machino T, Kawamura R, Kimura T, Murakoshi N, Sato A, Takeyasu N, Watanabe S, Aonuma K. Prognostic impact of plaque echolucency in combination with inflammatory biomarkers on cardiovascular outcomes of coronary artery disease patients receiving optimal medical therapy. *Atherosclerosis*. 2011;216(1):120-4.
82. Jarinova O, Stewart AF, Roberts R, Wells G, Lau P, Naing T, Buerki C, McLean BW, Cook RC, Parker JS, McPherson R. Functional analysis of the chromosome 9p21.3 coronary artery disease risk locus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(10):1671-7.
83. Jousilahti P, Vartiainen E, Tuomilehto J, Puska P. Sex, age, cardiovascular risk factors, and coronary heart disease: a prospective follow-up study of 14 786 middle-aged men and women in Finland. *Circulation*. 1999;99(9):1165-72.
84. Kamb, A., Gruis, N. A., Weaver-Feldhaus, J., Yan, Q., Harshman, K., Tavtigian, S. V., Stockert, E., Day, R. S., III, Johnson, B. E., Skolnick, M. H. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264: 436-440, 1994.
85. Katoh K, Kano Y, Ookawara S. Role of stress fibers and focal adhesions as a mediator for mechano-signal transduction in endothelial cells in situ. *Vasc Health Risk Manag*. 2008;4(6):1273-82. .

86. Kim JA, Hong S, Lee B, Hong JW, Kwak JY, Cho S, Kim CC. The inhibition of T-cells proliferation by mouse mesenchymal stem cells through the induction of p16INK4A-cyclin D1/cdk4 and p21waf1, p27kip1-cyclin E/cdk2 pathways. *Cell Immunol.* 2007;245(1):16-23.
87. Kim JB, Deluna A, Mungrue IN, Vu C, Pouldar D, Civelek M, Orozco L, Wu J, Wang X, Charugundla S, Castellani LW, Rusek M, Jakubowski H, Lysis AJ. Effect of 9p21.3 coronary artery disease locus neighboring genes on atherosclerosis in mice. *Circulation.* 2012;126(15):1896-906.
88. Kim-Kaneyama JR, Wachi N, Sata M, Enomoto S, Fukabori K, Koh K, Shibamura M, Nose K. Hic-5, an adaptor protein expressed in vascular smooth muscle cells, modulates the arterial response to injury in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;376(4):682-7.
89. Kihara A. Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders. *J Biochem.* 2012;152(5):387-95.
90. Koch W, Türk S, Erl A, Hoppmann P, Pfeufer A, King L, Schömig A, Kastrati A. The chromosome 9p21 region and myocardial infarction in a European population. *Atherosclerosis.* 2011;217(1):220-6.
91. Kojima Y, Downing K, Kundu R, Miller C, Dewey F, Lancero H, Raaz U, Perisic L, Hedin U, Schadt E, Maegdefessel L, Quertermous T, Leeper NJ. Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B regulates efferocytosis and atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2014;124(3):1083-97.
92. Konstam MA, Kramer DG, Patel AR, Maron MS, Udelson JE. Left ventricular remodeling in heart failure: current concepts in clinical significance and assessment. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2011;4(1):98-108.
93. Korkmaz Ş, Demirkan B, Altay H, Refiker Ege M, Çaldır V, Yılmaz MB, Güray Y, Güray Ü, Şaşmaz H. Serum creatinine is independently associated with angiographic extent of coronary artery disease in patients with stable angina pectoris. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2011;11(5):407-13.
94. Kotake Y, Nakagawa T, Kitagawa K, Suzuki S, Yan N, Kitagawa M, Xiong Y. Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15(INK4B) tumor suppressor gene. *Oncogene.* 2011;30(16):1956-62.

95. Knowles JW, Ashley EA. Cardiovascular disease: The rise of the genetic risk score. *PLoS Med.* 2018;15(3):e1002546.
96. Kunkel LM, Smith KD, Boyer SH, Borgaonkar DS, Wachtel SS, Miller OJ, Breg WR, Jones HW Jr, Rary JM. Analysis of human Y-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(3):1245-9.
97. Krimpenfort P, Ijpenberg A, Song JY, van der Valk M, Nawijn M, Zevenhoven J, Berns A. p15Ink4b is a critical tumour suppressor in the absence of p16Ink4a. *Nature.* 2007;448(7156):943-6.
98. Langsfeld M, Gray-Weale AC, Lusby RJ. The role of plaque morphology and diameter reduction in the development of new symptoms in asymptomatic carotid arteries. *J Vasc Surg.* 1989;9(4):548-57.
99. Lander ES. The new genomics: global views of biology. *Science.* 1996;274(5287):536-9.
100. Laston SL, Voruganti VS, Haack K, Shah VO, Bobelu A, Bobelu J, Ghahate D, Harford AM, Paine SS, Tentori F, Cole SA, MacCluer JW, Comuzzie AG, Zager PG. Genetics of kidney disease and related cardiometabolic phenotypes in Zuni Indians: the Zuni Kidney Project. *Front Genet.* 2015;6:6.
101. Li WQ, Pfeiffer RM, Hyland PL, Shi J, Gu F, Wang Z, Bhattacharjee S, Luo J, Xiong X, Yeager M, Deng X, Hu N, Taylor PR, Albanes D, Caporaso NE, Gapstur SM, Amundadottir L, Chanock SJ, Chatterjee N, Landi MT, Tucker MA, Goldstein AM, Yang XR. Genetic polymorphisms in the 9p21 region associated with risk of multiple cancers. *Carcinogenesis.* 2014;35(12):2698-705.
102. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002;420(6917):868-74.
103. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation.* 2005;111(25):3481-8. .
104. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature.* 2011;473(7347):317-25. .
105. Lim S, Meigs JB. Links between ectopic fat and vascular disease in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(9):1820-6.
106. Yan Y, Sanoff HK, Cho H, Burd CE, Torrice C, Mohlke KL, Ibrahim JG, Thomas NE, Sharpless NE. INK4/ARF transcript expression is associated with

- chromosome 9p21 variants linked to atherosclerosis. *PLoS One*. 2009;4(4):e5027.
107. Yan J, Yan Y, Chen J, Hu C, Teng M, Jiao K, Shen Z, Zhu D, Yue J, Li Z, Li Y. The ROS-mediated activation of IL-6/STAT3 signaling pathway is involved in the 27-hydroxycholesterol-induced cellular senescence in nerve cells. *Toxicol In Vitro*. 2017;45(Pt 1):10-18.
108. Lippi G, Franchini M, Targher G. Arterial thrombus formation in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*. 2011;8(9):502-12.
109. Lemmens R, Abboud S, Robberecht W, Vanhees L, Pandolfo M, Thijs V, Goris A. Variant on 9p21 strongly associates with coronary heart disease, but lacks association with common stroke. *Eur J Hum Genet*. 2009 Oct;17(10):1287-93.
110. Leeper NJ, Raiesdana A, Kojima Y, Kundu RK, Cheng H, Maegdefessel L, Toh R, Ahn GO, Ali ZA, Anderson DR, Miller CL, Roberts SC, Spin JM, de Almeida PE, W, JC, Xu B, Cheng K, Quertermous M, Kundu S, Kortekaas KE, Berzin E, Downing KP, Dalman RL, Tsao PS, Schadt EE, Owens GK, Quertermous T. Loss of CDKN2B promotes p53-dependent smooth muscle cell apoptosis and aneurysm formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(1):e1-e10.
111. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407(6801):233-41.
112. Lusk CM, Dyson G, Clark AG, Ballantyne CM, Frikke-Schmidt R, Tybjaerg-Hansen A, Boerwinkle E, Sing CF. Validated context-dependent associations of coronary heart disease risk with genotype variation in the chromosome 9p21 region: the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Hum Genet*. 2014;133(9):1105-16.
113. Maksimov VN, Kulikov IV, Orlov PS, Gafarov VV, MaYantina SK, Romashchenko AG, Voevoda MI. [Evaluation of association between 9 genetic polymorphism and myocardial infarction in the Siberian population]. *Vestn Ross Akad Med Nauk*. 2012;(5):24-9. Russian
114. Murray CJ, Lopez AD. Measuring the global burden of disease. *N Engl J Med*. 2013;369(5):448-57. .

115. Matarin M, Brown WM, Singleton A, Hardy JA, Meschia JF; ISGS investigators. Whole genome analyses suggest ischemic stroke and heart disease share an association with polymorphisms on chromosome 9p21. *Stroke*. 2008;39(5):1586-9.
116. Mathiesen EB, Joakimsen O, Bønaa KH. Prevalence of and risk factors associated with carotid artery stenosis: the Tromsø Study. *Cerebrovasc Dis*. 2001;12(1):44-51.
117. Matheu A, Maraver A, Collado M, Garcia-Cao I, Cañamero M, Borrás C, Flores JM, Klatt P, Viña J, Serrano M. Anti-aging activity of the Ink4/Arf locus. *Aging Cell*. 2009;8(2):152-61.
118. McPherson R. Chromosome 9p21.3 locus for coronary artery disease: how little we know. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(15):1382-3.
119. McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, Stewart A, Roberts R, Cox DR, Hinds DA, Pennacchio LA, Tybjaerg-Hansen A, Folsom AR, Boerwinkle E, Hobbs HH, Cohen JC. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science*. 2007;316(5830):1488-91.
120. McPherson R, Tybjaerg-Hansen A. Genetics of Coronary Artery Disease. *Circ Res*. 2016;118(4):564-78.
121. Mehta NJ, Khan IA. Cardiology's 10 greatest discoveries of the 20th century. *Tex Heart Inst J*. 2002;29:164-71.
122. Minna Tsubari, Erja Tiihonen, and Marikki Laiho. Cloning and Characterization of p10, an Alternatively Spliced Form of p15 Cyclin dependent Kinase Inhibitor. *CANCER RESEARCH*. 1997. 57:2966-73.
123. Mohlke KL, Boehnke M, Abecasis GR. Metabolic and cardiovascular traits: an abundance of recently identified common genetic variants. *Hum Mol Genet*. 2008;17(R2):R102-8.
124. Moran AE, Roth GA, Narula J, Mensah GA. 1990-2010 global cardiovascular disease atlas. *Glob Heart*. 2014;9(1):3-16.
125. Moritani M, Yamasaki S, Kagami M, Suzuki T, Yamaoka T, Sano T, Hata J, Itakura M. Hypoplasia of endocrine and exocrine pancreas in homozygous transgenic TGF-beta1. *Mol Cell Endocrinol*. 2005;229(1-2):175-84.

126. Motterle A, Pu X, Wood H, Xiao Q, Gor S, Ng FL, Chan K, Cross F, Shohreh B, Poston RN, Tucker AT, Caulfield MJ, Ye S. Functional analyses of coronary artery disease associated variation on chromosome 9p21 in vascular smooth muscle cells. *Hum Mol Genet.* 2012;21(18):4021-9.
127. Muniyappa R, Sowers JR. Role of insulin resistance in endothelial dysfunction. *Rev Endocr Metab Disord.* 2013;14(1):5-12.
128. Musunuru K, Post WS, Herzog W, Shen H, O'Connell JR, McArdle PF, Ryan KA, Gibson Q, Cheng YC, Clearfield E, Johnson AD, Tofler G, Yang Q, O'Donnell CJ, Becker DM, Yanek LR, Becker LC, Faraday N, Bielak LF, Peyser PA, Shuldiner AR, Mitchell BD. Association of single nucleotide polymorphisms on chromosome 9p21.3 with platelet reactivity: a potential mechanism for increased vascular disease. *Circ Cardiovasc Genet.* 2010;3(5):445-53.
129. Murabito JM, White CC, Kavousi M, Sun YV, Feitosa MF, Nambi V, Lamina C, Schillert A, Coassin S, Bis JC, Broer L, Crawford DC, Franceschini N, Frikke-Schmidt R, Haun M, Holewijn S, Huffman JE, Hwang SJ, Kiechl S, Kollerits B, Montasser ME, Nolte IM, Rudock ME, Senft A, Teumer A, van der Harst P, Vitart V, Waite LL, Wood AR, Wassel CL, Absher DM, Allison MA, Amin N, Arnold A, Asselbergs FW, Aulchenko Y, Bandinelli S, Barbalic M, Boban M, Brown-Gentry K, Couper DJ, Criqui MH, Dehghan A, den Heijer M, Dieplinger B, Ding J, Dörr M, Espinola-Klein C, Felix SB, Ferrucci L, Folsom AR, Fraedrich G, Gibson Q, Goodloe R, Gunjaca G, Haltmayer M, Heiss G, Hofman A, Kieback A, Kiemeny LA, Kolcic I, Kullo IJ, Kritchevsky SB, Lackner KJ, Li X, Lieb W, Lohman K, Meisinger C, Melzer D, Mohler ER 3rd, Mudnic I, Mueller T, Navis G, Oberhollenzer F, Olin JW, O'Connell J, O'Donnell CJ, Palmas W, Penninx BW, Petersmann A, Polasek O, Psaty BM, Rantner B, Rice K, Rivadeneira F, Rotter JJ, Seldenrijk A, Stadler M, Summerer M, Tanaka T, Tybjaerg-Hansen A, Uitterlinden AG, van Gilst WH, Vermeulen SH, Wild SH, Wild PS, Willeit J, Zeller T, Zemunik T, Zgaga L, Assimes TL, Blankenberg S, Boerwinkle E, Campbell H, Cooke JP, de Graaf J, Herrington D, Kardina SL, Mitchell BD, Murray A, Münzel T, Newman AB, Oostra BA, Rudan I, Shuldiner AR, Snieder H, van Duijn CM, Völker U, Wright AF, Wichmann HE, Wilson JF, Witteman JC, Yan Y, Hayward C, Borecki IB, Ziegler A, North

- KE, Cupples LA, Kronenberg F. Association between chromosome 9p21 variants and the ankle-brachial index identified by a meta-analysis of 21 genome-wide association studies. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012;5(1):100-12.
130. MRC European Carotid Surgery Trial: interim results for symptomatic patients with severe (70-99%) or with mild (0-29%) carotid stenosis. European Carotid Surgery Trialists' Collaborative Group. *Lancet*. 1991;337(8752):1235-43.
131. Nanda V, Downing KP, Ye J, Xiao S, Kojima Y, Spin JM, DiRenzo D, Nead KT, Connolly AJ, Dandona S, Perisic L, Hedin U, Maegdefessel L, Dalman J, Guo L, Zhao X, Kolodgie FD, Virmani R, Davis HR Jr, Leeper NJ. CDKN2B Regulates TGF β Signaling and Smooth Muscle Cell Investment of Hypoxic Neovessels. *Circ Res*. 2016;118(2):230-40.
132. Nakano M, Ikeda Y, Tokuda Y, Fuwa M, Omi N, Ueno M, Imai K, Adachi H, Kageyama M, Mori K, Kinoshita S, Tashiro K. Common variants in CDKN2B-AS1 associated with optic-nerve vulnerability of glaucoma identified by genome-wide association studies in Japanese. *PLoS One*. 2012;7(3):e33389.
133. Newby AC. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(12):2108-14.
134. Ni X, Zhang J. Association between 9p21 genomic markers and ischemic stroke risk: evidence based on 21 studies. *PLoS One*. 2014 Mar 13;9(3):e90255.
135. Nica AC, Dermitzakis ET. Using gene expression to investigate the genetic basis of complex disorders. *Hum Mol Genet*. 2008;17(R2):R129-34.
136. Nobori, T., Miura, K., Wu, D. J., Lois, A., Takabayashi, K., Carson, D. A. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 368: 753-756, 1994.
137. Nord H, Hartmann C, Andersson R, Menzel U, Pfeifer S, Piotrowski A. Characterization of novel and complex genomic aberrations in glioblastoma using a 32K BAC array. *Neuro Oncol*. 2009;11:803-18.
138. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators, Barnett HJM, Taylor DW, Haynes RB, Sackett DL, Peerless SJ, Ferguson GG, Fox AJ, Rankin RN, Hachinski VC, Wiebers DO, Eliasziw M. Beneficial effect

- of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. *N Engl J Med.* 1991;325(7):445-53.
139. O'Donnell CJ, Elosua R. [Cardiovascular risk factors. Insights from Framingham Heart Study]. *Rev Esp Cardiol.* 2008;61(3):299-310.
140. Orr AW, Hastings NE, Blackman BR, Wamhoff BR. Complex regulation and function of the inflammatory smooth muscle cell phenotype in atherosclerosis. *J Vasc Res.* 2004;47:168-180.
141. Okuda, T., Shurtleff, S. A., Valentine, M. B., Raimondi, S. C., Head, D. R., Behm, F., Curcio-Brint, A. M., Yan, Q., Pui, C.-H., Sherr, C. J., Beach, D., Look, A. T., Downing, J. R. Frequent deletion of p16(INK4a)/MTS1 and p15(INK4b)/MTS2 in pediatric acute lymphoblastic leukemia.
142. Pasmant E, Laurendeau I, Héron D, Vidaud M, Vidaud D, Bièche I. Characterization of a germ-line deletion, including the entire INK4/ARF locus, in a melanoma-neural system tumor family: identification of ANRIL, an antisense noncoding RNA whose expression coclusters with ARF. *Cancer Res.* 2007;67(8):3963-9.
143. Passman JN, Dong XR, Wu SP, Maguire CT, Hogan KA, Bautch VL, Majesky MW. A sonic hedgehog signaling domain in the arterial adventitia supports resident Sca1+ smooth muscle progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(27):9349-54. doi: 10.1073/pnas.0711382105.
144. Patel RS, Asselbergs FW, Quyyumi AA, Palmer TM, Finan CI, Tragante V, Deanfield J, Hemingway H, Hingorani AD, Holmes MV. Genetic variants at chromosome 9p21 and risk of first versus subsequent coronary heart disease events: a systematic and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63(21):2234-45.
145. Pasternak RC, Criqui MH, Benjamin EJ, Fowkes FG, Isselbacher EM, McCullough PA, Wolf PA, Zheng ZJ; American Heart Association. Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group I: epidemiology. *Circulation.* 2004;109(21):2605-12.
146. Pilbrow AP, Folkersen L, Pearson JF, Brown CM, McNoe L, Wang NM, Sweet WE, Tang WH, Black MA, Troughton RW, Richards AM, Franco-Cereceda A, Gabrielsen A, Eriksson P, Moravec CS, Cameron VA. The

- chromosome 9p21.3 coronary heart disease risk allele is associated with altered gene expression in normal heart and vascular tissues. *PLoS One*. 2012;7(6):e39574.
147. Pechlivanis S, Mühleisen TW, Möhlenkamp S, Schadendorf D, Erbel R, Jöckel KH, Hoffmann P, Nöthen MM, Scherag A, Moebus S; Heinz Nixdorf Recall Study Investigative Group. Risk loci for coronary artery calcification replicated at 9p21 and 6q24 in the Heinz Nixdorf Recall Study. *BMC Med Genet*. 2013;14:23.
148. Peden JF, Farrall M. Thirty-five common variants for coronary artery disease: the fruits of much collaborative labour. *Hum Mol Genet*. 2011;20(R2):R198-205.
149. Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren M, Albus C, Benlian P, Boysen G, Cifkova R, Deaton C, Ebrahim S, Fisher M, Germano G, Hobbs R, Hoes A, Karadeniz S, Mezzani A, Prescott E, Ryden L, Scherer M, Syväne M, Scholte op Reimer WJ, Vrints C, Wood D, Zamorano JL, Zannad F; European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR); ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur Heart J*. 2012;33(13):1635-701.
150. Plant SR, Samsa GP, Shah SH, Goldstein LB. Exploration of a hypothesized independent association of a common 9p21.3 gene variant and ischemic stroke in patients with and without angiographic coronary artery disease. *Cerebrovasc Dis*. 2011;31(2):117-22.
151. Polak JF, Shemanski L, O'Leary DH, Lefkowitz D, Price TR, Savage PJ, Brant WE, Reid C. Hypoechoic plaque at US of the carotid artery: an independent risk factor for incident stroke in adults aged 65 years or older. *Cardiovascular Health Study*. *Radiology*. 1998;208(3):649-54.
152. Preuss M, König IR, Thompson JR, Erdmann J, Absher D, Assimes TL, Blankenberg S, Boerwinkle E, Chen L, Cupples LA, Hall AS, Halperin E,

- Hengstenberg C, Holm H, Laaksonen R, Li M, März W, McPherson R, Musunuru K, Nelson CP, Burnett MS, Epstein SE, O'Donnell CJ, Quertermous T, Rader DJ, Roberts R, Schillert A, Stefansson K, Stewart AF, Thorleifsson G, Voight BF, Wells GA, Ziegler A, Kathiresan S, Reilly MP, Samani NJ, Schunkert H; CARDIoGRAM Consortium. Design of the Coronary ARtery Disease Genome-Wide Replication And Meta-Analysis (CARDIoGRAM) Study: A Genome-wide association meta-analysis involving more than 22 000 cases and 60 000 controls. *Circ Cardiovasc Genet.* 2010;3(5):475-83.
153. Rajaraman P, Melin BS, Wang Z, McKean-Cowdin R, Michaud DS, Wang SS, Bondy M, Houlston R, Jenkins RB, Wrensch M, Yeager M, Ahlbom A, Albanes D, Andersson U, Freeman LE, Buring JE, Butler MA, Braganza M, Carreon T, Feychting M, Fleming SJ, Gapstur SM, Gaziano JM, Giles GG, Hallmans G, Henriksson R, Hoffman-Bolton J, Inskip PD, Johansen C, Kitahara CM, Lathrop M, Yan C, Le Marchand L, Linet MS, Lonn S, Peters U, Purdue MP, Rothman N, Ruder AM, Sanson M, Sesso HD, Severi G, Shu XO, Simon M, Stampfer M, Stevens VL, Visvanathan K, White E, Wolk A, Zeleniuch-Jacquotte A, Zheng W, Decker P, Enciso-Mora V, Fridley B, Gao YT, Kosel M, Lachance DH, Lau C, Rice T, Swerdlow A, Wiemels JL, Wiencke JK, Shete S, Xiang YB, Xiao Y, Hoover RN, Fraumeni JF Jr, Chatterjee N, Hartge P, Chanock SJ. Genome-wide association study of glioma and meta-analysis. *Hum Genet.* 2012 Dec;131(12):1877-88.
154. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science.* 1996;273(5281):1516-7.
155. Robbins CS, Hilgendorf I, Weber GF, Theurl I, Iwamoto Y, Figueiredo JL, Gorbатов R, Sukhova GK, Gerhardt LM, Smyth D, Zavitz CC, Shikatani EA, Parsons M, van Rooijen N, Lin HY, Husain M, Libby P, Nahrendorf M, Weissleder R, Swirski FK. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med.* 2013;19(9):1166-72.
156. Roberts R, Stewart AF. Genes and coronary artery disease: where are we? *J Am Coll Cardiol.* 2012;60(18):1715-21.
157. Roberts R, Stewart AF. 9p21 and the genetic revolution for coronary artery disease. *Clin Chem.* 2012;58(1):104-12.

158. Roberts R. Genetics of coronary artery disease: an update. *Methodist Debaquey Cardiovasc J.* 2014;10(1):7-12.
159. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340(2):115-26.
160. Roth GA, Nguyen G, Forouzanfar MH, Mokdad AH, Naghavi M, Murray CJ. Estimates of global and regional premature cardiovascular mortality in 2025. *Circulation.* 2015;132(13):1270-82.
161. Rothwell PM, Gibson RJ, Slattery J, Sellar RJ, Warlow CP. Equivalence of measurements of carotid stenosis. A comparison of three methods on 1001 angiograms. European Carotid Surgery Trialists' Collaborative Group. *Stroke.* 1994;25(12):2435-9.
162. Rekhter MD, Gordon D. Active proliferation of different cell types, including lymphocytes, in human atherosclerotic plaques. *Am J Pathol.* 1995;147(3):668-77.
163. Roussel MF. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene.* 1999;18(38):5311-7. .
164. Reynisdóttir I, Polyak K, Iavarone A, Massagué J. Kip/Cip and Ink4 Cdkinhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev.* 1995;9(15):1831-45.
165. Samani NJ, Braund PS, Erdmann J, Go'tz A, Tomaszewski M, LinselNitschke P, Hajat C, Mangino M, Hengstenberg C, Stark K, Ziegler A, Caulfield M, Burton PR, Schunkert H, Tobin MD. The novel genetic variant predisposing to coronary artery disease in the region of the PSRC1 and CELSR2 genes on chromosome 1 associates with serum cholesterol. *J Mol Med.* 2008;86:1233-41.
166. Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, Hengstenberg C, Mangino M, Mayer B, Dixon RJ, Meitinger T, Braund P, Wichmann HE, Barrett JH, König IR, Stevens SE, Szymczak S, Tregouet DA, Iles MM, Pahlke F, Pollard H, Lieb W, Cambien F, Fischer M, Ouwehand W, Blankenberg S, Balmforth AJ, Baessler A, Ball SG, Strom TM, Braenne I, Gieger C, Deloukas P, Tobin MD, Ziegler A, Thompson JR, Schunkert H; WTCCC and the Cardiogenics Consortium. Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2007;357(5):443-53.

167. Schmid M, Malicki D, Nobori T, Rosenbach MD, Campbell K, Carson DA, Carrera CJ. Homozygous deletions of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) are more frequent than p16INK4A (CDKN2) homozygous deletions in primary non-small cell lung cancers (NSCLC). *Oncogene*. 1998;17(20):2669-75.
168. Schunkert H, Götz A, Braund P, McGinnis R, Tregouet DA, Mangino M, Linsel-Nitschke P, Cambien F, Hengstenberg C, Stark K, Blankenberg S, Tiret L, Ducimetiere P, Keniry A, Ghorri MJ, Schreiber S, El Mokhtari NE, Hall AS, Dixon RJ, Goodall AH, Liptau H, Pollard H, Schwarz DF, Hothorn LA, Wichmann HE, König IR, Fischer M, Meisinger C, Ouwehand W, Deloukas P, Thompson JR, Erdmann J, Ziegler A, Samani NJ; Cardiogenics Consortium. Repeated replication and a prospective meta-analysis of the association between chromosome 9p21.3 and coronary artery disease. *Circulation*. 2008;117(13):1675-84.
169. Schulz C, Massberg S. Platelets in atherosclerosis and thrombosis. *Handb Exp Pharmacol*. 2012;(210):111-33.
170. Seidemann SB, Kuo C, Pleskac N, Molina J, Sayers S, Li R, Zhou J, Johnson P, Braun K, Chan C, Teupser D, Breslow JL, Wight TN, Tall AR, Welch CL. *Athsq1* is an atherosclerosis modifier locus with dramatic effects on lesion area and prominent accumulation of versican. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(12):2180-6.
171. Shen GQ, Li L, Rao S, Abdullah KG, Ban JM, Lee BS, Park JE, Wang QK. Four SNPs on chromosome 9p21 in a South Korean population implicate a genetic locus that confers high cross-race risk for development of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(2):360-5.
172. Shen GQ, Rao S, Martinelli N, Li L, Olivieri O, Corrocher R, Abdullah KG, Hazen SL, Smith J, Barnard J, Plow EF, Girelli D, Wang QK. Association between four SNPs on chromosome 9p21 and myocardial infarction is replicated in an Italian population. *J Hum Genet*. 2008;53(2):144-50.
173. Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*. 1995 May 15;9(10):1149-63. .
174. Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, Erdos MR, Stringham HM, Chines PS, Jackson AU, Prokunina-Olsson L, Ding CJ,

- Swift AJ, Narisu N, Hu T, Pruim R, Xiao R, Li XY, Conneely KN, Riebow NL, Sprau AG, Tong M, White PP, Hetrick KN, Barnhart MW, Bark CW, Goldstein JL, Watkins L, Xiang F, Saramies J, Buchanan TA, Watanabe RM, Valle TT, Kinnunen L, Abecasis GR, Pugh EW, Doheny KF, Bergman RN, Tuomilehto J, Collins FS, Boehnke M. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science*. 2007;316(5829):1341-5.
175. Schunkert H, König IR, Kathiresan S, Reilly MP, Assimes TL, Holm H, Preuss M, Stewart AF, Barbalic M, Gieger C, Absher D, Aherrahrou Z, Allayee H, Altshuler D, Anand SS, Andersen K, Anderson JL, Ardissino D, Ball SG, Balmforth AJ, Barnes TA, Becker DM, Becker LC, Berger K, Bis JC, Boekholdt SM, Boerwinkle E, Braund PS, Brown MJ, Burnett MS, Buyschaert I, Cardiogenics, Carlquist JF, Chen L, Cichon S, Codd V, Davies RW, Dedoussis G, Dehghan A, Demissie S, Devaney JM, Diemert P, Do R, Doering A, Eifert S, Mokhtari NE, Ellis SG, Elosua R, Engert JC, Epstein SE, de Faire U, Fischer M, Folsom AR, Freyer J, Gigante B, Girelli D, Gretarsdottir S, Gudnason V, Gulcher JR, Halperin E, Hammond N, Hazen SL, Hofman A, Horne BD, Illig T, Iribarren C, Jones GT, Jukema JW, Kaiser MA, Kaplan LM, Kastelein JJ, Khaw KT, Knowles JW, Kolovou G, Kong A, Laaksonen R, Lambrechts D, Leander K, Lettre G, Li M, Lieb W, Loley C, Lotery AJ, Mannucci PM, Maouche S, Martinelli N, McKeown PP, Meisinger C, Meitinger T, Melander O, Merlini PA, Mooser V, Morgan T, Mühleisen TW, Muhlestein JB, Münzel T, Musunuru K, Nahrstaedt J, Nelson CP, Nöthen MM, Olivieri O, Patel RS, Patterson CC, Peters A, Peyvandi F, Qu L, Quyyumi AA, Rader DJ, Rallidis LS, Rice C, Rosendaal FR, Rubin D, Salomaa V, Sampietro ML, Sandhu MS, Schadt E, Schäfer A, Schillert A, Schreiber S, Schrezenmeir J, Schwartz SM, Siscovick DS, Sivananthan M, Sivapalaratnam S, Smith A, Smith TB, Snoep JD, Soranzo N, Spertus JA, Stark K, Stirrups K, Stoll M, Tang WH, Tennstedt S, Thorgeirsson G, Thorleifsson G, Tomaszewski M, Uitterlinden AG, van Rij AM, Voight BF, Wareham NJ, Wells GA, Wichmann HE, Wild PS, Willenborg C, Witteman JC, Wright BJ, Ye S, Zeller T, Ziegler A, Cambien F, Goodall AH, Cupples LA, Quertermous T, März W, Hengstenberg C, Blankenberg S, Ouwehand WH, Hall AS, Deloukas P, Thompson JR, Stefansson K, Roberts R,

- Thorsteinsdottir U, O'Donnell CJ, McPherson R, Erdmann J; CARDIoGRAM Consortium, Samani NJ. Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nat Genet.* 2011;43(4):333-8.
176. Schunkert H, Götz A, Braund P, McGinnis R, Tregouet DA, Mangino M, Linsel-Nitschke P, Cambien F, Hengstenberg C, Stark K, Blankenberg S, Tiret L, Ducimetiere P, Keniry A, Ghorji MJ, Schreiber S, El Mokhtari NE, Hall AS, Dixon RJ, Goodall AH, Liptau H, Pollard H, Schwarz DF, Hothorn LA, Wichmann HE, König IR, Fischer M, Meisinger C, Ouwehand W, Deloukas P, Thompson JR, Erdmann J, Ziegler A, Samani NJ; Cardiogenics Consortium. Repeated replication and a prospective meta-analysis of the association between chromosome 9p21.3 and coronary artery disease. *Circulation.* 2008;117(13):1675-84.
177. Shanker J, Arvind P, Jambunathan S, Nair J, Kakkar V. Genetic analysis of the 9p21.3 CAD risk locus in Asian Indians. *Thromb Haemost.* 2014;111(5):960-9.
178. Silander K, Alanne M, Kristiansson K, Saarela O, Ripatti S, Auro K, Karvanen J, Kulathinal S, Niemelä M, Ellonen P, Vartiainen E, Jousilahti P, Saarela J, Kuulasmaa K, Evans A, Perola M, Salomaa V, Peltonen L. Gender differences in genetic risk profiles for cardiovascular disease. *PLoS One.* 2008;3(10):e3615.
179. Sitia S, Tomasoni L, Atzeni F, Ambrosio G, Cordiano C, Catapano A, Tramontana S, Perticone F, Naccarato P, Camici P, Picano E, Cortigiani L, Bevilacqua M, Milazzo L, Cusi D, Barlassina C, Sarzi-Puttini P, Turiel M. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmun Rev.* 2010;9(12):830-4.
180. Smith JG, Melander O, Lökvist H, Hedblad B, Engström G, Nilsson P, Carlson J, Berglund G, Norrving B, Lindgren A. Common genetic variants on chromosome 9p21 confers risk of ischemic stroke: a large-scale genetic association study. *Circ Cardiovasc Genet.* 2009;2(2):159-64.
181. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:227-64. .
182. Stone S, Dayananth P, Jiang P, Weaver-Feldhaus JM, Tavtigian SV, Cannon-Albright L, Kamb A. Genomic structure, expression and mutational analysis of the P15 (MTS2) gene. *Oncogene.* 1995;11(5):987-91.

183. Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, Collins FS, Wagner L, Shenmen CM, Schuler GD, Altschul SF, Zeeberg B, Buetow KH, Schaefer CF, Bhat NK, Hopkins RF, Jordan H, Moore T, Max SI, Wang J, Hsieh F, Diatchenko L, Marusina K, Farmer AA, Rubin GM, Hong L, Stapleton M, Soares MB, Bonaldo MF, Casavant TL, Scheetz TE, Brownstein MJ, Usdin TB, Toshiyuki S, Carninci P, Prange C, Raha SS, Loquellano NA, Peters GJ, Abramson RD, Mullahy SJ, Bosak SA, McEwan PJ, McKernan KJ, Malek JA, Gunaratne PH, Richards S, Worley KC, Hale S, Garcia AM, Gay LJ, Hulyk SW, Villalon DK, Muzny DM, Sodergren EJ, Lu X, Gibbs RA, Fahey J, Helton E, Kettelman M, Madan A, Rodrigues S, Sanchez A, Whiting M, Madan A, Young AC, Shevchenko Y, Bouffard GG, Blakesley RW, Touchman JW, Green ED, Dickson MC, Rodriguez AC, Grimwood J, Schmutz J, Myers RM, Butterfield YS, Krzywinski MI, Skalska U, Smailus DE, Schnerch A, Schein JE, Jones SJ, Marra MA; Mammalian Gene Collection Program Team. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(26):16899-903.
184. Svensson PA, Wahlstrand B, Olsson M, Froguel P, Falchi M, Bergman RN, McTernan PG, Hedner T, Carlsson LM, Jacobson P. CDKN2B expression and subcutaneous adipose tissue expandability: possible influence of the 9p21 atherosclerosis locus. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;446(4):1126-31.
185. Sztajzel R. Ultrasonographic assessment of the morphological characteristics of the carotid plaque. *Swiss Med Wkly*. 2005;135(43-44):635-43.
186. Tabas I, García-Cardeña G, Owens GK. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J Cell Biol*. 2015;209(1):13-22.
187. Tabas I, Williams KJ, Borén J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation*. 2007;116(16):1832-44.
188. Talmud PJ. Gene-environment interaction and its impact on coronary heart disease risk. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2007;17(2):148-52.
189. Talmud PJ, Cooper JA, Palmén J, Lovering R, Drenos F, Hingorani AD, Humphries SE. Chromosome 9p21.3 coronary heart disease locus genotype and

- prospective risk of CHD in healthy middle-aged men. *Clin Chem.* 2008;54(3):467-74.
190. Tarnoki AD, Baracchini C, Tarnoki DL, Lucatelli P, Boatta E, Zini C, Fanelli F, Molnar AA, Meneghetti G, Stazi MA, Medda E, Cotichini R, Nisticò L, Fagnani C, Osztoivits J, Jermendy G, Preda I, Kiss RG, Metneki J, Horvath T, Pucci G, Bata P, Karlinger K, Littvay L, Berczi V, Garami Z, Schillaci G. Evidence for a strong genetic influence on carotid plaque characteristics: an international twin study. *Stroke.* 2012;43(12):3168-72.
191. Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, Edmondson AC, Stylianou IM, Koseki M *et al.* Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature.* 2010;466(7307):707-13.
192. Toma I, McCaffrey TA. Transforming growth factor- β and atherosclerosis: interwoven atherogenic and atheroprotective aspects. *Cell and tissue research.* 2012;347(1):155-175.
193. The Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature.* 2007;447(7145):661-78.
194. Thompson AR, Golledge J, Cooper JA, Hafez H, Norman PE, Humphries SE. Sequence variant on 9p21 is associated with the presence of abdominal aortic aneurysm disease but does not have an impact on aneurysmal expansion. *Eur J Hum Genet.* 2009;17(3):391-4.
195. Thorgeirsson TE, Geller F, Sulem P, Rafnar T, Wiste A, Magnusson KP, Manolescu A, Thorleifsson G, Stefansson H, Ingason A, Stacey SN, Bergthorsson JT, Thorlacius S, Gudmundsson J, Jonsson T, Jakobsdottir M, Saemundsdottir J, Olafsdottir O, Gudmundsson LJ, Bjornsdottir G, Kristjansson K, Skuladottir H, Isaksson HJ, Gudbjartsson T, Jones GT, Mueller T, Gottsater A, Flex A, Aben KK, de Vegt F, Mulders PF, Isla D, Vidal MJ, Asin L, Saez B, Murillo L, Blondal T, Kolbeinsson H, Stefansson JG, Hansdottir I, Runarsdottir V, Pola R, Lindblad B, van Rij AM, Dieplinger B, Haltmayer M, Mayordomo JI, Kiemeneij LA, Matthiasson SE, Oskarsson H, Tyrfinngsson T, Gudbjartsson DF, Gulcher JR, Jonsson S, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K. A variant

- associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature*. 2008;452(7187):638-42.
196. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD; Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction. Third universal definition of myocardial infarction. *Nat Rev Cardiol*. 2012;9(11):620-33.
197. Tziakas DN, Chalikias GK, Stakos D, Boudoulas H. The role of red blood cells in the progression and instability of atherosclerotic plaque. *Int J Cardiol*. 2010;142(1):2-7.
198. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(15):e115.
199. Usvasalo A, Ninomiya S, Rätty R, Hollmén J, Saarinen-Pihkala UM, Elonen E, Knuutila S. Focal 9p instability in hematologic neoplasias revealed by comparative genomic hybridization and single-nucleotide polymorphism microarray analyses. *Genes Chromosomes Cancer*. 2010;49(4):309-18.
200. Uwanogho DA, Hardcastle Z, Balogh P, Mirza G, Thornburg KL, Ragoussis J, Sharpe PT. Molecular cloning, chromosomal mapping, and developmental expression of a novel protein tyrosine phosphatase-like gene. *Genomics*. 1999;62(3):406-16.
201. Valente AJ, Irimpen AM, Siebenlist U, Chandrasekar B. OxLDL induces endothelial dysfunction and death via TRAF3IP2: inhibition by HDL3 and AMPK activators. *Free Radic Biol Med*. 2014;70:117-28.
202. Vasile VC, Will ML, Ommen SR, Edwards WD, Olson TM, Ackerman MJ. Identification of a metavinculin missense mutation, R975W, associated with both hypertrophic and dilated cardiomyopathy. *Mol Genet Metab*. 2006;87(2):169-74.
203. Vargas JD, Manichaikul A, Wang XQ, Rich SS, Rotter JI, Post WS, Polak JF, Budoff MJ, Bluemke DA. Detailed analysis of association between common single nucleotide polymorphisms and subclinical atherosclerosis: The Multi-ethnic Study of Atherosclerosis. *Data Brief*. 2016;7:229-42.

204. Visel A, Zhu Y, May D, Afzal V, Gong E, Attanasio C, Blow MJ, Cohen JC, Rubin EM, Pennacchio LA. Targeted deletion of the 9p21 non-coding coronary artery disease risk interval in mice. *Nature*. 2010;464(7287):409-12.
205. Visscher PM, Wray NR, Zhang Q, Sklar P, McCarthy MI, Brown MA, Yang J. 10 Years of GWAS Discovery: Biology, Function, and Translation. *Am J Hum Genet*. 2017;101(1):5-22.
206. Verweij N, Eppinga RN, Hagemeyer Y, van der Harst P. Identification of 15 novel risk loci for coronary artery disease and genetic risk of recurrent events, atrial fibrillation and heart failure. *Sci Rep*. 2017;7(1):2761.
207. Vey E, Zhang JH, Dayer JM. IFN-gamma and 1,25(OH)2D3 induce on THP-1 cells distinct patterns of cell surface antigen expression, cytokine production, and responsiveness to contact with activated T cells. *J Immunol*. 1992;149(6):2040-6.
208. Zanetti D, Carreras-Torres R, Esteban E, Via M, Moral P. Potential Signals of Natural Selection in the Top Risk Loci for Coronary Artery Disease: 9p21 and 10q11. *PLoS One*. 2015;10(8):e0134840.
209. Zdravkovic S, Wienke A, Pedersen NL, Marenberg ME, Yashin AI, De Faire U. Heritability of death from coronary heart disease: a 36-year follow-up of 20 966 Swedish twins. *J Intern Med*. 2002;252(3):247-54.
210. Zee RY, Ridker PM. Two common gene variants on chromosome 9 and risk of atherothrombosis. *Stroke*. 2007;38(10):e111.
211. Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H, Timpson NJ, Perry JR, Rayner NW, Freathy RM, Barrett JC, Shields B, Morris AP, Ellard S, Groves CJ, Harries LW, Marchini JL, Owen KR, Knight B, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Morris AD, Doney AS; Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC), McCarthy MI, Hattersley AT. Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science*. 2007;316(5829):1336-41.
212. Zhang W, Chen Y, Yan P, Chen J, Song L, Tang Y, Wang Y, Yan J, Hu FB, Hui R. Variants on chromosome 9p21.3 correlated with ANRIL expression

- contribute to stroke risk and recurrence in a large prospective stroke population. *Stroke*. 2012;43(1):14-21.
213. Zhu S, Wang Z, Zhang Z, Wang J, Li Y, Yao L, Mei Q, Zhang W. PTPLAD2 is a tumor suppressor in esophageal squamous cell carcinogenesis. *FEBS Lett*. 2014;588(6):981-9.
214. Zhuang J, Peng W, Li H, Wang W, Wei Y, Li W, Xu Y. Methylation of p15INK4b and expression of ANRIL on chromosome 9p21 are associated with coronary artery disease. *PLoS One*. 2012;7(10):e47193.
215. Wang X, Hu G, Betts C, Harmon EY, Keller RS, Van De Water L, Zhou J. Transforming growth factor- β 1-induced transcript 1 protein, a novel marker for smooth muscle contractile phenotype, is regulated by serum response factor/myocardin protein. *J Biol Chem*. 2011;286(48):41589-99.
216. Wang Z, Rajaraman P, Melin BS, Chung CC, Zhang W, McKean-Cowdin R, Michaud D, Yeager M, Ahlbom A, Albanes D, Andersson U, Freeman LE, Buring JE, Butler MA, Carreón T, Feychting M, Gapstur SM, Gaziano JM, Giles GG, Hallmans G, Henriksson R, Hoffman-Bolton J, Inskip PD, Kitahara CM, Marchand LL, Linet MS, Li S, Peters U, Purdue MP, Rothman N, Ruder AM, Sesso HD, Severi G, Stampfer M, Stevens VL, Visvanathan K, Wang SS, White E, Zeleniuch-Jacquotte A, Hoover R, Fraumeni JF, Chatterjee N, Hartge P, Chanock SJ. Further Confirmation of Germline Glioma Risk Variant rs78378222 in TP53 and Its Implication in Tumor Tissues via Integrative Analysis of TCGA Data. *Hum Mutat*. 2015;36(7):684-8.
217. Wardlaw JM, Lewis S. Carotid stenosis measurement on colour Doppler ultrasound: agreement of ECST, NASCET and CCA methods applied to ultrasound with intra-arterial angiographic stenosis measurement. *Eur J Radiol*. 2005;56(2):205-11.
218. Wassmann S, Hilgers S, Laufs U, Böhm M, Nickenig G. Angiotensin II type I receptor antagonism improves hypercholesterolemia-associated endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(7):1208-12.
219. Welch CL1, Bretschger S, Latib N, Bezouevski M, Guo Y, Pleskac N, Liang CP, Barlow C, Dansky H, Breslow JL, Tall AR. Localization of atherosclerosis

- susceptibility loci to chromosomes 4 and 6 using the Ldlr knockout mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(14):7946-51.
220. Widder B, Paulat K, Hackspacher J, Hamann H, Hutschenreiter S, Kreutzer C, Ott F, Vollmar J. Morphological characterization of carotid artery stenoses by ultrasound duplex scanning. *Ultrasound Med Biol*. 1990;16(4):349-54.
221. Whitworth JA; World Health Organization, International Society of Hypertension Writing Group. 2003 World Health Organization(WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertens*. 2003;21(11):1983-92.
222. Wrensch M, Jenkins RB, Chang JS, Yeh RF, Xiao Y, Decker PA, Ballman KV, Berger M, Buckner JC, Chang S, Giannini C, Halder C, Kollmeyer TM, Kosel ML, LaChance DH, McCoy L, O'Neill BP, Patoka J, Pico AR, Prados M, Quesenberry C, Rice T, Rynearson AL, Smirnov I, Tihan T, Wiemels J, Yang P, Wiencke JK. Variants in the CDKN2B and RTEL1 regions are associated with high-grade glioma susceptibility. *Nat Genet*. 2009;41(8):905-8.
223. Yamagishi K, Folsom AR, Rosamond WD, Boerwinkle E, ARIC Investigators. A genetic variant on chromosome 9p21 and incident heart failure in the ARIC study. *Eur Heart J*. 2009;30(10):1222-8.
224. Yang J, Gu L, Guo X, Huang J, Chen Z, Huang G, Kang Y, Zhang X, Long J, Su L. LncRNA ANRIL Expression and ANRIL Gene Polymorphisms Contribute to the Risk of Ischemic Stroke in the Chinese Han Population. *Cell Mol Neurobiol*. 2018
225. Yang XP, Irani K, Mattagajasingh S, Dipaula A, Khanday F, Ozaki M, Fox-Talbot K, Baldwin WM 3rd, Becker LC. Signal transducer and activator of transcription 3 alpha and specificity protein 1 interact to upregulate intercellular adhesion molecule-1 in ischemic-reperfused myocardium and vascular endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(7):1395-400.
226. Yap KL, Li S, Muñoz-Cabello AM, Raguz S, Zeng L, Mujtaba S, Gil J, Walsh MJ, Zhou MM. Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol Cell*. 2010;38(5):662-74.

227. Yasuno K, Bilguvar K, Bijlenga P, Low SK, Krischek B, Auburger G, Simon M, Krex D, Arlier Z, Nayak N, Ruigrok YM, Niemelä M, Tajima A, von und zu Fraunberg M, Dóczi T, Wirjatijasa F, Hata A, Blasco J, Oszvald A, Kasuya H, Zilani G, Schoch B, Singh P, Stüer C, Risselada R, Beck J, Sola T, Ricciardi F, Aromaa A, Illig T, Schreiber S, van Duijn CM, van den Berg LH, Perret C, Proust C, Roder C, Ozturk AK, Gaál E, Berg D, Geisen C, Friedrich CM, Summers P, Frangi AF, State MW, Wichmann HE, Breteler MM, Wijmenga C, Mane S, Peltonen L, Elio V, Sturkenboom MC, Lawford P, Byrne J, Macho J, Sandalcioglu EI, Meyer B, Raabe A, Steinmetz H, Rüfenacht D, Jääskeläinen JE, Hernesniemi J, Rinkel GJ, Zembutsu H, Inoue I, Palotie A, Cambien F, Nakamura Y, Lifton RP, Günel M. Genome-wide association study of intracranial aneurysm identifies three new risk loci. *Nat Genet.* 2010;42(5):420-5.
228. Yu W, Gius D, Onyango P, Muldoon-Jacobs K, Karp J, Feinberg AP, Cui H. Epigenetic silencing of tumour suppressor gene p15 by its antisense RNA. *Nature.* 2008;451(7175):202-6.
229. Yu W, Gius D, Onyango P, Muldoon-Jacobs K, Karp J, Feinberg AP, Cui H. Epigenetic silencing of tumour suppressor gene p15 by its antisense RNA. *Nature.* 2008;451(7175):202-6.
230. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L; INTERHEART Study Investigators. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet.* 2004;364(9438):937-52.

8 PRILOZI

Prilog 1. Inflamatorni, hemostatski i klinički parametri u odnosu na genotip varijante rs10757278 u genu *ANRIL* kod bolesnika sa karotidnim plakom.

Genotip	AA	AG	GG	p
Godine	65,52±8,36	66,46±7,12	65,72±8,78	0,86 [#]
BMI (kg/m ²)	26,43±3,98	26,39±3,29	26,91±2,77	0,83 [#]
TH (mmol/L)	5,94±1,40	5,62±1,11	5,77±1,37	0,06 [#]
LDL (mmol/L)	3,78±1,10	3,59±0,99	3,76±1,19	0,1 [#]
HDL (mmol/L)	1,19±0,34	1,19±0,34	1,25±0,35	0,22 [#]
Tg (mmol/L)	2,28±1,11	1,84±0,98	1,99±0,66	0,51 [#]
Lp(a) (mg/dL)	10,13±3,21	9,16±3,43	9,98±3,83	0,36 [#]
ApoA-I (g/L)	1,60±0,45	1,56±0,41	1,60±0,44	0,73 [#]
Apo B (g/L)	1,19±0,28	1,11±0,26	1,16±0,34	0,75 [#]
Faktor VII (g/L)	106,61±30,2	105,38±30,14	106,53±27,17	0,97 [#]
Fibrinogen (g/L)	6,61±1,97	5,09±1,74	5,12±1,61	0,63 [#]
vWf (IU/dL)	177,67±77,47	176,63±60,22	145,40±48,81	0,48 [#]
Plasminogen (g/L)	127,39±22,31	125,37±21,50	123,96±25,29	0,11 [#]
PAI-1 (U/mL)	3,53±1,13	3,48±1,36	3,54±1,49	0,52 [#]
CRP (mg/L)	6,27±1,22	5,37±1,29	6,94±1,24	0,67 [#]
IL-6 (pg/mL)	5,71±1,29	5,87±1,41	5,85±1,48	0,78 [#]
WBC (10 ⁹ /L)	7,58±1,86	7,50±1,86	7,53±2,02	0,22 [#]
RBC (10 ⁹ /L)	4,64±0,55	4,43±0,48	4,47±0,48	0,51 [#]

PLT (10 ⁹ /L)	254,07±71,24	252,75±75,12	253,32±76,83	0,74 [#]
Simptomatska bolest (%)	25,96	42,13	31,91	0,34 [*]
TIA (%)	24,42	39,53	36,05	0,58 [*]
MU (%)	27,27	42,86	29,87	0,67 [*]
KBS, komorbiditet (%)	20,98	39,86	39,16	0,09 [*]
DM (%)	13,79	47,13	39,08	0,04 [*]
Hipertenzija (%)	23,12	45,05	31,83	0,69 [*]

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD za kontinualne i % za kategorijske varijable; BMI indeks telesne mase, SBP sistolni krvni pritisak, DBP dijastolni krvni pritisak, TH totalni holesterol, HDL lipoprotein visoke gustine, LDL lipoprotein niske gustine, TG trigliceridi, Lp(a) lipoprotein (a), ApoA-I apolipoprotein A-I, ApoB apolipoprotein B, PAI-1 plasminogen aktivatora inhibitor-1, vWf von Willebrand Faktor, CRP C-reaktivni protein, IL-6 interleukin 6, WBC broj belih krvnih ćelija, RBC broj crvenih krvnih ćelija, PLT broj krvnih pločica, TIA prethodni prolazni ishemijski atak, MU moždani udar, KBS koronarna bolest srca, DM dijabetes mellitus; # *Kruskal-Wallis* ANOVA, **p* Pearson's χ^2 test; Vrednosti *p* < 0,05 se smatraju statistički značajnim

Prilog 2. Inflamatorni, hemostatski i klinički karametri u odnosu na genotip varijante rs518394 u genu *ANRIL*, kod bolesnika sa karotidnim plakom.

Genotip	CC	CG	GG	p
Godine	66,44±7,73	65,92±7,77	65,87±8,67	0,91 [#]
BMI (kg/m ²)	25,94±2,67	26,68±3,98	26,89±2,43	0,25 [#]
TH (mmol/L)	5,78±1,21	5,79±1,27	5,70±1,30	0,69 [#]
LDL (mmol/L)	3,86±1,01	3,66±1,06	3,71±1,15	0,51 [#]
HDL (mmol/L)	1,18±0,37	1,21±0,37	1,20±0,33	0,92 [#]
TG (mmol/L)	1,78±1,20	2,04±1,62	1,74±0,74	0,21 [#]
Lp(a) (mg/dL)	9,48±3,13	9,49±3,64	9,89±3,76	0,41 [#]

ApoA–I (g/L)	1,52±0,36	1,57±0,48	1,55±0,40	0,73 [#]
Apo B (g/L)	1,15±0,22	1,13±0,40	1,17±0,32	0,75 [#]
Faktor VII (g/L)	105,81±36,44	106,68±32,30	106,01±20,97	0,62 [#]
Fibrinogen (g/L)	6,02±1,81	5,06±1,55	5,40±1,81	0,49 [#]
vWf (IU/dL)	177,67±77,47	176,63±60,22	145,40±48,81	0,48 [#]
Plasminogen (g/L)	119,65±20,55	124,41±22,54	125,71±25,23	0,28 [#]
PAI–1 (U/mL)	3,15±1,17	3,37±1,27	3,70±1,54	0,19 [#]
CRP (mg/L)	5,45±1,14	5,72±1,64	6,02±1,68	0,52 [#]
IL–6 (pg/mL)	5,71±1,29	5,87±1,41	5,85±1,48	0,78 [#]
WBC (10 ⁹ /L)	7,34±1,70	7,30±1,85	7,76±1,94	0,30 [#]
RBC (10 ⁹ /L)	4,62±0,67	4,47±0,50	4,43±0,44	0,56 [#]
PLT (10 ⁹ /L)	245,8±88,3	247,5±75,99	255,50±70,96	0,63 [#]
Simptomatska bolest (%)	25,96	42,13	31,91	0,34 [*]
TIA (%)	13,51	43,24	43,24	0,59 [*]
MU (%)	17,65	47,06	35,29	0,74 [*]
KBS , komorbiditet (%)	16,67	48,41	34,92	0,59 [*]
DM (%)	14,47	40,79	44,74	0,38 [*]
Hipertenzija (%)	14,53	48,79	36,68	0,18 [*]

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SD za kontinualne i % za kategorijske varijable; BMI indeks telesne mase, SBP sistolni krvni pritisak, DBP dijastolni krvni pritisak, TH totalni holesterol, HDL lipoprotein visoke gustine, LDL lipoprotein niske gustine, TG trigliceridi, Lp(a) lipoprotein (a), ApoA–I apolipoprotein A–I, ApoB apolipoprotein B, PAI–1 plasminogen aktivatora inhibitor–1, vWf von Willebrand Faktor, CRP C–reaktivni protein, IL–6 interleukin 6, WBC broj belih krvnih ćelija, RBC broj crvenih krvnih ćelija, PLT broj krvnih pločica, TIA prethodni prolazni ishemijski atak, MU moždani udar, KBS koronarna bolest srca, DM dijabetes mellitus; *Kruskal–Wallis* ANOVA, *p Pearson's χ^2 test; Vrednosti $p < 0,05$ se smatraju statistički značajnim

Prilog 3. Inzlamatorni, hemostatski i klinički karametri u odnosu na genotip varijante rs36212560 u genu *HACD4* kod bolesnika sa karotidnim plakom.

Genotip	II	ID	DD	p
Godine	66.12±7.89	65.55±7.91	67.82±7.41	0.41 [#]
BMI (kg/m ²)	26.71±3,36	26.54±3.20	26.11±2.92	0.63 [#]
TH (mmol/L)	5.74±1.32	5.77±1.22	5.38±1.09	0.27 [#]
LDL (mmol/L)	3.71±1.15	3.72±1.00	3.43±0.96	0.96 [#]
HDL (mmol/L)	1.23±0.35	1.19±0.34	1.13±0.29	0.35 [#]
Tg (mmol/L)	1.75±0.73	1.96±1.54	1.85±0.89	0.69 [#]
Lp(a) (mg/dL)	30.98±3.29	31.27±3.80	30.98±3.73	0.41 [#]
ApoA-I (g/L)	1.58±0.42	1.58±0.42	1.57±0.44	0.85 [#]
Apo B (g/L)	1.16±0.42	1.16±0.26	1.08±0.26	0.70 [#]
Faktor VII (g/L)	105.28±32.01	105.09±28.11	106.13±24.98	0.97 [#]
Fibrinogen (g/L)	5.63±1.51	5.20±1.60	5.24±1.76	0.51 [#]
vWf (IU/dL)	177.67±77.47	176.63±60.22	145.40±48.81	0.48 [#]
Plasminogen (g/L)	122.68±20.29	125.85±25.90	130.28±21.86	0.11 [#]
PAI-1 (U/mL)	3.51±1.41	3.44±1.33	3.89±1.36	0.41 [#]
CRP (mg/L)	5.79±1.11	5.47±1.18	5.33±1.19	0.14 [#]
IL-6 (pg/mL)	5.17±1.23	5.76±1.33	5.81±1.37	0.91 [#]
WBC (10 ⁹ /L)	7.57±2.00	7.50±1.81	7.35±1.81	0.41 [#]
RBC (10 ⁹ /L)	4.47±0.51	4.50±0.48	4.52±0.51	0.62 [#]
PLT (10 ⁹ /L)	248.77±72.61	252.77±70.39	250.48±94.29	0.49 [#]
Simptomatska bolest (%)	37.82	45.45	46.88	0.34 [*]
TIA (%)	26.14	17.68	20.0	0.16 [*]

MU (%)	21.59	18.90	14.29	0.57*
KBS , komorbiditet (%)	36.93	38.41	28.57	0.55*
DM (%)	19.89	23.78	14.29	0.39*
Hipertenzija (%)	88.15	84.15	85.71	0.57*

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SD za kontinualne i % za kategorijske varijable; BMI indeks telesne mase, SBP sistolni krvni pritisak, DBP dijastolni krvni pritisak, TH totalni holesterol, HDL lipoprotein visoke gustine, LDL lipoprotein niske gustine, TG trigliceridi, Lp(a) lipoprotein (a), ApoA-I apolipoprotein A-I, ApoB apolipoprotein B, PAI-1 plasminogen aktivatora inhibitor-1, vWf von Willebrand Faktor, CRP C-reaktivni protein, IL-6 interleukin 6, WBC broj belih krvnih ćelija, RBC broj crvenih krvnih ćelija, PLT broj krvnih pločica, TIA prethodni prolazni ishemijski atak, MU moždani udar, KBS koronarna bolest srca, DM dijabetes melitus; # *Kruskal-Wallis* ANOVA, *p Pearson's χ^2 test; Vrednosti $p < 0,05$ se smatraju statistički značajnim

Prilog 4. Inflamatorni, hemostatski i klinički karametri u odnosu na genotip varijante rs32275888 u genu *HACD4* kod bolesnika sa karotidnim plakom.

Genotype	TT	TC	CC	p
Godine	66.26 \pm 7.63	65.36 \pm 8.32	66.38 \pm 7.76	0.86 [#]
BMI (kg/m ²)	26.56 \pm 3,50	26.59 \pm 2.91	27.33 \pm 3.56	0.35 [#]
TH (mmol/L)	5.68 \pm 1.15	5.85 \pm 1.34	5.82 \pm 1.64	0.76 [#]
LDL (mmol/L)	3.63 \pm 1.02	3.75 \pm 1.11	3.86 \pm 1.34	0.51 [#]
HDL (mmol/L)	1.19 \pm 0.33	1.21 \pm 0.34	1.21 \pm 0.42	0.83 [#]
TG (mmol/L)	1.90 \pm 0.96	2.01 \pm 1.70	1.69 \pm 0.78	0.28 [#]
Lp(a) (mg/dL)	31.75 \pm 3.35	30.18 \pm 3.61	31.51 \pm 3.83	0.36 [#]
ApoA-I (g/L)	1.58 \pm 0.40	1.59 \pm 0.47	1.44 \pm 0.33	0.10 [#]
Apo B (g/L)	1.15 \pm 0.28	1.18 \pm 0.42	1.16 \pm 0.39	0.91 [#]
Faktor VII (g/L)	104.54 \pm 26.26	110.49 \pm 32.05	104.19 \pm 37.07	0.96 [#]

Fibrinogen (g/L)	5.15±1.63	5.90±1.55	5.35±1.9	0.70 [#]
vWf (IU/dL)	170.45±66.11	169.36±55.39	192.01±104.25	0.35 [#]
Plasminogen (g/L)	126.78±22.54	123.61±24.43	129.93±23.54	0.33 [#]
PAI-1 (U/mL)	3.56±1.32	3.53±1.37	3.27±1.45	0.26 [#]
CRP (mg/L)	5.95±1.28	4.31±1.04	6.13±1.21	0.57 [#]
IL-6 (pg/mL)	5.83±1.01	4.51±1.06	5.92±1.18	0.24 [#]
WBC (10 ⁹ /L)	7.45±2.00	7.61±1.78	7.45±1.66	0.83 [#]
Simptomatska bolest (%)	47.51	31.62	37.93	0.02*
TIA (%)	21.78	22.96	18.75	0.87*
MU (%)	16.83	22.96	31.25	0.10*
KBS komorbiditet (%)	38.12	34.07	50	0.24*
DM (%)	23.76	20.74	15.63	0.53*
Hipertenzija (%)	88.61	89.63	84.38	0.70*

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD za kontinualne i % za kategorijske varijable; BMI indeks telesne mase, SBP sistolni krvni pritisak, DBP dijastolni krvni pritisak, TH totalni holesterol, HDL lipoprotein visoke gustine, LDL lipoprotein niske gustine, TG trigliceridi, Lp(a) lipoprotein (a), ApoA-I apolipoprotein A-I, ApoB apolipoprotein B, PAI-1 plasminogen aktivatora inhibitor-1, vWf von Willebrand Faktor, CRP C-reaktivni protein, IL-6 interleukin 6, WBC broj belih krvnih ćelija, RBC broj crvenih krvnih ćelija, PLT broj krvnih pločica, TIA prethodni prolazni ishemijski atak, MU moždani udar, KBS koronarna bolest srca, DM dijabetes melitus, . # *Kruskal-Wallis* ANOVA, *p Pearson's χ^2 test; Vrednosti p < 0,05 se smatraju statistički značajnim

Stručna biografija

Ivan R. Životić rođen je 23.07.1986. godine u Požarevcu. Osnovnu školu završio je u Kostolcu, srednju školu završio je u Požarevcu. Osnovne studije u trajanju od 9 semestara na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija, upisao je školske 2005/6 godine i završio u oktobru 2011. godine sa prosečnom ocenom 8,52. Diplomski rad pod nazivom „delecioni polimorfizmi u genima za GST M1 i GST T1 kao faktori rizika za nastanak multiple skleroze“ odbranio je u oktobru 2011. Godine 2011. upisao je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija, modul Molekularna biologija eukariota.

Od aprila 2012. zaposlen je u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ Univerziteta u Beogradu, u sklopu projekta MPNTR Republike Srbije pod nazivom „Integralna studija identifikacije regionalnih genetskih faktora rizika i faktora rizika životne sredine za masovne nezarazne bolesti humane populacije u Srbiji“ (III41028). Godine 2014. biran je u zvanje istraživač saradnik.

Od 2011. publikovao je 3 rada iz oblasti molekularne genetike kardiovaskularnih bolesti, 2 iz kategorije M22 (u kojima je prvi autor) i 1 iz kategorije M23. Četvrti rad je rezultat istraživanja vezanih za molekularnu genetiku multiple skleroze (M22). Autor ili koautor je 16 saopštenja na kongresima međunarodnog značaja štampanih u izvodu. Radovi Ivana Životića do januara 2019. citirani su 15 puta u časopisima kategorije M20 (bez autocitata).

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Иван Животић

Број индекса Б3019/2011

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

“Асоцијација генских варијанти на хромозому 9p21 и транскрипције гена за CDKN2B и HACD4 са настанком атеросклерозе и њеним клиничким компликацијама код човека”

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 31.01.2019.

Иван Животић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације / докторског уметничког пројекта

Име и презиме аутора Иван Животић

Број индекса Б3019/2011

Докторски студијски програм Молекуларна биологија еукариота

Наслов докторске дисертације / докторског уметничког пројекта

“Асоцијација генских варијанти на хромозому 9p21 и транскрипције гена за

CDKN2B и HACD4 са настанком атеросклерозе и њеним клиничким

компликацијама код човека“

Ментор др Маја Живковић

Коментор: проф. др Горан Брајушковић

Потписани (име и презиме аутора) Животић Иван

изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације / докторског уметничког пројекта истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета уметности у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука / доктора уметности, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета уметности Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 31.01.2019.

Животић Иван

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Асоцијација генских варијанти на хромозому 9p21 и транскрипције гена за CDKN2B и HACD4 са настанком атеросклерозе и њеним клиничким компликацијама код човека

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC-BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 31. 01. 2019.

Џиборинт Убач

1. **Ауторство** - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство - некомерцијално – без прераде.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прераде.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство - делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.