

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

Jovana P. Kuveljić

**Povezanost gena *PHACTR1*  
sa nastankom i komplikacijama  
ateroskleroze kod čoveka**

doktorska disertacija

Beograd, 2021.

University of Belgrade

Faculty of Biology

Jovana P. Kuveljić

**Association of *PHACTR1* gene  
with atherosclerosis development  
and subsequent complications in humans**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021.

**Mentori:**

**dr Tamara Đurić Delić**, naučni savetnik

Institut za nuklearne nauke Vinča - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,  
Univerzitet u Beogradu

**dr Miljana Kecmanović**, docent

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Članovi komisije:**

**dr Tamara Đurić Delić**, naučni savetnik

Institut za nuklearne nauke Vinča - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,  
Univerzitet u Beogradu

**dr Miljana Kecmanović**, docent

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**dr Maja Živković**, naučni savetnik

Institut za nuklearne nauke Vinča - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,  
Univerzitet u Beogradu

**Datum odbrane:**

## **Zahvalnica**

*„Moja doktorska disertacija!“, danas mogu da kažem zahvaljući ljudima koji su svako na svoj način tome doprineli.*

*Zahvaljujem se dr Draganu Alavantiću, što mi je omogućio da svoj naučno-istraživački rad započnem u Laboratoriji 080 u kojoj je ova doktorska disertacija osmišljena i urađena.*

*Mojoj mentorki dr Tamari Đurić Delić zahvaljujem se na stručnom vođenju u pisanju naučnih radova i konkretnim komentarima tokom pisanja teze. Tamara, hvala ti, što si odistinski razumela svako stanje u kojem sam se nalazila tokom izrade teze, i profesionalno i privatno.*

*Zahvaljujem dr Miljani Kecmanović, mentorki sa fakulteta, na korisnim komentarima i pomoći u svetlu fakultetske administracije.*

*Zahvaljujem se dr Maji Živković na podršci neophodnoj da uradim i napišem doktorsku tezu, a dr Aleksandri Stanković zahvaljujem na korisnim savetima od početka mog naučno-istraživačkog rada. Zadovoljstvo je biti deo vašeg tima.*

*Zahvaljujem se lekarima i osoblju klinika na kojima su prikupljeni uzorci i vršena njihova klinička karakterizacija.*

*Zahvaljujem svim kolegama iz Laboratorije 080 na stručnim savetima i pomoći u eksperimentalnom radu. Posebno se zahvaljujem kolegama sa kojima sam delila zajedničke laboratorijske početke, a sada i kancelariju. Učinili ste da radno mesto bude srećno mesto.*

*Neizmerno hvala mojim roditeljima na podršci u svakom koraku mog školovanja i života. Mama i tata, ovo stvarno ne bi bilo moguće bez vas. Mnogo vas volim.*

*Mojoj sestri Ani, hvala što je uvek tu za mene i posebno hvala što su slike u doktoratu baš onakve kakvim sam ih zamislila.*

*Hvala Miri i Ljubi, cenim sve što činite za nas.*

*Hvala mojim kumama, sve već znaju i sve razumeju, a podrška je važna. Hvala Ivani, nebrojeno puta me je spasila od svakodnevnog života.*

*Milošu, Ladi i Ivanu, hvala, iako ne razumeju ili baš zato, učinili su da se ne izgubim. Volim vas ćučkovi.*

## Sažetak

### Povezanost gena *PHACTR1* sa nastankom i komplikacijama ateroskleroze kod čoveka

Ateroskleroza je hronična, poligena, inflamatorna bolest krvnih sudova i u osnovi je većine kardiovaskularnih bolesti (KVB). KVB i njihove posledice, infarkt miokarda (IM) i cerebrovaskularni insult (CVI), su vodeći uzrok smrtnosti u Srbiji. Tokom poslednje decenije otkriveno je više od stotinu genskih lokusa povezanih sa KVB, među kojima i gen *PHACTR1*. Iako je povezan sa procesima nastanka i razvoja ateroskleroze, tačna uloga gena *PHACTR1* u KVB još uvek nije potpuno razjašnjena.

Osnovni predmet i cilj ove doktorske disertacije je analiza povezanosti intronskih varijanti rs9349379, rs2026458 i rs2876300 gena *PHACTR1*, pojedinačno i u haplotipu, sa nastankom i komplikacijama ateroskleroze. U studiju su uključeni zdravi ispitanici i ispitanici sa aterosklerozom karotidnih (AKA) i koronarnih (AKOA) arterija. Takođe je ispitan uticaj odabranih varijanti na nivo transkripcije gena u tkivu karotidnog plaka u grupi AKA i *PHACTR1* i *EDN1* u mononuklearnim ćelijama periferne krvi (MČPK) ispitanika sa AKOA šest meseci nakon IM. Deo ispitanika sa AKOA prospektivno je praćen šest meseci u cilju ispitivanja povezanosti gena *PHACTR1* sa remodelovanjem leve komore srca (LK).

Haplotipovi ispitivanih varijanti su asocirani sa prisustvom karotidnog plaka i nivoom iRNK *PHACTR1* u karotidnom plaku i MČPK ispitanika sa AKOA šest meseci nakon IM. Varijanta rs2876300 asocirana je sa višesudovnom bolešću srca, a haplotipovi AT i GC varijanti rs9349379 i rs2026458 sa višim vrednostima SYNTAX skora, što ukazuje na povezanost gena *PHACTR1* sa težim oblikom AKOA. Ispitivane varijante nisu asocirane sa remodelovanjem LK srca, kao ni sa IM i CVI.

Na osnovu dobijenih rezultata zaključili smo da je gen *PHACTR1* asociran sa razvojem uznapredovale ateroskleroze i težih oblika bolesti.

**Ključne reči:** ateroskleroza, *PHACTR1*, genske varijante, haplotipska analiza, transkripcija gena, infarkt miokarda, karotidni plak, mononuklearne ćelije periferne krvi, remodelovanje, leva komora srca

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Molekularna genetika

# Abstract

## Association of *PHACTR1* gene with atherosclerosis development and subsequent complications in humans

Atherosclerosis is a chronic, polygenic, inflammatory disease which underlies most of the cardiovascular diseases (CVDs). CVDs and its consequences, myocardial infarction (MI) and cerebrovascular insult (CVI) are the leading cause of death in Serbia. Throughout the last decade there have been discovered more than hundred gene locuses associated with CVDs, including *PHACTR1* gene. Eventhough, *PHACTR1* is involved in atherosclerosis development and progression its exact role in CVDs is still unknown.

The main subject and aim of this doctoral dissertation was to investigate association of *PHACTR1* intronic variants rs9349379, rs2026458 and rs2876300, individually and in haplotype, with atherosclerosis development and subsequent complications. The study included healthy control group and subjects with carotid (CA) and coronary (COA) atherosclerosis. Also, we have investigated the effect of these variants on *PHACTR1* transcription level in carotid plaque and on *PHACTR1* and *EDN1* in periferal blood mononuclear cells (PBMCs) six months after MI. Subgroup of COA subjects has been followed for six months after MI to investigate the echocardiographic parametrs of heart remodeling.

Haplotypes of investigated variants have been associated with carotid plaque presence and with *PHACTR1* mRNA levels in carotid plaque and in PBMCs of COA subjects six months after MI. Variant rs2876300 has been associated with multi-vessel disease and rs9349379 and rs2026458 haplotypes AT and GC with SYNTAX score higher values, indicating a role of *PHACTR1* in disease severity. There was no association of investigated variants either with MI and CVI or with heart remodeling.

Our results suggest that *PHACTR1* gene is associated with development of advanced atherosclerosis and disease severity.

**Key words:** atherosclerosis, *PHACTR1* gene, gene variants, haplotype analysis, gene transcription, myocardial infarction, carotid plaque, periferal blood mononuclear cells, remodeling, left ventricle

**Scientific field:** Medicine

**Scientific subfield:** Molecular genetics

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Ateroskleroza.....	1
1.1.1. Patogeneza ateroskleroze.....	1
1.1.2. Faktori rizika za nastanak i razvoj ateroskleroze .....	4
1.1.3. Ateroskleroza karotidnih i koronarnih arterija.....	5
1.1.3.1. Cerebrovaskularni insult (CVI).....	6
1.1.3.2. Infarkt miokarda (IM) i proces remodelovanja srca.....	6
1.1.4 Genetika ateroskleroze .....	7
1.2. Reguator protein fosfataze i aktina 1 (PHACTR1) .....	9
1.3. PHACTR1 u aterosklerozi .....	10
1.3.1. Studije asocijacije.....	10
1.3.2. Funkcionalne studije .....	12
1.4. Gen <i>PHACTR1</i> .....	14
1.4.1. Varijante gena <i>PHACTR1</i> .....	15
<b>2. HIPOTEZA I CILJEVI</b> .....	18
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	19
3.1. Materijal.....	20
3.2. Metode.....	21
3.2.1. Klinička karakterizacija uzoraka.....	21
3.2.1.1. Dopler ultrasonografija karotidnih arterija .....	21
3.2.1.2. Elektrokardiografija .....	21
3.2.1.3. Dopler ehokardiografija .....	21
3.2.1.4. Perkutana koronarna intervencija .....	22
3.2.2. Biohemijske analize i anamneza .....	23
3.2.3. Genetičke analize .....	23
3.2.3.1. Ekstrakcija DNK.....	23
3.2.3.2. Merenje koncentracije i procena kvaliteta ekstrahovane DNK .....	23
3.2.3.3. Genotipizacija varijanti rs9349379 A/G, rs2026458 C/T i rs2876300 A/G gena <i>PHACTR1</i> .....	24
3.2.3.4. Ekstrakcija ukupne RNK.....	25
3.2.3.5. Merenje koncentracije i procena kvaliteta ekstrahovane RNK.....	25

3.2.3.6. Reverzna transkripcija informacione RNK (iRNK) .....	25
3.2.3.7. Određivanje relativnog nivoa transkripcije gena <i>PHACTR1</i> i <i>EDN1</i> .....	25
3.2.4. Statističke metode .....	26
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>28</b>
4.1. Ateroskleroza karotidnih arterija (AKA) .....	28
4.1.1. Asocijacija varijanti rs9349379, rs2026458 i rs2876300 gena <i>PHACTR1</i> sa prisustvom karotidnog plaka kod pacijenata sa AKA .....	28
4.1.1.1. Asocijacija haplotipova varijanti gena <i>PHACTR1</i> sa prisustvom karotidnog plaka kod ispitanika sa AKA .....	30
4.1.1.2. Asocijacija haplotipova varijanti gena <i>PHACTR1</i> sa prethodnim simptomatskim događajima i ultrasonografski definisanim tipovima aterosklerotskog plaka .....	31
4.1.2. Nivo transkripcije gena <i>PHACTR1</i> u tkivu karotidnog plaka.....	33
4.1.2.1. Nivo transkripcije gena <i>PHACTR1</i> u odnosu na pojavu prethodnog simptomatskog događaja (CVI, TIA, RIND, VB) i tip ultrasonografski definisanog aterosklerotskog plaka .....	34
4.2. Ateroskleroza koronarnih arterija (AKOA) .....	37
4.2.1. Asocijacija varijanti rs9349379 A/G, rs2026458 C/T i rs2876300 A/G u genu <i>PHACTR1</i> sa prvim infarktom miokarda (IM) .....	37
4.2.1.1. Uticaj haplotipova varijanti gena <i>PHACTR1</i> na nastanak IM.....	39
4.2.1.2. Asocijacija varijanti gena <i>PHACTR1</i> sa parametrima težine bolesti .....	39
4.2.2. Uticaj varijanti gena <i>PHACTR1</i> na remodelovanje leve komore srca, 6 meseci nakon IM .....	41
4.2.3. Nivo transkripcije gena <i>PHACTR1</i> u mononuklearnim ćelijama periferne krvi (MČPK) .....	46
4.2.4. Nivo transkripcije gena <i>EDN1</i> u mononuklearnim ćelijama periferne krvi .....	48
<b>5. DISKUSIJA</b> .....	<b>50</b>
Varijante gena <i>PHACTR1</i> u aterosklerozi karotidnih arterija .....	51
Varijante gena <i>PHACTR1</i> u aterosklerozi koronarnih arterija.....	55
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>60</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>61</b>
Lista skraćenica .....	69
Biografija autora.....	71



# 1. UVOD

## 1.1. Ateroskleroza

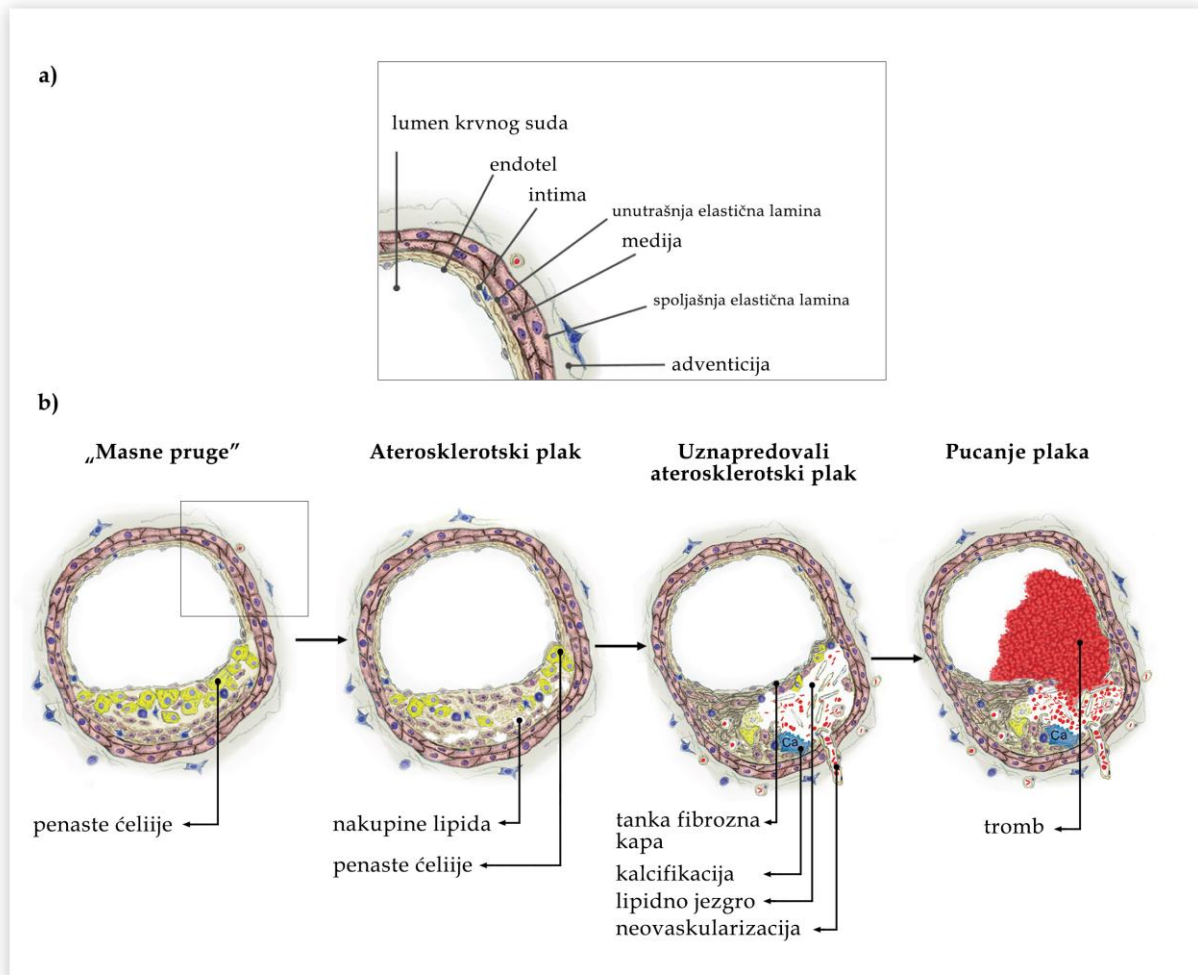
Ateroskleroza je hronična, kompleksna, poligena, inflamatorna bolest krvnih sudova i nalazi se u osnovi većine kardiovaskularnih bolesti (KVB). KVB predstavljaju grupu bolesti srca i krvnih sudova i vodeći su uzrok smrtnosti u svetu. Najveće podgrupe među njima čine: ishemijske bolesti srca, koje mogu dovesti do infarkta miokarda (IM) (srčani udar) i cerebrovaskularne bolesti, koje vode ka cerebrovaskularnom insultu (CVI) (moždani udar). Prema poslednjim podacima Svetske zdravstvene organizacije, tokom 2016. godine u svetu je od posledica KVB umrlo blizu 18 miliona ljudi, a od toga su u 85% smrtnih ishoda uzročnici bili infarkt miokarda ili cerebrovaskularni insult (<https://www.who.int/cardiovascular-diseases>). KVB su vodeći uzrok smrtnosti i u Srbiji, gde su prema podacima Instituta za javno zdravlje Srbije tokom 2019. godine, (<http://www.batut.org.rs/download/publikacije/AKS2019.pdf>) bile uzročnik blizu 52% smrtnih ishoda.

### 1.1.1. Patogeneza ateroskleroze

Ateroskleroza je proces tokom kojeg usled interakcije cirkulišućih faktora i ćelija vaskularnog i imunskog sistema dolazi do formiranja aterosklerotskog plaka u srednjim i velikim krvnim sudovima. U osnovi ove doktorske disertacije bilo je ispitivanje ateroskleroze u karotidnim i koronarnim arterijama koje pripadaju grupi velikih elastičnih arterija [1]. Jedan niz endotelskih ćelija predstavlja barijeru između krvi i tri unutrašnja omotača koji čine zid krvnog suda: intime, medije i adventicije (**Slika U1a**). Endotel, u fiziološkim uslovima, učestvuje u regulaciji vaskularnog tonusa, kontroliše ćelijsku adheziju i proliferaciju glatkih mišićnih ćelija (GMĆ), kao i inflamaciju zida krvnog suda [2]. Različiti faktori mogu izazvati promene u funkcionisanju endotela i dovesti do endotelne disfunkcije koja je predznak razvoja ateroskleroze [3]. Intima je omotač u kome se, pored endotela koji leži na bazalnoj lamini, nalazi tanko subendotelno vezivno tkivo uglavnom sačinjeno od kolagena i proteoglikana. Zatim sledi unutrašnja elastična lamina, pa medija, omotač u kome se nalaze elastična vlakna, vanćelijski matriks (VĆM) i GMĆ. Kod velikih, elastičnih arterija medija je najdeblji omotač u zidu krvnog suda, bogat elastinom i kolagenima, dok je kod perifernih, muskularnih arterija medija dosta tanja, ali sa izraženim prisustvom GMĆ [1]. Oko spoljašnje elastične lamine nalazi se adventicija, omotač sačinjen od rastresitog vezivnog tkiva, u kome se mogu naći masne ćelije, nervna vlakna i krvni sudovi.

Razvoj ateroskleroze započinje na mestima grananja krvnih sudova, gde je krvotok sporiji i gde dolazi do njegovog račvanja i turbulentnog protoka [4]. Rano u životu na podložnim mestima formiraju se adaptivna zadebljanja intime [5]. Unutar ovih zadebljanja, usled veće količine lipida u krvi, može doći do zadržavanja lipoproteina male gustine (eng. *Low-Density Lipoproteins (LDL) Cholesterol*), što je označeno kao proces koji se nalazi u srži nastanka ateroskleroze [6]. LDL sadrži apolipoprotein B koji se u intimi

vezuje za proteoglikane i postaje podložan različitim modifikacijama: oksidaciji, agregaciji, inkorporaciji u imunske komplekse i delovanju enzima [7]. Najčešća modifikacija je oksidacija LDL koja je direktna posledica oksidativnog stresa i formiranja reaktivnih vrsta kiseonika (eng. *reactive oxygen species*, ROS) [8]. Oksidovani LDL dovodi do aktivacije endotela, što podrazumeva da dolazi do lučenja hemoatraktanata i prikazivanja adhezionih molekula kao što su selektini i integrini. Oni zajedno privlače, vezuju i uvlače monocite i limfocite u unutrašnjost zida arterije, čime se, u odgovoru na zadržavanje i modifikaciju LDL, inicira inflamacija, takođe ključan proces u nastanku ateroskleroze [9].



**Slika U1.** a) Omotači u zidu zdrave elastične arterije; b) Faze u razvoju aterosklerotskog plaka. Slika je modifikovana iz Bentzon i sar, *Circ Res*, 2014. [5].

U intimi, monociti se diferenciraju u makrofage koji pod uticajem okolnih faktora, ispoljavaju proinflamatorni (M1) i antiinflamatorni (M2) fenotip [10]. M1 makrofagi sekretuju proinflamatorne citokine, ROS, proteoglikane i tako doprinose zadržavanju, modifikaciji i nakupljanju LDL unutar zida krvnog suda. Takođe, makrofagi prikazuju receptore odgovorne za internalizaciju LDL posredstvom kojih akumuliraju veliku količinu lipida i prelaze u strukture koje se nazivaju penaste ćelije (eng. *foam cells*) [7]. Prisutnost nekoliko slojeva penastih ćelija, još uvek je začetak ateroskleroze, označen kao pojava „masnih pruga“. Dok je pojava nakupina lipida ispod slojeva penastih ćelija znak patološkog zadebljanja intime i formiranja aterosklerotskog plaka [5] (**Slika U1b**). Penaste ćelije su karakteristične, konstitutivne ćelije aterosklerotskog plaka, one sintetišu različite

molekule, kao što su citokini, faktori rasta, metaloproteinaze matriksa (MMP) i ROS, koji dovode do pojačanja imunskog odgovora, remodelovanja VCM i uopšteno do progresije aterosleroze [11]. Važan korak u razvoju aterosklerotskog plaka je prelazak GMC iz medije u intimu zida krvnog suda [12]. GMC, u intimi, prelaze iz fiziološkog, kontraktilnog fenotipa u patološki, sekretorni fenotip i sintetišu većinu komponenti VCM intime zida arterije, proteoglikane, elastin, kolagen, kao i enzime odgovorne za održavanje homeostaze ovih komponenti. Mnoge od komponenti VCM mogu da vezuju lipoproteine i tako doprinose akumulaciji lipida u intimi zida krvnog suda. GMC, kao i makrofagi, akumuliraju lipide i prelaze u penaste ćelije. Nagomilavanje oksidovanih LDL aktivira proces apoptoze u penastim ćelijama. U uznapređovalom aterosklerotskom plaku proces eferocitoze postaje defektan [13], što znači da je uklanjanje ostataka apoptozom zahvaćenih penastih ćelija nepotpuno i tada dolazi do nekroze plaka [14]. Usled apoptoze i nekroze penastih ćelija formira se nekrotično lipidno jezgo, oslobođeno svih ćelijskih komponenti i potpornih vlakana, koje je izuzetno trombogeno u kontaktu sa komponentama krvi, jer sadrži protrombogene oksidovane lipide i obloženo je tkivnim faktorom [15]. Lipidno jezgo je od krvi koja protiče lumenom arterije razdvojeno tankom fibroznom kapom, u kojoj su pored kolagena i proteoglikana, prisutni makrofagi i GMC, a inflamacija je izražena [7]. Kontinuirana inflamacija, nakupljanje lipida, remodelovanje VCM, apoptoza i nekroza makrofaga i GMC, transformisanih u penaste ćelije, dovode do formiranja i uvećanja aterosklerotskog plaka.

Preko 40% unutrašnjosti uznapređovalog aterosklerotskog plaka čini veliko lipidno jezgro, poreklom od apoptoze i nekroze penastih ćelija, kao i nakupina lipida unutar VCM intime [16]. Lipidnu srž plaka prekriva tanka fibrozna kapa koja, kako napreduje razvoj plaka, postaje sve tanja i sa manjom količinom GMC i fibroznog vezivnog tkiva. Stabilnost plaka i fibrozne kape zavise od ravnoteže između procesa produkcije i degradacije VCM, koji je pod uticajem produkata znatnog broja inflamatornih ćelija prisutnih u fibroznoj kapi [17]. Takođe, procesi kalcifikacije i neovaskularizacije, koji su intenzivni u uznapređovalom aterosklerotskom plaku, mogu uticati na njegovu stabilnost. Proces kalcifikacije može zahvatiti i intimu i mediju zida krvnog suda [18]. Kalcifikacija u mediji smanjuje elastičnost i prilagodljivost zida krvnog suda [18], dok se kalcifikacija u intimi odnosi na plak. Kalcifikacije plaka koje su tačkaste i male povećavaju rizik za pucanjem plaka [19], dok veće kalcifikacije doprinose okluziji krvnog suda i češće su kod asimptomatskih i stabilnih oblika bolesti [19]. Kalcifikacija je proces koji se odvija u dve faze. U početku su kalcifikacije male, indukuju inflamaciju i povećavaju otpor protoku krvi, što je destabilišući faktor. Kasnije, kalcifikacije su veće i povećavaju stenozu krvnog suda [20]. Generalno posmatrano kalcifikacija je više znak povećanog aterosklerotskog opterećenja i sistemske podložnosti aterosklerozi, nego što je obeležje plaka sklonog pucanju [21]. Neovaskularizacija u svom začetku možda doprinosi stabilnosti plaka dopremanjem nutrijenata i sprečavanjem nekroze, ali u uznapređovalom plaku pospešuje inflamaciju i može dovesti do krvarenja unutar plaka [7], koje je nezavisno asocirano sa budućim kardiovaskularnim (KV) događajima [22]. Pored bioloških procesa i dinamika protoka krvi, odnosno hemodinamički faktori, utiču na stabilnost plaka. Tako do pucanja plaka dolazi na mestima gde je otpor protoku krvi najveći, to su najčešće ivice plaka, koje obiluju penastim ćelijama, kao i mesta između tačkastih kalcifikacija [18]. Ukoliko trombogeni sadržaj iz unutrašnjosti plaka dođe u kontakt sa komponentama krvi, dolazi do aktivacije krvnih pločica, njihove agregacije što može dovesti do tromboze. Postoje tri načina da se trombogeni sadržaj izlije iz unutrašnjosti plaka: pucanje plaka, erozija plaka i formiranje kalcifikovanog čvora [16, 23]. Pucanje plaka je najčešći mehanizam putem kojeg

ateroskleroza dovodi do tromboze i smrtnog ishoda [24, 25]. Prilikom pucanja plaka narušava se tanka fibrozna kapa, trombogeni sadržaj se izliva i u stalnom je kontaktu sa nekrotičnim lipidnim jezgrom [16]. Regioni u kojima dolazi do pucanja plaka odlikuju se pozitivnim remodelovanjem VCM krvnog suda, te je tako stepen stenozе često nizak, do 50%, na mestima pucanja plaka [26, 27]. Regioni u kojima dolazi do erozije plaka ili formiranja kalcifikovanog čvora imaju visok stepen stenozе, preko 70%, i odlikuju se negativnim remodelovanjem [25]. Faktori rizika i mehanizam kojim dolazi do erozije plaka drugačiji su i manje ispitani nego u slučaju pucanja plaka. Endotel je odsutan na mestima formiranja tromba usled erozije plaka [16], a inflamacija i velika količina makrofaga koji imaju glavnu ulogu u mehanizmu pucanja plaka, nisu prisutni kod erozije plaka. Formiranje kalcifikovanog čvora događa se kada je proces kalcifikacije intenzivan, pri čemu može doći i do okoštavanja. Tada, što se dešava vrlo retko, kalcifikovani čvor može probiti tanku fibrozu kapu plaka i dovesti do tromboze [16]. Ipak, ne dovodi svako izlivanje sadržaja plaka do KV događaja, ali svakako doprinosi degradaciji zida krvnog suda i povećava njegovu podložnost aterosklerozi [28].

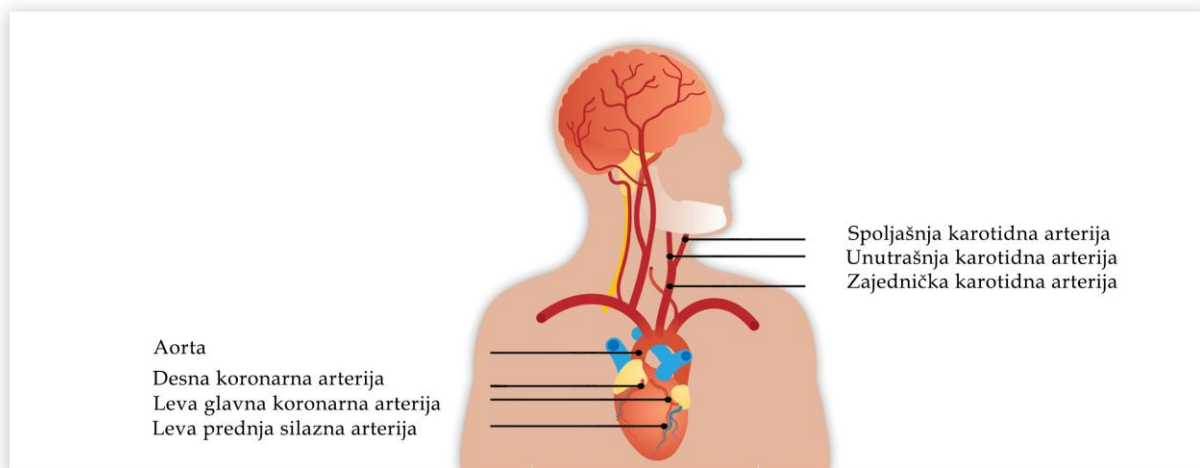
### 1.1.2. Faktori rizika za nastanak i razvoj ateroskleroze

Na nastanak i razvoj ateroskleroze utiču različiti genski i sredinski faktori, kao i životne navike. Naslednost ateroskleroze je 40-50% [29], tako da je porodična istorija KVB bitna za procenu rizika za nastanak bolesti. Uobičajenim faktorima rizika pripisuje se približno 75% odgovornosti za razvoj kardiovaskularnih bolesti [30]. Ipak njihov efekat je kumulativan i nijedan se ne može izdvojiti kao poseban uzročnik bolesti, zbog čega ateroskleroza i jeste multifaktorijalna kompleksna bolest. Faktori rizika mogu se svrstati u dve grupe prema tome da li na njih možemo uticati ili ne. Nepromenljivi faktori rizika, oni na koje se ne može uticati, su starenje, pol i porodična istorija bolesti. Starenje je jedan od značajnih faktora rizika, jer je ateroskleroza progresivna bolest, počinje u ranom životnom dobu i razvija se dugi niz godina [31]. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije, među osobama starijim od šezdeset godina, koronarna bolest i CVI zauzimaju dva vodeća mesta po broju umrlih u svetu. Generalno posmatrano, muškarci u ranijem životnom dobu nose veći rizik za razvoj KVB u odnosu na žene, ali se nakon šezdesete godine života, nakon menopauze kod žena taj rizik i procenat obolelih izjednačava [32]. Žene kasnije u životu iskazuju simptome ateroskleroze u odnosu na muškarce, ali je ishod uglavnom teži, u bilo kom životnom dobu. Rasna i etnička pripadnost, takođe su faktori na koje se ne može uticati, ali su u jakoj sprezi sa soci-ekonomskim faktorima [33]. Faktori rizika na koje se može uticati prevencijom i promenom životnih navika su: nivo lipida i šećera u krvi, krvni pritisak, pušenje, ishrana, gojaznost i fizička aktivnost [30].

Faktori rizika, kao što su starenje, hipertenzija, dijabetes, hiperholesterolemija i pušenje, utiču na adaptivne mehanizme koji obezbeđuju adekvatnu perfuziju vitalnih organa i tako uticajem na strukturu i funkciju krvnih sudova omogućavaju razvoj ateroskleroze [34]. Faktori rizika povećavaju produkciju ROS i dovode do oksidativnog stresa koji sa jedne strane ugrožava bioaktivnost NO [35], a sa druge omogućava stvaranje oksidovanih LDL [36]. NO je glavni vazodilatator i njegova brojna korisna dejstva, kao što su antitrombogeni i antiinflamatorni efekat, štite kardiovaskularni sistem [37]. Gubitkom pozitivnih efekata NO dolazi do agregacije krvnih pločica, adhezije leukocita, proliferacije GMĆ i pojačane inflamacije, a formiranje oksidovanih LDL vodi endotelnoj disfunkciji i

stvaranju aterosklerotskog plaka [8]. Sama inflamacija povećava produkciju ROS i na taj način nastaje pozitivna povratna sprega kojom se omogućava promena u strukturi i funkciji krvnih sudova i razvoj ateroskleroze.

### 1.1.3. Ateroskleroza karotidnih i koronarnih arterija



**Slika U2.** Glavne arterije krvotoka mozga i srca. Slika je modifikovana sa [medicalnewstoday.com](http://medicalnewstoday.com)

Ateroskleroza krvnih sudova koji snabdevaju dva vitalna organa, mozak i srce (**Slika U2**), slična je prema patogenezi i mestu nastanka plaka, što ukazuje na delovanje sistemskih medijatora u vaskularnim krvnim sudovima [38]. Morfologija plaka donekle se razlikuje, pa tako karotidni plak ima deblju fibroznu kapu, do 200  $\mu\text{m}$ , dok je debljina fibrozne kape kod plaka u koronarnim arterijama, do 65  $\mu\text{m}$  [39]. Karotidni aterosklerotski plak podložniji je krvarenju unutar plaka i stvaranju ulceracija, u poređenju sa plakom u koronarnim arterijama [40]. Erozijski plak češća je u koronarnim u odnosu na karotidne arterije, ali je pucanje plaka u oba sistema glavni mehanizam koji dovodi do tromboze. Formiranje kalcifikovanog čvora, iako retka pojava, češće se događa u karotidnim arterijama nego u koronarnim [40]. Step en stenoz e u korelaciji je sa progresijom ateroskleroze u karotidnim arterijama, dok u koronarnim arterijama može doći do akutnog događaja i pri niskom stepenu stenoz e [39], ipak totalna okluzija češća je u koronarnim arterijama [40]. Faktori rizika za nastanak i razvoj ateroskleroze isti su ovim arterijskim sistemima, ipak njihov uticaj se donekle razlikuje, pa je tako visok krvni pritisak glavni faktor rizika za CVI [41], dok je visok nivo lipida u krvi najznačajniji faktor rizika za razvoj koronarne bolesti (KB) [42]. Ateroskleroza karotidnih arterija dijagnostifikuje se kasnije u životu, iako se rizik za CVI duplira sa svakom dekadom nakon 55 godine života, i kod žena i kod muškaraca [33]. Razvoj ateroskleroze u više od jednog sistema u organizmu svakako nosi povišen rizik od akutnih događaja, pa je tako IM glavni uzrok smrtnosti onih koji su preživeli CVI [43], a asimptomatska stenoz a karotidnih arterija je nosilac visokog rizika za IM [32].

### 1.1.3.1. Cerebrovaskularni insult (CVI)

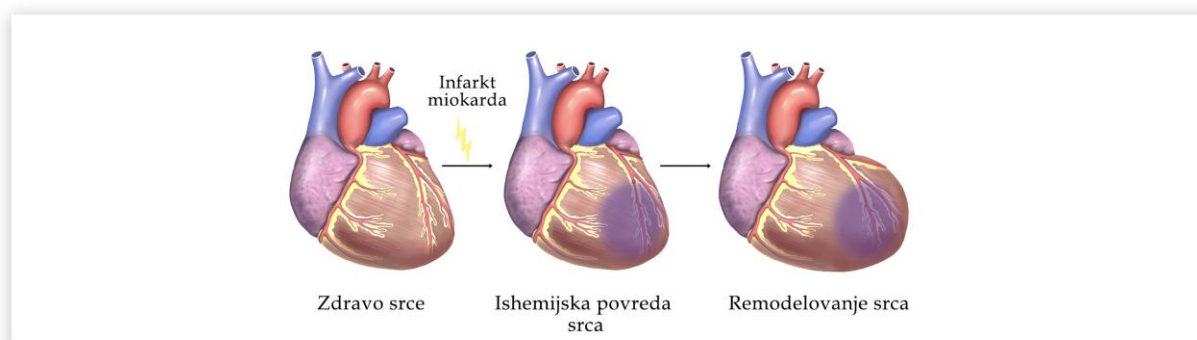
Cerebrovaskularni insult ili infarkt mozga, poznatiji kao šlog, treći je uzrok smrtnosti u svetu, prema podacima Svetske zdravstvene organizacije, sa blizu 6 miliona žrtava godišnje, od čega oko 3 miliona žena i preko 2,5 miliona muškaraca. Pored velike smrtnosti, CVI je jedan od najvećih uzročnika invaliditeta, jer se preko 50% preživelih nikada ne vrati samostalnom funkcionisanju [44, 45]. CVI može biti ishemijski ili hemoragijski. Hemoragijski CVI nastaje kao posledica povrede moždanih krvnih sudova i krvarenja, dok je ishemijski CVI posledica ateroskleroze karotidnih arterija koje snabdevaju mozak neophodnim nutrijentima i kiseonikom [46]. Ishemijski CVI je daleko zastupljeniji, preko 85% slučajeva CVI nastaju usled ateroskleroze i posledične ishemije mozga [33]. Aterosklerotski plak najčešće se formira na mestu račvanja zajedničke karotidne arterije na unutrašnju i spoljašnju karotidnu arteriju, gde je protok krvi usporen i nagomilavanje lipida omogućeno. Zakrčenjem karotidnih arterija oslabljen je ili onemogućen dotok kiseonika i hranljivih materija u prednji deo moždanih hemisfera, optičke nerve i retinu, usled čega dolazi do odumiranja neurona i ishemijskog CVI [47].

### 1.1.3.2. Infarkt miokarda (IM) i proces remodelovanja srca

Infarkt miokarda, kao smrtonosna posledica koronarne bolesti, glavni je uzročnik smrtnosti u svetu. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije, od posledica IM godišnje život izgubi više od 7 miliona ljudi, skoro 4 miliona muškaraca i blizu 3,5 miliona žena. Ateroskleroza koronarnih arterija dovodi do zakrčenja arterija koje snabdevaju srce nutrijentima i kiseonikom i omogućavaju funkcionisanje srčanog mišića. Srce se sastoji od tri sloja: epikarda, miokarda i endokarda. Miokard je srčani mišić, odnosno kontraktilna komponenta srca, koju čine kardiomiociti, VCM i kapilarna mikrocirkulacija. Prilikom IM kardiomiociti odumiru, jer postoji neravnoteža u dotoku kiseonika i njegovoj potražnji, odnosno dolazi do ishemijske povrede srca. Uspostavljanjem normalnog srčanog krvotoka, u intervalu kraćem od 15-20 minuta, može se omogućiti da posledice ishemije ne budu trajne i da ne dođe do gubitka kardiomiocita [48]. Ishemija direktno utiče na kontraktilnu sposobnost kardiomiocita [49]. Na ovaj proces se troši najviše energije, pa se generišu neorganski fosfati i povećava acidoza u ćeliji, što onemogućava vezivanje kalcijuma za kontraktilne proteine, odnosno dolazi do inhibicije kontraktilnosti. Pored apoptoze i nekroze kardiomiocita, prisutan je i proces autofagije, ali nije sasvim jasno da li je on u funkciji ćelijske smrti ili preživljavanja i pokušaja obnavljanja izvora energije [50]. IM dovodi do masovnog gubitka kardiomiocita koji se ogleda u modifikaciji geometrije zida leve komore srca [49].

Odgovor srca na ishemijsku povredu je proces remodelovanja [51, 52] koji inicijalno predstavlja mehanizam za oporavak srca, uklanjanje ostataka kardiomiocita, stvaranje dodatnog, novog VCM i formiranje ožiljnog tkiva, što ima za svrhu restauraciju prethodne strukture i funkcije zida leve komore srca. Proces remodelovanja odnosi se na oporavak tkiva koje je pogođeno ishemijom, ali i na težnju okolnog tkiva da nadomesti gubitak, kroz hipertrofiju nepogođenih ćelija i dilataciju komore [49] (**Slika U3**). Na mestu povrede prvo počinje razgradnja VCM, što omogućava ulazak inflamatornih ćelija, indukciju sinteze peptida i citokina. Fagociti obavljaju uklanjanje ostataka kardiomiocita i ujedno otpuštaju

antiinflamatorne faktore, označavajući završetak inflamatorne faze. Nakon inflamatorne faze, sledi proliferativna faza koju karakterišu proliferacija makrofaga i fibroblasta i produkcija komponenti VĆM, čime se stvara potpora za formiranje ožiljnog tkiva [53]. U fazi maturacije, dolazi do uklanjanja ćelija koje su učestvovala u reparaciji srca i do povezivanja komponenti VĆM u stabilno ožiljno tkivo [49]. Ukoliko se faze inflamacije i proliferacije prolongiraju proces remodelovanja može, od korisnog i neophodnog za preživljavanje, postati maladaptivan. Preopterećenje srca pod pritiskom i zapreminom prispele krvi u periodu nakon IM, faktori su koji putem maladaptivnog remodelovanja vode srčanoj insuficijenciji [54]. Preopterećenje pritiskom vodi ka koncentričnom hipertrofičnom remodelovanju i povećanju količine kolagena u miokardu za tri do šest puta [55]. Remodelovanje pri preopterećenju zapreminom nije koncentrično, već je posledica izduživanja hipertrofiranih ćelija i doprinosi dilataciji komore [56]. Pored mehaničkih faktora, pritiska i zapremine, na preces remodelovanja utiču i različiti biohemijski faktori prisutni u tkivu miokarda, među kojima metaloproteinaze matriksa (MMP) imaju najznačajniju ulogu. Ravnoteža u aktivnosti MMP i njihovih tkivnih inhibitora (TIMP) ključni je faktor u procesu remodelovanja, jer je regulator degradacije kolagena tipa I i III koji su osnovni konstituenti VĆM miokarda [53]. MMP mogu da, pored komponenti VĆM, degraduju i citokine, hemokine i faktore rasta, i na taj način učestvuju u regulaciji imunskog odgovora [57]. Takođe, lokalna aktivacija renin-angiotenzin-aldosteron sistema (RAAS), posebno njegovih komponenti, aldosterona i angiotenzina II, intenzivira fibrozu i srčanu hipertrofiju [56].



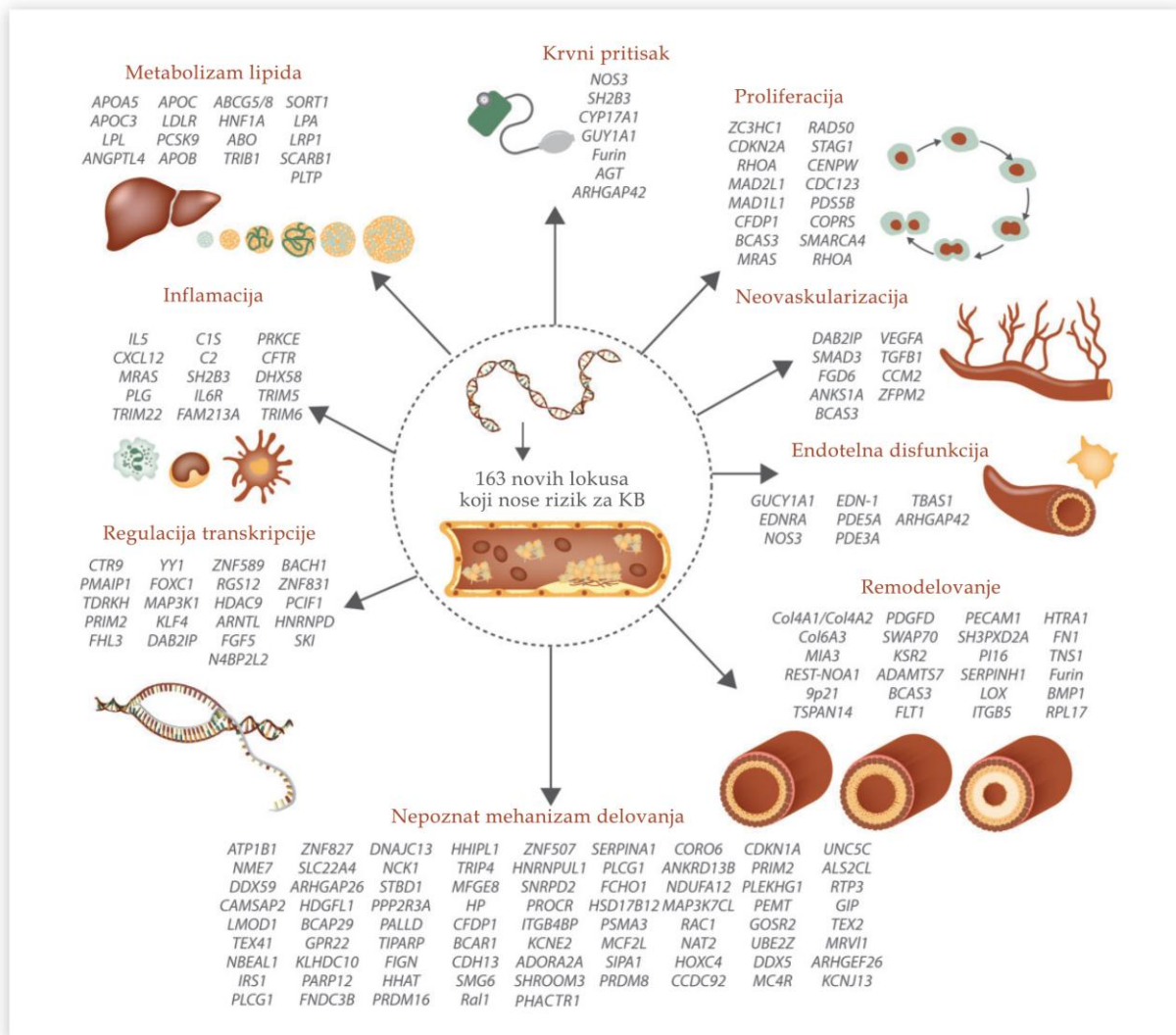
**Slika U3.** Infarkt miokarda i remodelovanje srca. Slika je modifikovana iz Sciarretta i sar, *J Am Coll Cardiol*, 2018. [58].

### 1.1.4 Genetika ateroskleroze

Produbljivanje istraživanja na polju ateroskleroze dovelo je do ispitivanja gena i mehanizama njihovog regulisanja koji se nalaze u pozadini procesa nastanka i razvoja ateroskleroze. Imajući u vidu jaku vezu između metabolizma lipida i ateroskleroze, genetičke studije asocijacije unutar familija dovele su do otkrivanja nekoliko gena uzročnika familijarne hiperholesterolemije, bolesti uz koju se rano razvija ateroskleroza usled vrlo povišenog nivoa lipida u krvi. Delecija u genu za LDL receptor, *LDLR* [59] i mutacije u genima *APOB* [60] i *PCSK9* [61], retki su primeri gde je jedan gen uzročnik kompleksne bolesti. Mnogo češće, više gena dovodi do razvoja kompleksnih, čestih,



nezaraznih bolesti, kao što je ateroskleroza [62]. Razvoj nauke i tehnologije ubrzao je proces otkrivanja gena uzročnika kompleksnih bolesti i omogućio pretragu celokupnog genoma i više miliona varijanti u cilju asocijacije sa različitim fenotipova (eng. *Genome Wide Association Studies*, GWAS). Danas je moguće konstruisati panele sa čitavim nizom genskih varijanti koje doprinose razvoju određenog fenotipa i odrediti stepen genetičkog rizika za oboljevanje [63].



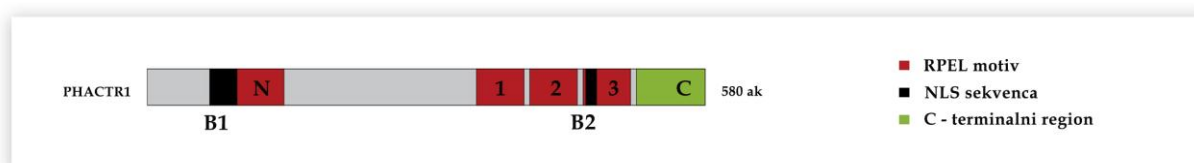
**Slika U4.** Novi lokusi povezani sa KB u GWA studijama. Slika je modifikovana iz Erdmann i sar, *Cardiovasc Res*, 2018. [64].

Studije asocijacije celokupnog genoma (GWA studije) analiziraju izuzetno veliki broj genskih varijanti koje pripadaju grupi izmena jednog nukleotida (eng. *single nucleotide variant*) duž celog genoma [65], što je postalo moguće nakon projekta HapMap koji je identifikovao i mapirao preko tri miliona genskih varijanti u humanom genomu [66]. Prve GWA studije primenjene su u kardiovaskularnim bolestima 2007. godine, kada su tri nezavisne studije asociirale lokus 9p21 sa povećanim rizikom za nastanak koronarne bolesti (KB) i infarkta miokarda [67-69]. Od tada su GWA studije rađene na sve većem broju ispitanika i na različitim fenotipovima kardiovaskularnih bolesti, uključujući KB, IM, cerebrovaskularni insult, kao i disekciju cervikalnih arterija. Do danas GWA studije su otkrile 163 novih lokusa asociiranih sa KB [63] i pokazale su da najveći procenat genetičke



varijabilnosti KB nose upravo česte nekodirajuće genske varijante, a da dve trećine ove varijabilnosti nije u vezi sa tradicionalnim faktorima rizika (**Slika U4**). U proseku svaka od ovih varijanti nosi malu genetičku varijabilnost, oko 8%, ali je njihov kumulativni efekat ono što pravi razliku. Zajedno sa nekoliko stotina varijanti pri čijem otkrivanju je prag lažno pozitivnih rezultata podignut na 5% (eng. false discovery rate, FDR), ovih 163 novih lokusa, su odgovorni za oko 40% genetičke varijabilnosti KB.

## 1.2. Reguator protein fosfataze i aktina 1 (PHACTR1)



**Slika U5.** Funkcionalni domeni proteina PHACTR1. Slika je modifikovana iz Mouilleron i sar, *Cell*, 2012. [70].

Reguator protein fosfataze i aktina 1 (eng. *protein phosphatase and actin regulator 1*, PHACTR1) pripada familiji od četiri proteina koji su aktin vezujući regulatori protein fosfataze 1 [71]. C-terminalni region ovih proteina izrazito je očuvan, on omogućava vezivanje protein fosfataze 1, a prethode mu tri RPEL motiva za koje se vezuje G-aktin. N-terminalni region poseduje jedan RPEL motiv, a na oba kraja proteina nalaze se NLS (eng. *nuclear localisation signals*) sekvence (**Slika U5**) [72]. Protein fosfataza 1 (eng. *protein phosphatase 1*, PP1) je enzim, iz grupe serin/treonin fosfataza, uključen u širok spektar fizioloških procesa, što se postiže postojanjem jedne katalitičke subjedinice (PP1c) i mnoštvom subjedinica koje svojim vezivanjem za PP1c određuju mesto njenog delovanja u ćeliji i/ili supstrat na koji će delovati. Identifikovano je preko pedeset ovakvih subjedinica i većina njih poseduje karakterističan domen (RVxF) kojim vezuje PP1c [73]. PHACTR1 je supstrat specifični jedarni aktivator protein fosfataze 1, a inhibira aktivnost PP1 prema njenom najčešćem supstratu, fosforilazi a [71]. Domen za vezivanje PP1c, LIRF, sličan je RVxF, a kod PHACTR1 se preklapa sa trećim aktin vezujućim RPEL3 motivom, zbog čega i postoji kompeticija između G-aktina i PP1c [74]. Subcelularna lokalizacija PHACTR1 regulisana je citosolnom koncentracijom slobodnog G-aktina. U citoplazmi G-aktin se vezuje za PHACTR1 tako da, osim što onemogućava vezivanje PP1c, onesposobljava i interakciju importina  $\alpha$ - $\beta$  sa NLS sekvencama i translokaciju PHACTR1 u jedro. Rho-indukovana polimerizacija G-aktina u F-aktin dovodi do ulaska PHACTR1 u jedro, gde je slobodan da veže PP1c i idukuje formiranje aberantnih aktomiozinskih struktura [72]. Supstrati koji su meta PHACTR1/PP1c holoenzima nalaze se u jedru i uglavnom su komponente citoskeleta i njihovi regulatori. Vezivanje PHACTR1 C-terminalnog regiona dovodi do rearanžmana hidrofobnog džepa PP1c i formiranja novog specifičnog katalitičkog mesta [74]. U primarnoj strukturi PHACTR1 uočeno je osam mesta za fosforilaciju protein kinazom A (PKA) i sedam za fosforilaciju protein kinazom C (PKC), lokalizovanih oko RPEL motiva. Fosforilacijom ovih mesta, potencijalno se na još jedan

način menja interakcija PHACTR1 sa aktinom i vrši regulacija veze PP1c sa supstratom [71].

Posmatrajući organe i tkiva čoveka, protein PHACTR1 je najviše zastupljen u mozgu, a zatim slede pluća i testisi, a iRNK *PHACTR1* najviše je zastupljena, takođe, u mozgu, ali i u krvi, a zatim u srcu i plućima [75]. Ovo su podaci sumirani iz nekoliko sveobuhvatnih baza podataka, ali su i pojedinačne studije na animalnim modelima i humanim panelima tkivnih uzoraka, došle do sličnih zapažanja. Najviši nivo transkripcije gena *PHACTR1*, kod miša, bio je pronađen u mozgu, plućima, aorti, bubrezima i srcu [76]. Transkripti *PHACTR1* bili su detektovani i u vaskularnom tkivu miša, u mišijim EĆ i GMĆ, kao i u aterosklerotskim lezijama [77]. Kod pacova, iRNK *PHACTR1* bila je detektovana u najvećem obimu u mozgu, ali je bila prisutna i u srcu, plućima, testisima i bubrezima, dok je protein PHACTR1 bio detektovan samo u mozgu [71]. Relativni nivo transkripcije gena *PHACTR1*, u humanim tkivima, bio je visok u srcu, aorti i mozgu, a najviši u srcu nakon infarkta miokarda [78]. Prisustvo proteina PHACTR1, u arterijama zdravih ispitanika, bilo je detektovano u endotelskim i imunskim ćelijama, ali ne i u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama [79]. U arterijama obolelih od ateroskleroze, protein PHACTR1 bio je lokalizovan u aterosklerotskom plaku, ponajviše u makrofagima i penastim ćelijama, nešto manje u EĆ [79], i izuzetno slabo u GMĆ koronarnih arterija [80].

## 1.3. PHACTR1 u aterosklerozi

### 1.3.1. Studije asocijacije

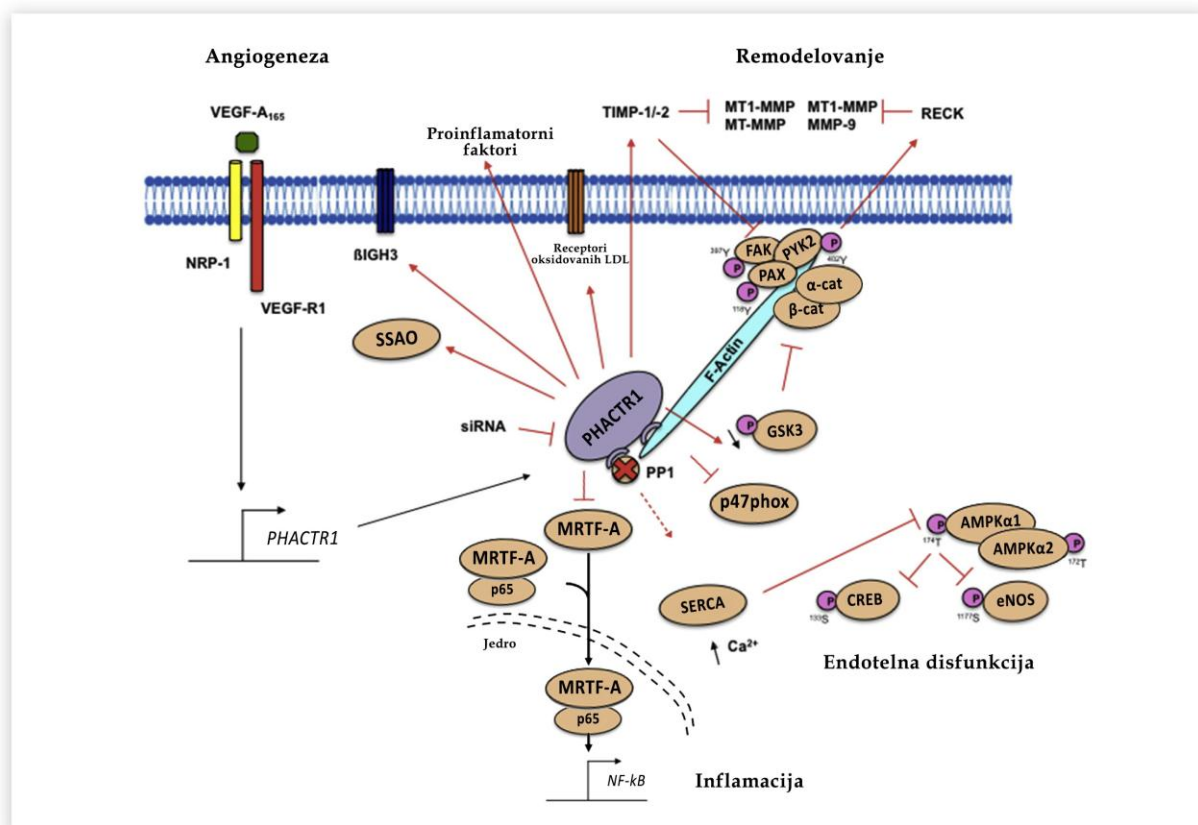
Od 2009. godine gen *PHACTR1* nalazi se u sferi interesovanja istraživača koji proučavaju KVB, kada su Kathiresan i sar. [81] u velikoj GWA studiji prvi put povezali gensku varijantu iz lokusa 6p24 sa ranim infarktom miokarda. GWA studija je obuhvatila oko tri hiljade ispitanika sa ranim IM i isto toliko zdravih ispitanika u prvoj fazi, dok je posle još tri faze validacije, urađena meta-analiza na ukupno dvadeset pet hiljada ispitanika. Varijanta u genu *PHACTR1*, rs12526453, dostigla je predodređenu GWAS značajnost ( $p < 5 \times 10^{-8}$ ), i sa još osam genskih varijanti, od 1433 koje su prošle prvu GWAS fazu, pokazala povezanost sa ranim IM. Konzorcijum CARDIoGRAM je 2011. godine, okupio dvadeset dve hiljade ispitanika sa koronarnom bolešću i skoro tri puta više zdravih ispitanika evropskog porekla u najvećoj do tada GWA studiji iz oblasti kardiovaskularnih bolesti [82]. Trinaest novih lokusa, zajedno sa varijantama prethodno asociiranim sa različitim fenotipovima KB, analizirano je kod dodatnih pedeset sedam hiljada ispitanika. U ovoj studiji validirana je asocijacija lokusa 6p24 sa koronarnom bolesti preko varijante rs12526453, u genu *PHACTR1*. Varijanta rs9349379 u genu *PHACTR1*, najjače je asociirana genska varijanta sa KB, u GWA studiji C4D konzorcijuma na preko četrdeset hiljada ispitanika [83], što ukazuje na to da je rs9349379 potencijalno bolji marker asocijacije lokusa 6p24 i gena *PHACTR1* sa KB. Iste godine urađena je GWA studija koja je asociirala varijante u genu *PHACTR1* sa kalcifikacijom koronarnih arterija (KKA) [84]. O'Donnel i sar. su pokazali asocijaciju varijanti rs9349379, rs2026458 i rs12526453, u genu *PHACTR1*, sa KKA na skoro deset hiljada učesnika u GWA studiji. Varijante koje su pokazale značajnu povezanost sa KKA, validirane su i u GWA studiji sa preko trideset

četiri hiljade ispitanika, od kojih je skoro sedam hiljada imalo IM [84]. Varijanta rs9349379 u genu *PHACTR1* izdvojila se kao genska varijanta najjače asocirana sa IM, a koja je prethodno bila asocirana sa KKA zajedno sa genskom varijantom iz lokusa 9p21. Asocijacija ove tri varijante u genu *PHACTR1* sa KKA potvrđena je u GWA studiji Pechlivanis i sar. pri čemu se varijanta rs9349379 istakla kao vodeća [85]. Bevan i sar. su 2012. godine ispitivali povezanost cerebrovaskularnog insulta i genskih varijanti, do tada asociranih u GWA studijama sa različitim fenotipovima KB. Varijanta rs12526453 u genu *PHACTR1* asocirana je sa CVI, konkretno sa podtipom CVI velikih arterija (large vessel atherosclerotic stroke), na uzorku od skoro četiri hiljade ispitanika sa CVI i šest hiljada zdravih ispitanika [86]. Udruženi konzorcijumi CARDIoGRAMplusC4D, 2012. godine, dostižu preko 190000 ispitanika, a u studiji je identifikovano petnaest novih lokusa potencijalno značajnih za nastanak i razvoj koronarne bolesti [87]. Od 46 novih lokusa, do tad identifikovanih, 12 lokusa značajno je asocirano sa metaboličkim putevima lipida, 5 sa regulacijom krvnog pritiska, a nijedan sa dijabetesom. *PHACTR1* lokus nije pokazao značajnu asocijaciju ni sa jednim od puteva povezanih sa tradicionalnim faktorima rizika. Analiza razgranatosti mreže gena i njihove međusobne interakcije pokazala je da je većina ovih lokusa uključena u puteve koji su povezani sa metabolizmom lipida i inflamacijom, ukazujući na to da ovo jesu ključni procesi u razvoju koronarne bolesti.

GWA studije su izuzetno značajne jer mogu iznedriti nove ideje i pravce istraživanja, ali zahtevaju validaciju rezultata i funkcionalne studije pogotovo kada ukazuju na gene koji ranije nisu povezivani sa ispitivanim fenotipom i faktorima rizika. Nakon GWA studija usledile su studije koje su ispitivale funkcionalnost novo-otkrivenih varijanti. Studije asocijacije genskih varijanti sa fenotipom (eng. *Phenome Wide Association Studies*, PheWAS), za razliku od GWA studija koje su tražile asocijaciju jednog fenotipa među hiljadama varijanti, polazile su od genske varijante i tražile asocijaciju među hiljadama dobro definisanih fenotipova [88]. PheWA studija potvrdila je asocijaciju genske varijante rs9349379 sa KB i migrenom [89]. Zatim su usledile studije bazirane na drugom Mendelovom zakonu o slučajnom izboru (eng. *Mendelian Randomization (MR) Studies*) kojima je cilj bio da utvrde da li je asocijacija između biomarkera/genske varijante i fenotipa/bolesti uzročno-posledična [90]. Pokazale su se korisnim za neke od pronađenih genskih varijanti, jer su nedvosmisleno potvrdile ili opovrgle njihovu vezu sa ispitivanim fenotipom. Tako je pokazano da LDL holesterol, trigliceridi i lipoprotein (a) imaju uzročno-posledičnu vezu sa KB, dok HDL holesterol i C reaktivni protein (CRP) nemaju. Jedan od osnovnih preduslova pri odabiru varijanti za učešće u MR studiji bio je da genska varijanta utiče samo na jedan fenotip, tj. da nije plejotropna. To je automatski smanjilo broj kandidata iz GWA studija, jer je više od polovine novo-otkrivenih varijanti pokazivalo izraziti plejotropni efekat, uključujući i varijante u genu *PHACTR1*. Takođe, studije asocijacije celokupnog egzoma (eng. *Exome Wide Association Studies*, EWAS) [91], nisu imale značaja za *PHACTR1* lokus, imajući u vidu da nijedna genska varijanta iz ovog regiona, koja je do sada bila asocirana sa KVB, nije u protein-kodirajućim regionima. Dalja istraživanja, pored validacije pronađenih asocijacija u različitim populacijama, fokusirala su se na potencijalnu regulatornu funkciju ovog regiona i na analizu transkriptoma.

### 1.3.2. Funkcionalne studije

*PHACTR1* lokus asociran je sa KB [87], u čijoj osnovi je ateroskleroza, kompleksna, multifaktorijana bolest. Protein *PHACTR1* po svojoj strukturi je u mogućnosti da interaguje sa dva izuzetno značajna ćelijska molekula PP1 i aktinom [71]. Imajući u vidu ove činjenice, nekoliko istraživačkih grupa pristupilo je proučavanju funkcije *PHACTR1* sa različitih strana. U većini studija kombinovana su istraživanja na animalnim modelima i u kulturama ćelija, ali i provera uticaja njegovih genskih varijanti na humanim uzorcima.



**Slika U6.** *PHACTR1* u endotelskim ćelijama učestvuje u procesima ključnim za nastanak i razvoj ateroskleroze. Slika je modifikovana iz Jarray i sar, *Biochimie*, 2015. [92], i Zhang i sar, *Atherosclerosis*, 2018. [93].

Istražujući proces angiogeneze, Jarray i sar. otkrili su da je *PHACTR1* jedan od šest gena specifično regulisanih u vaskularnim EĆ od strane vaskularnog endotelnog faktora rasta (eng. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) [94]. Pokazano je da VEGF, potentni pro-angiogeni faktor, dovodi do povećane transkripcije gena *PHACTR1* u EĆ. Koristeći utišavajući konstrukt RNK *PHACTR1*, pri čemu je u potpunosti smanjen nivo iRNK i proteina *PHACTR1* u EĆ, pokazano je da odsustvo *PHACTR1* dovodi do redukcije formiranja vaskularnih tubula, što je u osnovni procesa angiogeneze. Paralelno, primetili su da je odsustvo *PHACTR1* iz EĆ indukovalo aktivaciju različitih aktivatora apoptoze, te je uticaj na apoptozu predložen kao jedan od mehanizama kojim *PHACTR1* reguliše formiranje vaskularnih tubula. Ista grupa istraživača ukazala je na smanjenu aktivnost PP1 u odsustvu *PHACTR1*, kao i na poremećenu organizaciju aktinskih filamenata [95].

Zaključili su i da su različiti pro-aterogeni faktori značajno povišeni u EĆ u kojima je utišana transkripcija gena *PHACTR1* [92] (**Slika U6**).

Studija na pacovima, kod kojih je indukovano IM, pokazala je da dolazi do smanjenja nivoa iRNK i proteina *PHACTR1* nakon IM [96], pri čemu se nivo vraća na prethodno stanje nakon dve nedelje. Pretpostavka je da mehaničko izduživanje miocita, do kog dolazi prilikom IM, dovodi do smanjenja nivoa iRNK *PHACTR1*, verovatno preko MAP kinaznog puta. Kelloniemi i sar. nastavili su istraživanje na pacovima kojima su adenovirusnim konstruktima povećali nivo iRNK i proteina *PHACTR1*. Pokazali su da *PHACTR1* utiče na odnos aktinskih izoformi prisutnih u srčanom tkivu, ali da ne utiče na ehokardiografski praćene parametre strukture i funkcije leve komore srca, i kod zdravih i kod pacova kod kojih je indukovano IM. Takođe su pokazali da povišen nivo iRNK *PHACTR1* dovodi do značajnog povećanja vezivanja transkripcionog faktora SRF za DNK. SRF reguliše gensku ekspresiju proteina koji omogućavaju kontraktilnu funkciju srca, kao što su skeletni  $\alpha$ -aktin, srčani  $\alpha$ -aktin i teški lanac  $\beta$ -miozina. Deo studije obuhvatio je humane uzorke, te je detektovan povišen nivo proteina *PHACTR1*, ali ne i iRNK, na četiri uzorka srčanog tkiva obolelih od kardiomiopatije u poređenju sa dva uzorka zdravog srčanog tkiva. Uticaj varijante rs12526453 gena *PHACTR1* na ehokardiografske parametre strukture i funkcije srca nije bio statistički značajan.

Aherrahrou i sar. su, imajući u vidu asocijaciju gena *PHACTR1* sa kalcifikacijom koronarnih arterija, odlučili da ispituju postojanje uzročno-posledične veze između kalcifikacije i nivoa iRNK i proteina *PHACTR1* u kulturi GMĆ, poteklih od mišijih vaskularnih EĆ, a takođe i u kulturi GMĆ humane aorte [76]. Pokazalo se da pod uticajem kalcifikacije raste nivo transkripcije *PHACTR1*, i u mišijim i u humanim GMĆ. Dodatno je pokazano, u mišijim GMĆ, da stepen kalcifikacije prati nivo transkripcije *PHACTR1*, tj. pri stabilno niskom nivou transkripcije *PHACTR1* nizak je i stepen kalcifikacije, a viši je pri stabilno visokom nivou transkripcije *PHACTR1*. Veza kalcifikacije, kao faktora rizika za progresiju ateroskleroze, i *PHACTR1* ukazuje na potencijalni mehanizam delovanja *PHACTR1* u KB.

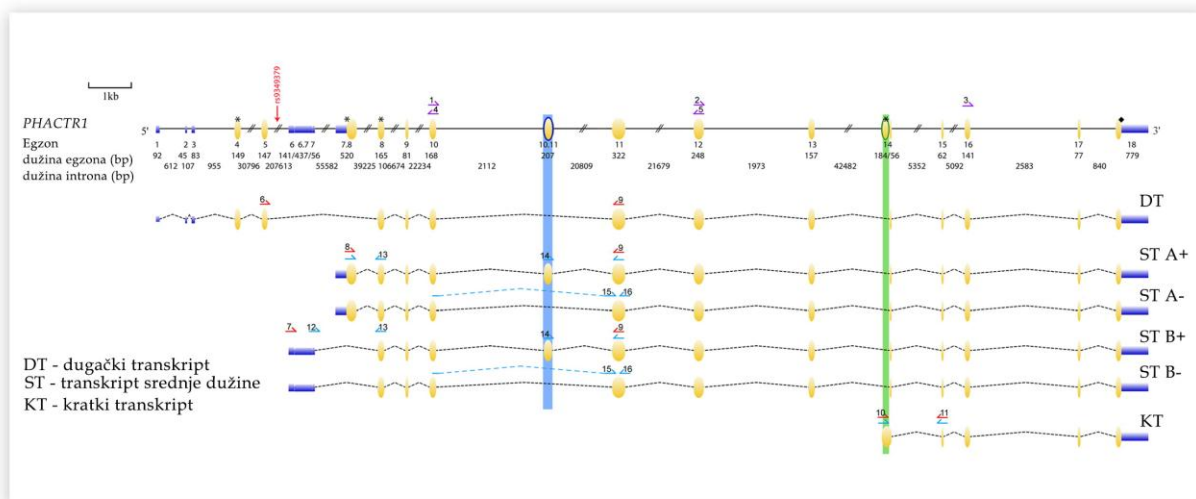
Zhang i sar. ispitivali su uticaj *PHACTR1* na oksidativni stres u kulturi endotelnih ćelija humane koronarne arterije [93]. Pod uticajem oksidovanih lipida nivo iRNK *PHACTR1*, kao i proteina *PHACTR1*, bio je značajno povišen. Primenom utišavajućeg konstrukta RNK *PHACTR1*, pokazali su da odsustvo *PHACTR1* ublažava oksidativni stres i regrutovanje monocita. Kroz interakciju sa još jednim RPEL proteinom, MRTF-A, *PHACTR1* je učestvovao u aktivaciji NF- $\kappa$ B signalnog puta i indukciji inflamcije, izazvane uticajem oksidovanih LDL (**Slika U6**).

Najnovije funkcionalne studije u fokusu su imale uticaj gena *PHACTR1* na makrofage [97, 98]. Na modelu miševa sa odsustvom *PHACTR1* (eng. *knockout mice*), Li i sar., su zaključili da odsustvo *PHACTR1* dovodi do progresije ateroskleroze [97], povećanja nivoa transkripcije gena uključenih u procese inflamcije i ateroskleroze, kao i do transformacije makrofaga u penaste ćelije [97]. Takođe je u studiji pokazano da je nivo iRNK *PHACTR1* bio povišen u cirkulišućim monocitima kod ispitanika sa IM u odnosu na ispitanike kontrole grupe [97]. Kasikara i sar., su u istraživanje uključili i uticaj varijante rs9349379 na transkripciju gena *PHACTR1* [98]. Pokazali su da je snižen nivo transkripcije gena *PHACTR1* u makrofagima sa ređim alelom G doveo do defekta u procesu eferocitoze, putem loše organizacije aktinskih filamenata uključenih u fagocitozu ćelija zahvaćenih apoptozom [98].

Funkcionalne studije ukazale su na učešće *PHACTR1* u različitim procesima u organizmu, kako fiziološkim, tako i patološkim. Endotelna disfunkcija, inflamcija,

kalcifikacija, neovaskularizacija, organizacija citoskeleta i eferocitoza, samo su neki od procesa koji ukazuju na sistemsku povezanost gena i proteina PHACTR1 sa procesom ateroskleroze.

## 1.4. Gen *PHACTR1*



**Slika U7.** Transkripti gena *PHACTR1*. Slika je modifikovana iz Codina-Fauteux i sar, *BMC Med Genet*, 2018. [80].

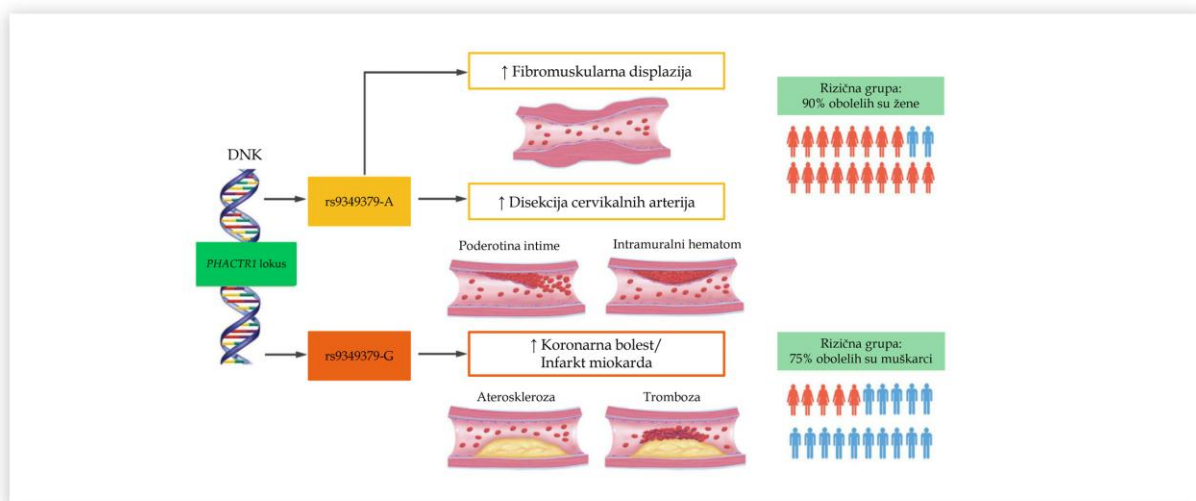
Gen *PHACTR1* lokalizovan je na kratkom kraku hromozoma šest, na poziciji 6p24.1. i vrlo je dugačak, sadrži preko petsto sedamdeset hiljada baznih parova. Pokazano je da se sa gena *PHACTR1* može prepisati šest protein-kodirajućih transkripata [80] (**Slika U7**). Dugački transkript, čija transkripcija počinje u egzonu 4, ima 1743 bp i kodira protein od 580 ak, može se detektovati isključivo u mozgu. Postoje četiri transkripta srednje dužine: A+, A-, B+ i B-. Transkripcija A transkripata srednje dužine polazi sa egzona koji se ne prepisuje kod ostalih transkripata, dok B transkripti srednje dužine polaze sa egzona 8. Transkripti A+ i B+ specifični su jer poseduju egzon koji nije prepisan kod ostalih transkripata. Početak transkripcije kratkog transkripta je u egzonu 14, koji ostali transkripti ne poseduju. Kratki transkript, od 435 bp koji kodira protein od 144 ak, detektovan je samo u imunskim ćelijama, monocitima. Izrazito konzervirani C-terminalni region, koji uključuje domen za interakciju sa PP1c, prisutan je kod svih transkripata. Jedine dve studije koje su do danas detaljno analizirale *PHACTR1* transkripte [79, 80], podudaraju se u tvrdnjama da se dugački transkript može detektovati samo u mozgu, a kratki u imunskim ćelijama, ipak protein generisan sa kratkog transkripta do sada nije detektovan. Transkripti srednje dužine daleko su varijabilniji, mogu se detektovati u makrofagima, EĆ i GMC i različitim tkivima.



### 1.4.1. Varijante gena *PHACTR1*

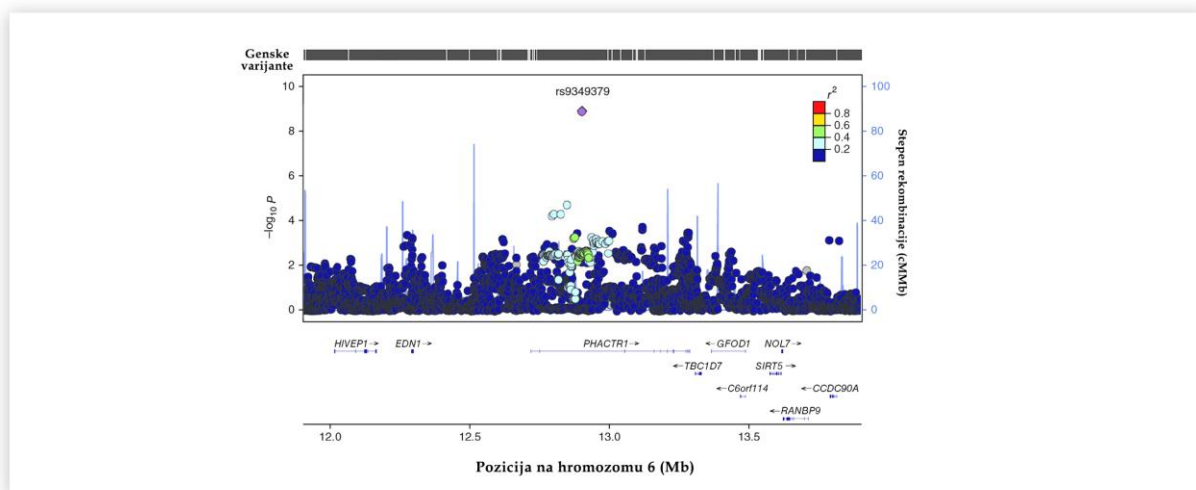
Katalog GWAS [99] je, u februaru 2021. godine, pokazao da su 63 varijante u genu *PHACTR1* asocirane sa 40 humanih osobina ili stanja (bolesti) u skoro 80 GWA studija. Najveći broj asocijacija bio je sa stanjima vezanim za kardiovaskularni sistem, a posebno za koronarnu bolest, a samo nekolicina varijanti povezana je sa više različitih stanja ili asocirana sa istim stanjem u više studija. Varijanta rs9349379 istakla se kao vodeća genska varijanta u *PHACTR1* lokusu i asocirana je najviše sa koronarnom bolešću [83, 87], pa zatim sa kalcifikacijom koronarnih arterija [84], sistolnim krvnim pritiskom [100], disekcijom cervikalnih arterija [101] i migrenom [102]. Varijanta rs12526453 prva je varijanta gena *PHACTR1* koja je asocirana sa kardiovaskularnim fenotipom, sa ranim IM [81], zatim je povezana sa koronarnom bolešću [82], kalcifikacijom koronarnih arterija [84] i cerebrovaskularnim insultom [86]. Genska varijanta rs2026458 asocirana je sa kalcifikacijom koronarnih arterija [84, 85], kao značajnim faktorom rizika za razvoj i progresiju ateroskleroze.

Gen *PHACTR1* pokazao je plejotropnost, imajući u vidu da je varijanta rs9349379 gena *PHACTR1* asocirana sa više fenotipova. Zanimljivo je to da pokazuje različit pravac asocijacije sa dva tipa kardiovaskularnih fenotipova (**Slika U8**). Njen ređi alel asociran je sa rizikom za razvoj KV fenotipova u čijoj osnovi je ateroskleroza, tj. koronarna bolest, IM i KKA, a sa druge strane ima protektivan efekat na fenotipove u čijoj etiologiji nije ateroskleroza, kao što su disekcija cervikalnih arterija [101], fibromuskularna displazija (FMD) [103] i migrena [104]. Plejotropni efekat genske varijante rs9349379 najbolje je oslikan u meta-analizi u kojoj su upoređene GWA studije CARDIoGRAM i C4D konzorcijuma sa GWA studijom o migreni [105]. *PHACTR1* lokus i genska varijanta rs9349379 pokazali su najjaču asocijaciju sa oba fenotipa i tako ukazali da KB i migrena imaju zajedničke genske faktore rizika, ali sa suprotnim pravcem delovanja. U prilog uticaju *PHACTR1* na oba stanja govori i njegova rasprostranjenost u humanim organima koja je najveća u mozgu, srcu i arterijama. Zatim i uticaj na sinaptičku aktivnost i morfologiju dendritskih ćelija u mozgu [71], kao i učešće u procesima angiogeneze i endotelne disfunkcije u vaskularnom sistemu [95].



**Slika U8.** Plejotropni efekat varijante rs9349379 gena *PHACTR1*. Slika je modifikovana iz Adlam i sar, *J Am Coll Cardiol*, 2019. [106].

Kako se varijanta rs9349379, u više studija pokazala kao značajna varijanta u *PHACTR1* lokusu, nekoliko istraživačkih grupa posvetilo se ispitivanju njenog uticaja na transkripciju gena *PHACTR1*. Na uzorku od 25 koronarnih arterija Beaudoin i sar. [78] dokazali su da varijanta rs9349379 značajno utiče na transkripciju gena *PHACTR1* (eng. *expression quantitative trait locus*, eQTL). Takođe su ispitali da li je ova varijanta cis-eQTL za neki od protein-kodirajućih gena koji se nalaze na udaljenosti od 1 Mb oko varijante. Ispostavilo se da, u koronarnim arterijama, varijanta rs9349379 ne utiče na nivo transkripcije nijednog od okolnih gena: *EDN1*, *GFOD1*, *HIVEP1*, *MCUR1*, *NOL7*, *RanBP9*, *SIRT5* i *TBC1D7*. Uticaj varijante rs9349379 na transkripciju gena *PHACTR1* ispitan je na 44 tkiva iz baze podataka GTEx (eng. *Genotype-Tissue Expression Project* [107]) i pokazano je da rs9349379 deluje kao tkivno-specifični eQTL za gen *PHACTR1* u aorti, tibijalnoj i koronarnoj arteriji [108]. Karotidna arterija, iako podložna razvoju i atreoskleroze i disekcije, nije bila predmet dosadašnjih istraživanja. Osim sa *PHACTR1*, varijanta je pokazala asocijaciju, još samo, sa genom *TBC1D7* i nekodirajućom RNK *RP1-257A7.5*, u ispitivanim tkivima. Opsežna analiza lokusa 6p24 koju su sprovedi Gupta i sar., takođe je izdvojila gensku varijantu rs9349379 kao vodeću u ovom lokusu [89]. Ipak njihovi rezultati bili su kontradiktorni u odnosu na dotadašnje, budući da su pokazivali da je varijanta rs9349379 eQTL za gen *EDN1* i da nema nikakav uticaj na transkripciju gena *PHACTR1* i okolnih gena. Studija je urađena na indukovanim pluripotentnim matičnim ćelijama (iPMĆ) diferenciranim u vaskularne ćelije endotela (EĆ) i glatke mišićne ćelije (GMĆ), pri čemu je eQTL efekat bio pedest puta izraženiji u EĆ. Na osnovu ovog otkrića oni su predložili čitav mehanizam regulatornog efekta rs9349379 na gen *EDN1*, a zatim i mehanizam delovanja proteina EDN1 na vaskularne bolesti sa kojima je lokus 6p24 asociran. Nakon što su Wang i Musunuru replicirali prethodnu studiju, i nisu dobili iste rezultate [109], postalo je jasno da je potrebno još istraživanja da bi se gen *EDN1* proglasio uzročnikom asocijacije lokusa 6p24 sa vaskularnim bolestima.



**Slika U9.** Pozicija varijante rs9349379 gena *PHACTR1* u odnosu na okolne varijante i gene na hromozomu 6. Slika je modifikovana iz Debette i sar, *Nat Genet*, 2015. [101].

Nijedna varijanta iz protein-kodirajućih regiona gena *PHACTR1* nije povezana sa KVB [78]. Međutim, intronske genske varijante rs9349379, rs2026458 i rs2876300 su do sada asocirane sa nekim od fenotipova vaskularne patologije [84, 87]. Sve tri ispitivane varijante utiču na nivo iRNK *PHACTR1* u vaskularnom tkivu, odnosno u koronarnoj i



tibijalnoj arteriji. Prema bazi podataka GTEx ređi alel genske varijante rs2876300 ima suprotan efekat na nivo transkripcije gena *PHACTR1* u odnosu na ređe alele genskih varijanti rs9349379 i rs2026458 [107]. Varijante gena *PHACTR1*, rs9349379, rs2026458 i rs2876300, imaju  $r^2 < 0,5$  [110], te se ne nalaze u jakoj neravnoteži vezanosti (eng. *linkage disequilibrium*, LD) i omogućena je njihova haplotipska analiza (**Slika U9**). Haplotipska analiza daje veću snagu studiji i pruža direktni uvid u odnos ispitivanih varijanti na hromozomu i omogućava uspostavljanje asocijacije kompleksne bolesti sa multi-alelnim genskim markerom.

## 2. HIPOTEZA I CILJEVI

Osnovna tema ove doktorske disertacije je ispitivanje povezanosti gena *PHACTR1* sa nastankom i komplikacijama ateroskleroze kod čoveka. Obuhvaćene su ukupno tri intronske varijante, rs9349379, rs2026458 i rs2876300, kako bi se istražila njihova povezanost sa aterosklerozom karotidnih (AKA) i koronarnih (AKOA) arterija u okviru ciljnih grupa ispitanika iz Srbije, kao i njihov uticaj na nivo transkripcije gena *PHACTR1* u tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka i mononuklearnim ćelijama periferne krvi (MČPK) ispitanika sa AKOA.

Hipoteza da su varijante gena *PHACTR1* kao i nivo iRNK *PHACTR1* uključeni u nastanak ateroskleroze u karotidnim i koronarnim arterijama i da doprinose razvoju uznapredovalog oblika bolesti, te da su potencijalni marker rizika za ateroskrozu, postavljena je na osnovu povezanosti gena *PHACTR1* sa nekoliko kardiovaskularnih fenotipova u GWA studijama, kao i uključenosti proteina *PHACTR1* u procese koji su povezani sa homeostazom kardiovaskularnog sistema.

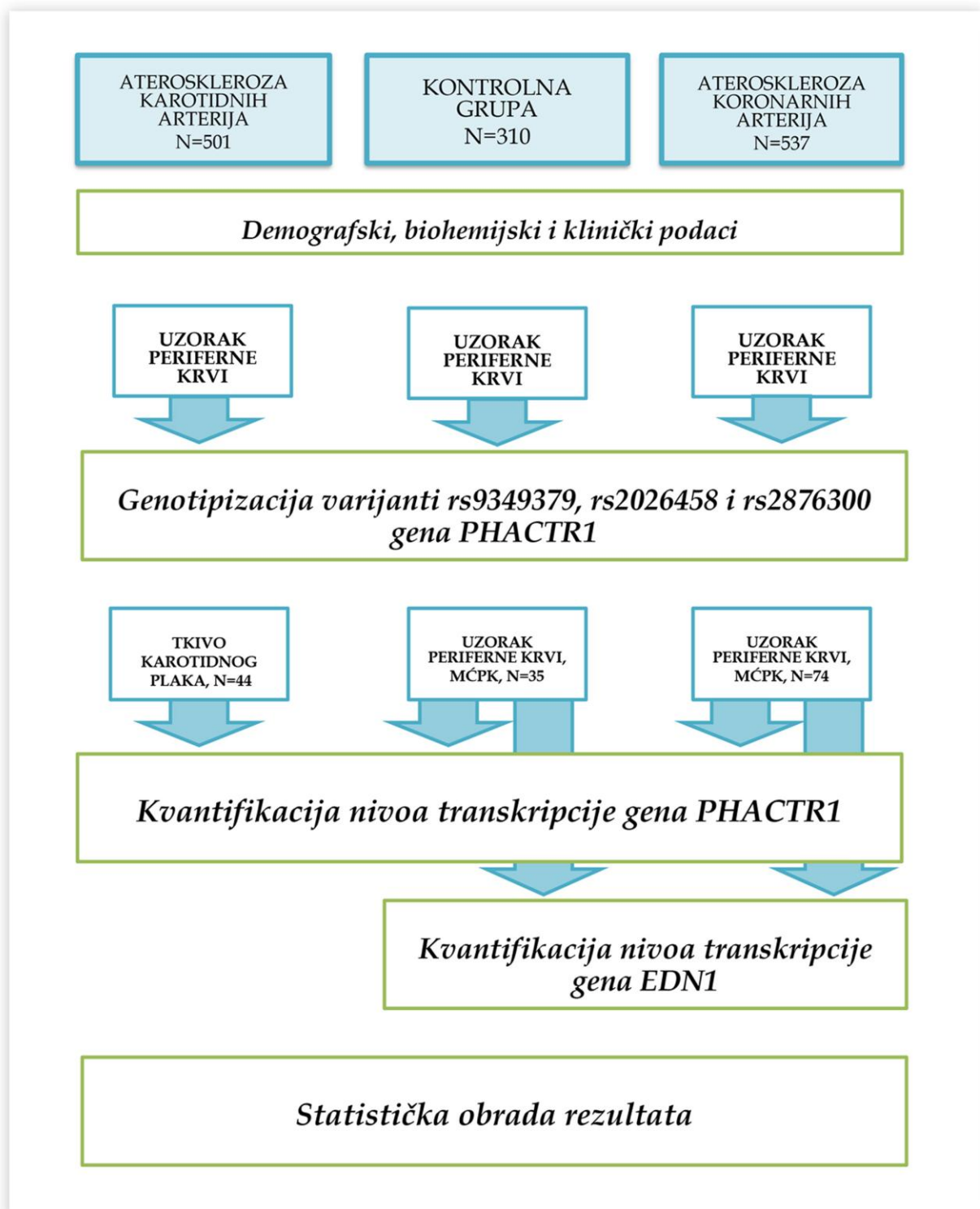
Hipoteza je proverena kroz dva pristupa:

- ~ Ispitivanjem asocijacije varijanti rs9349379, rs2026458 i rs2876300 gena *PHACTR1* pojedinačno i u haplotipu sa AKA i AKOA, kao i parametrima težine bolesti i
- ~ Ispitivanjem uticaja genskih varijanti rs9349379, rs2026458 i rs2876300 pojedinačno i u haplotipu na nivo transkripcije gena *PHACTR1* u tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka i MČPK ispitanika sa AKOA šest meseci nakon prvog infarkta miokarda (IM)

Postavljeni su sledeći ciljevi:

1. Ispitivanje asocijacije varijanti gena *PHACTR1* sa prisustvom karotidnog plaka.
2. Analiza udruženosti genskih varijanti sa prethodnim simptomatskim događajima i različitim, ultrasonografski definisanim, tipovima aterosklerotskog plaka kod ispitanika sa AKA.
3. Ispitivanje udruženosti izabranih genskih varijanti sa nivoom transkripcije gena *PHACTR1* u tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka kod ispitanika sa AKA.
4. Analiza udruženosti genskih varijanti sa prvim IM i parametrima težine bolesti kod ispitanika sa AKOA.
5. Ispitivanje udruženosti genskih varijanti sa maladaptivnim remodelovanjem srca i ehokardiografskim parametrima strukture i funkcije srca kod ispitanika sa AKOA šest meseci nakon prvog IM.
6. Analiza udruženosti izabranih genskih varijanti sa nivoom transkripcije gena *PHACTR1* i gena *EDN1* u MČPK kod zdravih ispitanika i ispitanika šest meseci nakon IM.

### 3. MATERIJAL I METODE



Slika M1. Shematski prikaz toka eksperimentalnog dela doktorske disertacije.

### 3.1. Materijal

Istraživanje uticaja varijanti gena *PHACTR1* na njegovu transkripciju i udruženosti sa nastankom i progresijom ateroskleroze kod čoveka obuhvatilo je ukupno 1348 ispitanika, regrutovanih u okviru kontrolne i dve ciljne grupe ispitanika. Ispitanici su, od strane lekara specijalista, a prema kliničkim i biohemijskim parametrima definisani kao: ispitanici sa aterosklerozom karotidnih arterija (AKA) (n=501) i ispitanici sa aterosklerozom koronarnih arterija (AKOA) i prvim infarktom miokarda (IM) (n=537). Postavljanje dijagnoze, definisanje fenotipova i praćenje toka bolesti obavljeno je, za ispitanike sa AKA, tokom 2004. i 2005. godine na Klinici za vaskularnu hirurgiju Instituta za kardiovaskularne bolesti „Dedinje“, Beograd, Srbija i tokom 2008. i 2009. godine na Klinici za vaskularnu i endovaskularnu hirurgiju Kliničkog centra Srbije, Beograd, Srbija. Ispitanici sa AKOA primljeni su i praćeni, u periodu od 2011. do 2013. godine na Kliničkom odeljenju za kardiovaskularne bolesti Kliničko-bolničkog centra „Zvezdara“, Beograd, Srbija, i tokom 2013. godine na Klinici za kardiologiju Kliničkog centra Srbije, Beograd, Srbija. Deo ispitanika (n=157), primljenih u KBC „Zvezdara“, praćen je šest meseci nakon prvog IM, radi ispitivanja procesa remodelovanja leve komore srca. Svi ispitanici potpisali su informisani pristanak za učešće u studiji.

Na uzorcima periferne krvi, svih ispitanika, urađena je analiza genskih varijanti iz ekstrahovane jedarne DNK. Relativna kvantifikacija transkripcije gena *PHACTR1* urađena je na 44 uzorka karotidnog aterosklerotskog plaka dobijenih od ispitanika sa AKA prilikom operacije endarterektomije. Takođe je, nivo transkripcije gena, ispitivan na 74 uzorka periferne krvi ispitanika sa AKOA šest meseci nakon prvog IM, gde je ukupna RNK izolovana iz mononuklearnih ćelija periferne krvi (MČPK).

Razlog za isključivanje ispitanika iz studije je bilo prisustvo:

- ~ kod ispitanika sa AKA: prethodne endarterektomije, karotidne aneurizme i simptomatskog događaja u prethodnih šest meseci (CVI, TIA, RIND, VBI);
- ~ kod ispitanika sa AKOA: prethodnog IM ili bilo koje druge bolesti srca;
- ~ kod svih ispitanika: hroničnog inflamatornog i autoimunskog oboljenja, bolesti bubrega i maligniteta.

Kontrolnu grupu (n=310), uključenu u studiju, činili su zdravi ispitanici nasumično izabrani prilikom kontrolnog zdravstvenog pregleda na teritoriji Beograda i Niša. Svaki ispitanik dobrovoljno je popunio upitnik o ličnim podacima i anamnezi i potpisao informisani pristanak za učešće u studiji. Ispitanicima su urađene standardne biohemijske analize krvi i uzeti uzorci periferne krvi za izolaciju DNK (n=310) i RNK (n=35).

Svi ispitanici su pripadnici kavkazoidne grupe ljudi sa teritorije Republike Srbije.

Etički komiteti medicinskih centara u kojima je vršeno sakupljanje uzoraka i kliničko-biohemijskih podataka odobrili su izvođenje studije. Studiju „Povezanost gena *PHACTR1* sa nastankom i komplikacijama ateroskleroze kod čoveka“ odobrio je i etički komitet Instituta za nuklearne nauke „Vinča“- Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija, u okviru kojeg je eksperimentalni deo studije urađen u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Klinička karakterizacija uzoraka

#### 3.2.1.1. Dopler ultrasonografija karotidnih arterija

Dijagnostifikovanje ateroskleroze karotidnih arterija i kod simptomatskih (CVI, TIA, RIND, VBI) i kod asimptomatskih (faktori rizika, koronarna i/ili periferna ateroskleroza) ispitanika urađeno je metodom Dopler ultrasonografije na aparatu Toshiba, PowerVision 6000, 7,5 MHz (*Riverside, CA*).

Pregledom leve i desne strane vrata obuhvaćeni su: distalni deo zajedničke karotidne arterije u dužini od 2 cm, karotidni bulbus i proksimalni deo unutrašnje karotidne arterije u dužini od 2 cm. Procena stepena stenozе vršena je prema kriterijumima ECST (eng. *European Carotid Surgery Trialists' Collaborative Group*) [111].

Aterosklerotski plak je definisan kao struktura koja zadire u lumen krvnog suda najmanje 0,5 mm ili 50% u odnosu na okolni IMT ili je to zadebljanje >1,5 mm mereno od granice medija - adventicija do granice intima - lumen [112]. Pomoću ultrasonografske analize, a na osnovu razlike u stepenu ehogenosti, definisana su dva podtipa plaka [113], hiperehogeni i hipoehogeni tip. Hiperehogeni tip plaka je struktura ispunjena fibroznim tkivom sa vrlo malo lipida, dok hipoehogeni tip plaka, predstavlja uznapredovalu aterosklerotsku leziju u kojoj je akumulirana velika količina lipida koju prekriva tanka fibrozna kapa [16].

Na osnovu utvrđenog stepena stenozе i karakterizacije karotidnog aterosklerotskog plaka procenjen je rizik za dalji razvoj cerebrovaskularne bolesti i potreba za karotidnom endarterektomijom.

#### 3.2.1.2. Elektrokardiografija

Elektrokardiografskim pregledom utvrđena je podvrsta IM kod svih ispitanika sa AKOA: STEMI (eng. *ST-Elevation Myocardial Infarction*) i NSTEMI (eng. *Non-STEMI*). STEMI je IM sa elevacijom ST segmenta elektrokardiograma, što znači da je koronarna arterija potpuno blokirana i da veći deo srčanog mišića nije snabdeven krvlju. STEMI je teži oblik MI od NSTEMI kod kog nema elevacije ST segmenta elektrokardiograma, a koronarna arterija je delimično blokirana.

#### 3.2.1.3. Dopler ehokardiografija

Sto pedeset sedam ispitanika sa AKOA i prvim IM, kao posledicom ishemijske koronarne bolesti srca, iz KBC „Zvezdara“, praćeni su prospektivno šest meseci nakon

akutnog događaja, a 2D Dopler ehokardiografija im je urađena 3 do 5 dana po prijemu i na kontrolnom pregledu šest meseci nakon IM. Ehokardiografski podaci dobijeni su korišćenjem sistema Toshiba XG/Artida sa 2.5/3.0 MHz sondom (*Toshiba Medical Systems, Otawara, Japan*), a u skladu sa preporukama evropskog i američkog društva za ehokardiografiju (eng. *European Association of Cardiovascular Imaging* i *American Society of Echocardiography*) [114].

Korišćenjem snimaka u M modu procenjeni su end-dijastolni i end-sistolni dijametar leve komore (LK), end-dijastolni i end-sistolni volumen LK, kao i procenat ejskione frakcije LK. Deformitet miokarda procenjen je tokom sistole, tehnikom praćenja tačkica (eng. *speckle tracking*) [115], pomoću Toshiba 2D Tissue Tracking sistema. Parametri deformacije tkiva miokarda su: ukupni radijalni deformitet miokarda, ukupni longitudinalni deformitet miokarda i ukupni bazalni i apikalni cirkumferentni deformiteti miokarda.

Na kontrolnom ehokardiografskom pregledu 6 meseci nakon IM ustanovljeno je prisustvo ili odsustvo maladaptivnog remodelovanja leve komore srca. Maladaptivno remodelovanje je definisano kao progresivna dilatacija LK sa porastom za preko 20% indeksa dijastalnog volumena LK zajedno sa očuvanom ili sniženom ukupnom ejskionom frakcijom LK, šest meseci nakon prvog ehokardiografskog pregleda, odnosno infarkta miokarda [116].

Razvoj srčane insuficijencije 6 meseci nakon prvog IM dijagnostifikovan je u skladu sa uputstvom za dijagnostiku i lečenje akutne i hronične srčane insuficijencije Evropskog društva za kardiologiju (eng. *European Society of Cardiology*) [117]. Stepen srčane insuficijencije određen je prema NYHA (eng. *New York Heart Association*) i Killip klasifikaciji:

NYHA I	-	Nema simptoma kod svakodnevnog opterećenja
NYHA II	-	Bez simptoma u miru i u toku srednjeg opterećenja
NYHA III	-	Bez simptoma samo u miru
NYHA IV	-	Simptomi se javljaju i u miru
<i>Killip I</i>	-	Bez simptoma srčane slabosti
<i>Killip II</i>	-	Simptomi srčane slabosti
<i>Killip III</i>	-	Plućni edem
<i>Killip IV</i>	-	Kardiogeni šok

#### **3.2.1.4. Perkutana koronarna intervencija**

Svi ispitanici sa prvim IM bili su upućeni na perkutanu koronarnu intervenciju sa ili bez ugradnje stenta (eng. *percutaneous coronary intervention, PCI*). Tokom intervencije

procenjena je se težina ishemijske bolesti srca i stepen stenozе koronarnih arterija. Svi ispitanici su imali stenozu veću od 50% u bar jednoj koronarnoj arteriji.

Višesudovna bolest (VSB) definisana je kao stepen stenozе veći od 50% u dve ili više koronarnih arterija.

SYNTAX score (SS) kao parametar težine i kompleksnosti koronarne bolesti [118] procenjen je na osnovu 12 karakteristika među kojima su broj i dužina lezija, stepen okluzije, bifurkacije, trifurkacije, stepen kalcifikacije i tromboza. Teži oblik koronarne bolesti oslikavaju vrednosti iznad granične vrednosti 22 [119].

### 3.2.2. Biohemijske analize i anamneza

Na prijemu, svim ispitanicima urađena je biohemijska analiza krvi prema standardnim laboratorijskim protokolima. Takođe, svima su uzeti demografski podaci, istorija bolesti i ispitano je prisustvo faktora rizika za nastanak i razvoj ateroskleroze.

Kriterijum za dijagnozu diabetes melitus tipa II (DMTII) bio je nivo glukoze  $\geq 7$  mmol/l, kao i uzimanje insulina ili oralnih hipoglikemijskih lekova. Arterijski krvni pritisak  $\geq 140/90$  mmHg ili terapija antihipertenzivnim lekovima uzeti su kao kriterijum za dijagnozu hipertenzije.

### 3.2.3. Genetičke analize

#### 3.2.3.1. Ekstrakcija DNK

Ispitanicima je uzet uzorak periferne krvi iz kubitalne vene sa antikoagulansom EDTA i čuvan na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Jedarna DNK ekstrahovana je jednom od navedenih metoda:

- ~ Ekstrakcija DNK fenol-hloroformskom metodom, koja daje visok prinos i kvalitet ekstrahovane DNK. Ekstrakcija se vrši iz 3 ml periferne krvi [120].
- ~ Ekstrakcija DNK primenom kita DNA BloodPrep™ (*Applied Biosystems, SAD*) na aparatu ABI PRISM™ 6100 Nucleic Acid PrepStation (*Applied Biosystems, SAD*), koja je brža metoda. Ekstrakcija se vrši iz 150  $\mu\text{l}$  periferne krvi, a prema uputstvu proizvođača.

#### 3.2.3.2. Merenje koncentracije i procena kvaliteta ekstrahovane DNK

Spektrofotometar BioSpec-nano (*Shimadzu Biotech, Kyoto, Japan*) korišćen je za merenje koncentracije ekstrahovane DNK u ng/ $\mu\text{l}$ . Procena kvaliteta ekstrahovane DNK vršena je, na istom uređaju, merenjem apsorbanacija ekstrahovane DNK na 260 nm, 230 nm

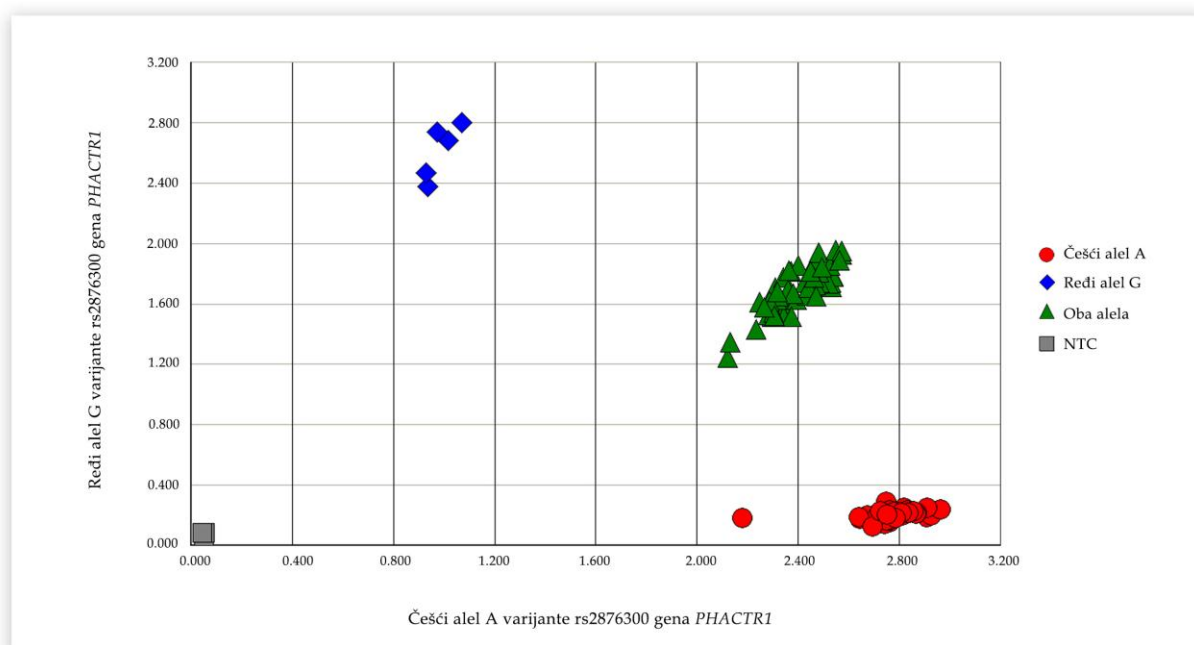
i 280 nm talasne dužine. DNK je zadovoljavajuće čistoće za dalje genetičke analize kada su odnosi  $A_{260}/A_{230}$  i  $A_{260}/A_{280}$  u referentnom opsegu od 1,8 do 2,2.

### 3.2.3.3. Genotipizacija varijanti rs9349379 A/G, rs2026458 C/T i rs2876300 A/G gena *PHACTR1*

Genotipizacija je vršena korišćenjem metode umnožavanja fragmenata DNK lančanom reakcijom DNK polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) i metodom alelske diskriminacije na uređaju Real-time PCR sistem: Applied Biosystems 7500 (*Applied Biosystems*, SAD), pomoću TaqMan® tehnologije. TaqMan® eseji za alelsku diskriminaciju sastoje se od para amplimera i para alel-specifičnih proba. Amplimeri okružuju segment DNK sa polimorfnim mestom. Jedna proba je komplementarna češćem alelu, a druga ređem i obojene su različitim fluorescentnim bojama na 5' kraju. Hibridizacija probe sa odgovarajućom sekvencom DNK dovodi do osobađanja boje i emitovanja signala specifičnog intenziteta za tu boju, što omogućava detekciju genske varijante.

Korišćeni specifični TaqMan® eseji za alelsku diskriminaciju ispitivanih varijanti su:

- ~ C\_\_1756707\_10 za rs9349379 A/G
- ~ C\_\_1756602\_10 za rs2026458 C/T
- ~ C\_\_1756702\_10 za rs2876300 A/G



**Slika M2.** Genotipizacija metodom alelske diskriminacije na uređaju Real-time PCR na primeru varijante rs2876300 A/G gena *PHACTR1*.



#### 3.2.3.4. Ekstrakcija ukupne RNK

Ukupna RNK ekstrahovana je iz tkiva karotidnog aterosklerotskog plaka i mononuklearnih ćelija periferne krvi (MČPK).

- ~ Tkivo karotidnog aterosklerotskog plaka se, pre ekstrakcije RNK, usitnjava homogenizacijom u tečnom azotu, čime se i inhibira aktivnost ribonukleaza.
- ~ Mononuklearne ćelije periferne krvi (MČPK), odnosno limfociti i monociti, izdvojene su metodom separacije prema gradijentu gustine. Uzorak od 3 ml periferne krvi sa antikoagulansom EDTA centrifugiran je sa medijumom za separaciju limfocita (Lymphocyte Separation Medium, LSM 1077, PAA).

Iz pripremljenih uzoraka ekstrahovana je ukupna RNK pomoću reagensa TRI Reagent Solution®, prema protokolu proizvođača (*Ambion, Austin, SAD*). Ekstrahovana RNK čuvana je u zamrzivaču na  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.2.3.5. Merenje koncentracije i procena kvaliteta ekstrahovane RNK

Merenje koncentracije u  $\text{ng}/\mu\text{l}$ , kao i procena čistoće ekstrahovane RNK, prema izmerenim apsorbcijama na 260 nm, 230 nm i 280 nm talasne dužine, vršene su, kao i za DNK, na spektrofotometru BioSpec-nano (*Shimadzu Biotech, Kyoto, Japan*). Kvalitet i integritet ekstrahovane RNK provereni su elektroforezom na čipu, pomoću RNA 6000 Nano Kit-a (*Agilent, Palo Alto, SAD*) na uređaju 2100 Bioanalyzer (*Agilent, Palo Alto, SAD*). RNK je zadovoljavajućeg integriteta kada su RIN (eng. *RNA Integrity Number*) vrednosti iznad 7.

#### 3.2.3.6. Reverzna transkripcija informacione RNK (iRNK)

Informaciona RNK, odnosno frakcija ukupne RNK sa poliA repom, prepisana je u komplementarnu DNK (cDNK) metodom reverzne transkripcije. Uzorak se prvo tretira deoksiribonukleazom I (*Fermentas, Vilnius, Litvanija*), koja uklanja zaostale jednolančane i dvolančane molekule DNK. Za izdvajanje RNK sa poliA repom korišćen je oligo-dT amplimer. Reverzna transkripcija urađena je iz 1  $\mu\text{g}$  ukupne RNK pomoću RevertAid Premium reverzne transkriptaze (*Fermentas, Vilnius, Litvanija*). Ovim postupkom izdvaja se iRNK iz ukupne RNK i prema njoj se formiraju matrice DNK koje će poslužiti za kvantifikovanje transkripcije u reakciji Real-time PCR.

#### 3.2.3.7. Određivanje relativnog nivoa transkripcije gena *PHACTR1* i *EDN1*

Relativna kvantifikacija transkripcije gena *PHACTR1* urađena je na uzorcima karotidnog plaka i MČPK, dok je za gen *EDN1* urađena na uzorcima MČPK. Korišćena je TaqMan®

tehnologija na uređaju Real-time PCR sistem: Applied Biosystems 7500 (*Applied Biosystems, SAD*). TaqMan® eseji za relativnu kvantifikaciju transkripcije sadrže par amplimera i probu, specifičnu za ispitivanu sekvencu, obeleženu fluorescentnom bojom na 5' kraju. Količina sintetisanog amplikona srazmerna je povećanju fluorescencije nakon dostizanja ciklusa na kome se detektuje fluorescentni signal koji prelazi prag (eng. *Cycle threshold, Ct*). Nivo transkripcije ciljnog gena u ispitivanom uzorku normalizovali smo u odnosu na nivo transkripcije *PPIA* (eng. *Peptidylprolyl isomerase A*), koji je uzet kao endogena kontrola.

Korišćeni specifični TaqMan® eseji za kvantifikaciju transkripcije ispitivanih gena su:

- ~ Hs01116210\_m1 za gen *PHACTR1*
- ~ Hs00174961\_m1 za gen *EDN1*
- ~ Hs99999904\_m1 za gen *PPIA*

Korišćeni esej za gen *PHACTR1* može da identifikuje 26 transkripata među kojima pet od šest transkripata koji su prepoznati kao funkcionalni u literaturi [79, 80], to su dugački transkript i sva četiri transkripta srednje dužine, ali ne i kratki transkript (**Slika U7**).

### 3.2.4. Statističke metode

Analiza eksperimentalno dobijenih podataka vršena je pomoću nekoliko kompjuterskih programa:

- ~ Statistica 8 [121]

Distribucije frekvencija genotipova i alela između kontrola i pacijenata procenjene su pomoću  $\chi^2$ -testa, kao i odstupanje od Hardy-Weinberg (HW) ravnoteže.  $\chi^2$ -test, takođe, je korišćen za poređenje kategorijskih varijabli. Vrednosti kategorijskih varijabli predstavljene su brojevima ( $n$ ) i procentima (%), dok su vrednosti kontinualnih varijabli predstavljene srednjim vrednostima i standardnom devijacijom ( $sv \pm SD$ ). Kontinualne varijable čije vrednosti nisu u normalnoj raspodeli poređene su, između dve grupe, Mann-Whitney U testom. Za poređenje kontinualnih varijabli, između dve grupe, čije su vrednosti u normalnoj raspodeli korišćen je t-test. Metodom logističke regresije utvrđena je povezanost genotipova sa ispitivanim fenotipom i urađena korekcija na faktore rizika. Povezanost je predstavljena odnosom šansi (eng. *odds ratio, OR*) sa 95% intervalom poverenja (eng. *confidence interval, CI*). Vrednost verovatnoće  $p < 0.05$  smatrana je statistički značajnom, izuzev u slučaju višestrukih analiza ( $n$ ) kada je prema Bonferoni korekciji vrednost verovatnoće  $p < 0.05/n$  smatrana statistički značajnom.

- ~ Thesias 3.1 [122]

Haplotipska analiza urađena je pomoću kompjuterskog programa koji koristi model maksimalne verovatnoće uz primenu algoritma maksimalnog stohastičkog predviđanja (eng. *stochastic expectation maximization*) za procenu distribucije frekvencija haplotipova i efekta haplotipova na ispitivani fenotip. Frekvencije haplotipova u populaciji procenjuju se pomoću funkcije maksimalne verovatnoće, a Thesias koristi modifikaciju funkcije, stohastički algoritam [123]. Povezanost haplotipova sa kategorijskim varijablama predstavljena je kao OR [95% CI], a sa kontinualnim varijablama kao srednja vrednost sa

95% intervalom poverenja, sv [95% CI]. Uticaj haplotipa na fenotip izražen je po aditivnom modelu u poređenju sa referentnim haplotipom, odnosno najčešćim haplotipom u kontrolnoj grupi. Haplotip čija je frekvencija u populaciji bila  $<0,05$  nije bio uključen u statističku obradu rezultata.

~ LD link [110]

Neravnoteža vezanosti alela odabranih varijanti (eng. *linkage disequilibrium*, LD), odnosno parametri  $D'$  i  $r^2$ , određeni su preko internet platforme LD link, koja koristi frekvencije alela tri odabrane varijante u evropskim populacijama, a prema podacima iz projekta 1000 genoma [124]. LD je predstavljen parametrima  $D'$  i  $r^2$ , čije vrednosti se kreću od 0 do 1. Parametar  $D'$  određuje se na osnovu stepena rekombinacije između varijanti, dok parametar  $r^2$  pored stepena rekombinacije, uključuje i frekvenciju alela u populaciji. Kada je  $D' = 1$  varijante su u kompletnom LDu, između njih nema rekombinacije i nasleđuju se zajedno. Vrednost  $r^2 = 0,8$  uzima se kao granična za određivanje nezavisnosti dve genske varijante, pa su varijante u jakom LDu ukoliko je  $r^2 > 0,8$ . Kada je  $r^2 = 1$  varijante su u savršenom LDu, frekvencije češćeg i ređeg alela u populaciji su iste i tada su, od teorijski moguća četiri haplotipa, u populaciji prisutna samo dva [125].

~ GraphPad

Odnos nivoa transkripcije gena između dve grupe ispitanika grafički je predstavljen pomoću programa GraphPad ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Svaka tačka na grafiku predstavlja vrednost  $2^{-\Delta Ct}$  za ispitivani uzorak. Program koristi Mann-Whitney U test za poređenje kontinualnih varijabli čije vrednosti nisu u normalnoj raspodeli između dve grupe, što je slučaj sa vrednostima  $2^{-\Delta Ct}$ .

~ PGA: Power for Genetic Association analyses [126]

Statistička snaga studije, izražena u procentima, procenjena je na osnovu veličine uzorka i prevalence oboljenja u srpskoj populaciji, a za stepen značajnosti 0,05. Snaga studije procenjena je retrogradno na osnovu pokazane značajne asocijacije sa prisustvom karotidnog plaka i višesudovnom bolešću.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Ateroskleroza karotidnih arterija (AKA)

#### 4.1.1. Asocijacija varijanti rs9349379, rs2026458 i rs2876300 gena *PHACTR1* sa prisustvom karotidnog plaka kod pacijenata sa AKA

Osnovni demografski, biohemijski i klinički podaci ispitanika sa AKA i poređenje sa kontrolnom grupom predstavljeni su u **Tabeli R1**. Tabela je na engleskom jeziku objavljena u Kuveljić i sar., 2019. [127]. U odnosu na kontrolnu grupu ispitanici sa AKA su bili statistički značajno stariji i imali su viši nivo ukupnog holesterola, LDL holesterola i triglicerida, a niži nivo HDL holesterola. Takođe, više njih je imalo hipertenziju, veći BMI i više njih su bili pušači. Blizu 40% ispitanika sa AKA nije nikada imalo simptomatske događaje (CVI, TIA, RIND, VBI).

Varijante u genu *PHACTR1*: rs9349379, rs2026458 i rs2876300 bile su u HW ravnoteži u obe ispitivane grupe. Odabrane varijante su u umerenoj neravnoteži vezanosti prema LD link internet platformi, zbog čega je bilo moguće analizirati ih i pojedinačno i u haplotipu:

~  $r^2=0,47$ ,  $D'=0,76$  za varijante rs9349379 i rs2026458

~  $r^2=0,28$ ,  $D'=-1$  za varijante rs9349379 i rs2876300

~  $r^2=0,18$ ,  $D'=0,71$  za varijante rs2026458 i rs2876300

U **Tabeli R2** prikazana je broјčana i procentualna raspodela genotipova u okviru kontrolne grupe i grupe ispitanika sa AKA. Distribucija frekvencija genotipova ispitivanih varijanti se nije razlikovala između kontrolne grupe i grupe ispitanika sa AKA. Alel C varijante rs2026458 pokazao je statistički značajnu asocijaciju sa prisustvom karotidnog plaka, ali nakon Bonferroni korekcije zbog višestrukog testiranja ova asocijacija više nije bila značajna. Tabela je na engleskom jeziku objavljena kao dopunska tabela u Kuveljić i sar., 2019. [127].

Pojedinačno odabrane varijante gena *PHACTR1* nisu pokazale značajnu povezanost sa prisustvom karotidnog plaka kod pacijenata sa AKA, kao ni sa prethodnim simptomatskim događajima i ultrasonografski definisanim tipovima aterosklerotskog plaka, tako da će na dalje biti predstavljeni rezultati haplotipske analize.

**Tabela R1.** Vrednosti osnovnih parametara u kontrolnoj grupi i kod ispitanika sa aterosklerozom karotidnih arterija (AKA)

Parametar	Kontrolna grupa n=310	Ispitanici sa AKA n=501	<i>p</i>
Starost, godine	54,12 ± 14,17	66,04 ± 8,66	< 0,01*
Pol ž/m, %	44,6/55,4	41,5/58,5	ns
BMI, kg/m <sup>2</sup>	25,09 ± 3,68	26,87 ± 6,32	< 0,01*
TC, mmol/l	5,61 ± 1,30	5,84 ± 1,50	<0,05*
HDLC, mmol/l	1,48 ± 0,86	1,22 ± 0,34	< 0,01*
LDLC, mmol/l	3,31 ± 1,23	3,77 ± 1,12	< 0,01*
TG, mmol/l	1,58 ± 1,09	1,93 ± 1,96	< 0,01*
Hipertenzija, %	27,4	86,1	<0,01
Pušenje, %	55,0	70,0	<0,01
DMTII, %	0,0	21,9	N/A
Stepen stenozе >70%, %	0,0	73,3	N/A
Hipoehogeni tip plaka, %	0,0	29,4	N/A
Kalcifikovan plak, %	0,0	57,1	N/A
Simptomatski događaj ne/da, %	N/A	38,9/61,1	N/A
CVI, %	N/A	26,0	N/A
TIA, %	N/A	21,4	N/A
RIND, %	N/A	6,8	N/A
VBI, %	N/A	13,8	N/A

Vrednosti parametara su prikazane kao  $sv \pm SD$  za: starost, BMI - indeks telesne mase (eng. *Body Mass Index*), TC - ukupni holesterol (eng. *Total Cholesterol*), HDLC - HDL holesterol (eng. *High-Density Lipoprotein Cholesterol*), LDLC - LDL holesterol (eng. *Low-Density Lipoprotein Cholesterol*) i TG - trigliceridi; DMT II - diabetes melitus tip 2; CVI - cerebrovaskularni insult; TIA - prolazni ishemijski napad (eng. *transient ishaemic attack*); RIND - reverzibilni ishemijski neurološki deficit (eng. *reversible ischemic neurological deficit*); VBI - vertebrobasilarna isuficijencija (eng. *vertebrobasilar insufficiency*);  $\chi^2$  test je korišćen za poređenje kategorijskih parametara; \* - Mann-Whitney U test je korišćen za poređenje srednjih vrednosti parametara koje nisu u normalnoj raspodeli između kontrolne grupe i ispitanika sa AKA; ns - nije značajno (eng. *non significant*); N/A - nije primenljivo (eng. *not applicable*); vrednosti verovatnoće  $p < 0,05$  su smatrane statistički značajnim.

**Tabela R2.** Distribucija frekvencija alela i genotipova varijanti gena *PHACTR1*: rs9349379, rs2026458 i rs2876300 u kontrolnoj grupi i kod ispitanika sa AKA

<i>PHACTR1</i>	Kontrolna grupa, n (%)	Ispitanici sa AKA, n (%)	<i>p</i>
<b>rs9349379 A/G</b>	N=298	N=481	
Genotipovi			
AA	104 (34,90)	193 (40,12)	0,164
AG	138 (46,31)	219 (45,53)	
GG	56 (18,79)	69 (14,35)	
Aleli			
A	0,58	0,63	0,057
G	0,42	0,37	
<b>rs2026458 C/T</b>	N=308	N=501	
Genotipovi			
CC	96 (31,17)	194 (38,72)	0,067
CT	147 (47,73)	223 (44,51)	
TT	65 (21,10)	84 (16,77)	
Aleli			
C	0,55	0,61	0,018
T	0,45	0,39	
<b>rs2876300 A/G</b>	N=310	N=495	
Genotipovi			
AA	148 (47,74)	214 (43,23)	0,439
AG	132 (42,58)	232 (46,87)	
GG	30 (9,68)	49 (9,90)	
Aleli			
A	0,69	0,67	0,324
G	0,31	0,33	

Primenom Bonferroni korekcije za višestruko testiranje vrednosti verovatnoće  $p < 0,017$  su smatrane statistički značajnim.

#### 4.1.1.1. Asocijacija haplotipova varijanti gena *PHACTR1* sa prisustvom karotidnog plaka kod ispitanika sa AKA

Haplotipska analiza ispitivanih varijanti u genu *PHACTR1* urađena je u kompjuterskom programu Thesias. Distribucija frekvencija haplotipova varijanti gena *PHACTR1* u kontrolnoj grupi i kod ispitanika sa AKA, kao i asocijacija haplotipova sa

prisustvom karotidnog plaka, predstavljeni su u **Tabeli R3**. Tabela je na engleskom jeziku objavljena u Kuveljić i sar., 2019. [127]. Haplotip ACA značajno i nezavisno je asociran sa prisustvom karotidnog plaka u poređenju sa referentnim haplotipom GTA ( $p = 0,02$ ). Odnos šansi je korigovan na pol, starost, BMI, hipertenziju i ukupni holesterol. Za asocijaciju haplotipova varijanti gena *PHACTR1* sa prisustvom karotidnog plaka na uzorku od 501 ispitanika sa AKA snaga studije je bila 80%.

**Tabela R3.** Uticaj haplotipova varijanti rs9349379, rs2026458 i rs2876300 gena *PHACTR1* na prisustvo karotidnog plaka (PKP) kod ispitanika sa AKA

<i>PHACTR1</i>				
Frekvencija haplotipa				
Haplotipovi <sup>a</sup>	Kontrolna grupa	Ispitanici sa AKA	OR <sup>b</sup> [95%CI]	<i>p</i>
GTA	0,3558	0,3107	referentni haplotip	
ACG	0,2685	0,2987	1,16 [0,84 - 1,61]	0,37
ACA	0,2178	0,2472	1,54 [1,07 - 2,21]	0,02
GCA	0,0615	0,0602	1,04 [0,58 - 1,87]	0,89
ATA	0,0543	0,0495	0,99 [0,57 - 1,76]	0,99
ATG <sup>c</sup>	0,0398	0,0307	N/A	N/A
GCG <sup>c</sup>	0,0023	0,0030	N/A	N/A
GTG <sup>d</sup>	/	/	N/A	N/A

<sup>a</sup> - Redosled alela u haplotipovima je sledeći: rs9349379 A/G, rs2026458 C/T i rs2876300 A/G; <sup>b</sup> - Korigovan odnos šansi; <sup>c</sup> - Haplotipovi sa frekvencijom < 0,05, u obe ispitivane grupe, nisu bili uključeni u statističku analizu; <sup>d</sup> - Thesias nije detektovao prisustvo haplotipa u ispitivanim grupama; N/A - nije primenljivo; vrednosti verovatnoće  $p < 0,05$  su smatrane statistički značajnim.

#### 4.1.1.2. Asocijacija haplotipova varijanti gena *PHACTR1* sa prethodnim simptomatskim događajima i ultrasonografski definisanim tipovima aterosklerotskog plaka

Cerebrovaskularni insult (CVI), kao akutni događaj u karotidnoj aterosklerozi, imalo je 26% ispitanika sa AKA. Distribucija frekvencija haplotipova odabranih varijanti gena *PHACTR1* kod ispitanika sa AKA koji nisu i onih koji su imali CVI prikazana je u **Tabeli R4**. Nije pokazana statistički značajna asocijacija haplotipova varijanti rs9349379, rs2026458 i rs2876300 gena *PHACTR1* sa prisustvom CVI u poređenju sa referentnim haplotipom.

Karotidni aterosklerotski plak, prema stepenu ehogenosti koji oslikava njegov sadžaj, ultrasonografski se definiše kao hiperehogeni i hipoehogeni tip plaka. U **Tabeli R5** prikazana je raspodela frekvencija haplotipova varijanti gena *PHACTR1* kod ispitanika sa različitim tipom karotidnog plaka. Nije pokazana statistički značajna asocijacija haplotipova varijanti rs9349379, rs2026458 i rs2876300 gena *PHACTR1* sa ultrasonografski definisanim tipovima karotidnog plaka u poređenju sa referentnim haplotipom.

**Tabela R4.** Uticaj haplotipova varijanti rs9349379, rs2026458 i rs2876300 gena *PHACTR1* na pojavu prethodnog cerebrovaskularnog insulta (CVI) kod ispitanika sa AKA

<i>PHACTR1</i>	Frekvencija haplotipova				
	Haplotipovi <sup>a</sup>	bez CVI	CVI	OR [95% CI]	<i>p</i>
ACG	0,3026	0,3077	referentni haplotip		
GTA	0,2862	0,3608	1,18 [0,79 - 1,76]	0,43	
ACA	0,2637	0,2052	0,72 [0,44 - 1,20]	0,21	
GCA	0,0636	0,0563	0,85 [0,38 - 1,91]	0,70	
ATA	0,0524	0,0320	0,60 [0,25 - 1,44]	0,25	
ATG <sup>b</sup>	0,0267	0,0372	N/A	N/A	
GTG <sup>b</sup>	0,0047	0,0009	N/A	N/A	
GCG <sup>c</sup>	/	/	N/A	N/A	

<sup>a</sup> - Redosled alela u haplotipovima je sledeći: rs9349379 A/G, rs2026458 C/T i rs2876300 A/G; <sup>b</sup> - Haplotipovi sa frekvencijom < 0,05, u obe ispitivane grupe, nisu bili uključeni u statističku analizu; <sup>c</sup> - Thesias nije detektovao prisustvo haplotipa u ispitivanim grupama; N/A - nije primenljivo; vrednosti verovatnoće  $p < 0,05$  su smatrane statistički značajnim.

**Tabela R5.** Asocijacija haplotipova varijanti rs9349379, rs2026458 i rs2876300 gena *PHACTR1* sa različitim tipom karotidnog plaka kod ispitanika sa AKA

<i>PHACTR1</i>	Frekvencija haplotipova				
	Haplotipovi <sup>a</sup>	Hiperehogeni plak	Hipoehogeni plak	OR [95% CI]	<i>p</i>
ACG	0,3044	0,2994	referentni haplotip		
GTA	0,3032	0,2936	0,99 [0,65 - 1,51]	0,96	
ACA	0,2523	0,2425	0,96 [0,60 - 1,53]	0,87	
GCA	0,0537	0,0842	1,60 [0,79 - 3,25]	0,19	
ATA	0,0513	0,0436	0,87 [0,36 - 2,08]	0,75	
ATG <sup>b</sup>	0,0296	0,0351	N/A	N/A	
GTG <sup>b</sup>	0,0055	0,0016	N/A	N/A	
GCG <sup>c</sup>	/	/	N/A	N/A	

<sup>a</sup> - Redosled alela u haplotipovima je sledeći: rs9349379 A/G, rs2026458 C/T i rs2876300 A/G; <sup>b</sup> - Haplotipovi sa frekvencijom < 0,05, u obe ispitivane grupe, nisu bili uključeni u statističku analizu; <sup>c</sup> - Thesias nije detektovao prisustvo haplotipa u ispitivanim grupama; N/A - nije primenljivo; vrednosti verovatnoće  $p < 0,05$  su smatrane statistički značajnim.



#### 4.1.2. Nivo transkripcije gena *PHACTR1* u tkivu karotidnog plaka

Tkivo karotidnog plaka za ispitivanje nivoa transkripcije gena *PHACTR1* uzeto je od 44 ispitanika sa AKA tokom operacije endarterektomije, a njihovi osnovni demografski, biohemijski i klinički podaci predstavljeni su u **Tabeli R6**. Tabela je objavljena na engleskom jeziku u Kuveljić i sar., 2019. [127].

**Tabela R6.** Vrednosti osnovnih parametara ispitanika sa aterosklerozom karotidnih arterija (AKA) od kojih je uzeto tkivo karotidnog plaka za ispitivanje nivoa transkripcije gena *PHACTR1*

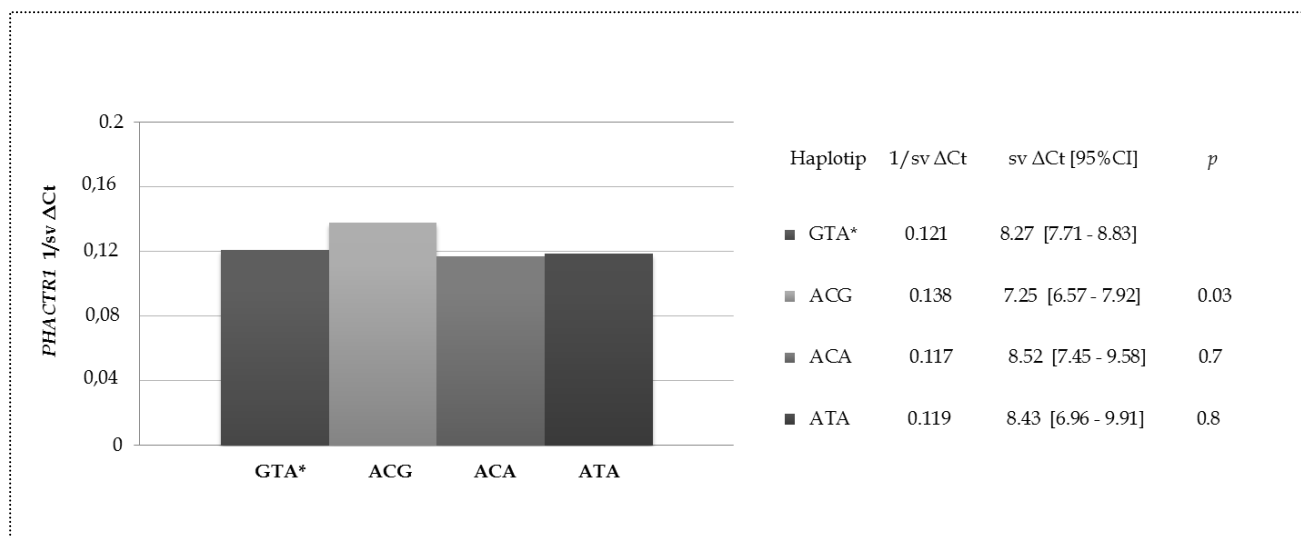
Parametar	Ispitanici sa AKA n=44
Starost, godine	66,68 ± 8,03
Pol ž/m, %	34,09/65,91
BMI, kg/m <sup>2</sup>	27,23 ± 6,54
TC, mmol/l	5,79 ± 1,02
HDLC, mmol/l	1,21 ± 0,28
LDLC, mmol/l	3,78 ± 1,00
TG, mmol/l	2,02 ± 0,89
Hipertenzija, %	95,4
Pušenje, %	90,9
DMTII, %	20,4
Hipoehogeni tip plaka, %	27,3
Simptomatski događaj ne/da, %	68,2/31,8
CVI, %	11,4
TIA, %	18,2
RIND, %	4,5
VBI, %	4,5

Vrednosti parametara su prikazane kao sv ± SD za: starost, BMI - indeks telesne mase (eng. *Body Mass Index*), TC - ukupni holesterol (eng. *Total Cholesterol*), HDLC - HDL holesterol (eng. *High-Density Lipoprotein Cholesterol*) LDLC - LDL holesterol (eng. *Low-Density Lipoprotein Cholesterol*) i TG - trigliceridi; DMT II - diabetes melitus tip 2; CVI - cerebrovaskularni insult; TIA - prolazni ishemijski napad (eng. *transient ishaemic attack*); RIND - reverzibilni ishemijski neurološki deficit (eng. *reversible ischemic neurological deficit*); VBI - vertebrobasilarna insuficijencija (eng. *vertebrobasilar insufficiency*).

Analiza uticaja haplotipova varijanti gena *PHACTR1* na nivo transkripcije gena *PHACTR1* urađena je u kompjuterskom programu Thesias poređenjem srednjih vrednosti

(sv)  $\Delta C_t$  za svaki haplotip, što je i prikazano na **Grafiku R1**. Grafik je publikovan na engleskom jeziku u Kuveljić i sar., 2019. [127]. Haplotip ACG je statistički značajno asociiran sa povišenim nivoom iRNK za *PHACTR1* u tkivu karotidnog plaka u poređenju sa referentnim haplotipom GTA ( $p = 0,03$ ).

Daljom analizom haplotipske pozadine, pokazano je da aleli varijante rs2876300 A/G prave značajnu razliku u nivou iRNK *PHACTR1* između haplotipova sa haplotipskom pozadinom rs9349379A i rs2026458C, odnosno da haplotip ACG pokazuje statistički značajno viši nivo transkripcije gena *PHACTR1* u odnosu na haplotip ACA ( $p = 0,05$ ).



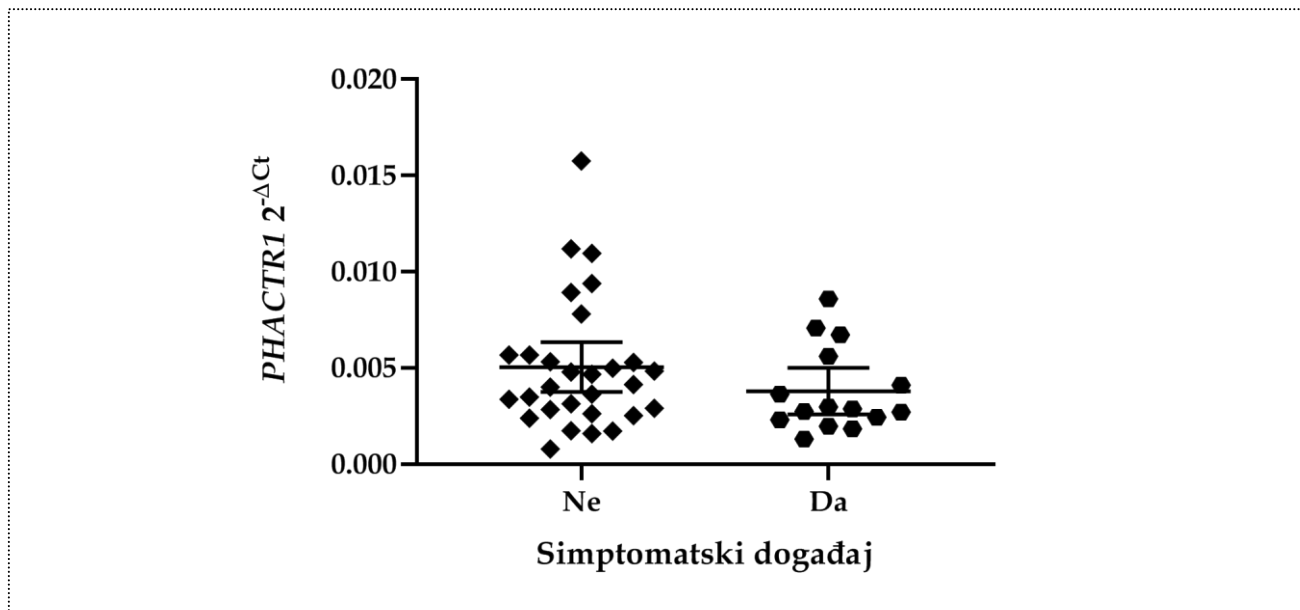
**Grafik R1.** Nivo transkripcije gena *PHACTR1* u tkivu karotidnog plaka u odnosu na haplotipove varijanti gena *PHACTR1*

Kvantifikacija transkripcije gena *PHACTR1* urađena je na 44 uzorka karotidnog aterosklerotskog plaka. Rezultati haplotipske analize u kompjuterskom programu Thesias su predstavljani kao srednje vrednosti (sv)  $\Delta C_t$  sa odgovarajućim intervalom poverenja [95%CI] za svaki haplotip.  $\Delta C_t$  je razlika između  $C_t$  vrednosti za *PHACTR1* i  $C_t$  vrednosti za endogenu kontrolu, *PPIA*, za svaki analizirani uzorak karotidnog plaka. Na grafiku su rezultati prikazani kao 1/sv  $\Delta C_t$ , jer su  $C_t$  vrednosti obrnuto proporcionalne nivou transkripcije. Pokazano je da haplotip ACG ima značajno povišen nivo transkripcije gena *PHACTR1* u odnosu na referentni haplotip GTA, sv  $\Delta C_t = 7,25$ ; 95%CI 6,57-7,92,  $p = 0,03$ . \* - Referentni haplotip; Redosled alela u haplotipovima je sledeći: rs9349379 A/G, rs2026458 C/T i rs2876300 A/G; Haplotipovi GCA, ATG, GCG i GTG sa frekvencijom  $< 0,05$ , u obe ispitivane grupe, nisu bili uključeni u statističku analizu; vrednosti verovatnoće  $p < 0,05$  su smatrane statistički značajnim.

#### 4.1.2.1. Nivo transkripcije gena *PHACTR1* u odnosu na pojavu prethodnog simptomatskog događaja (CVI, TIA, RIND, VB) i tip ultrasonografski definisanog aterosklerotskog plaka

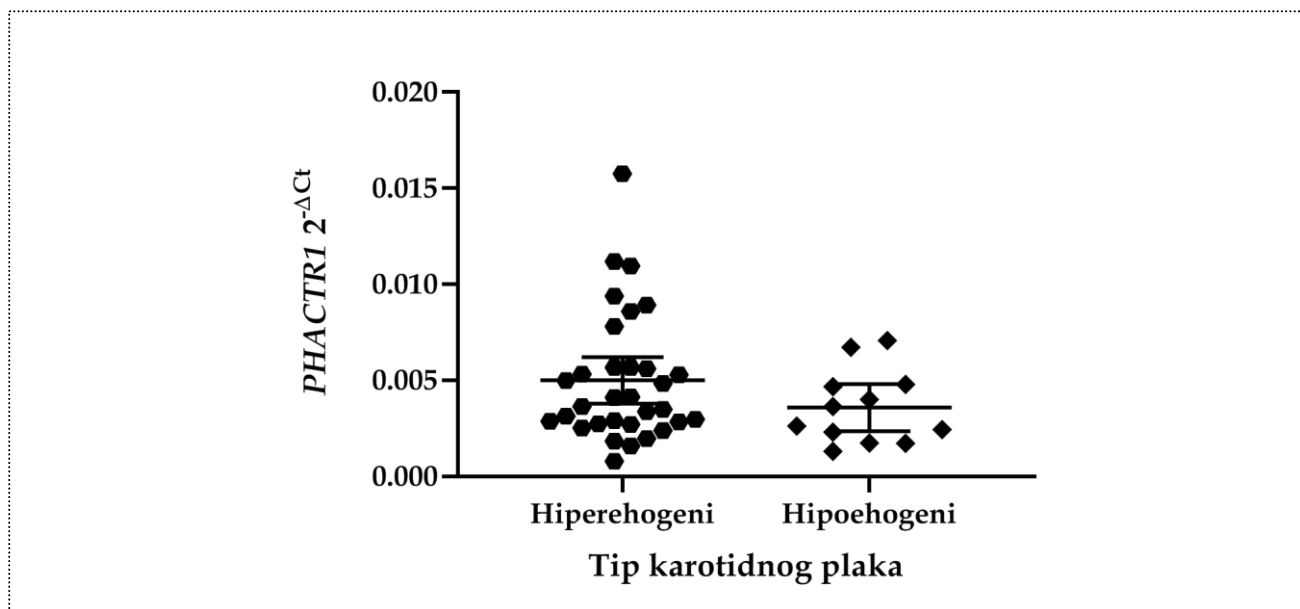
U grupi ispitanika sa AKA od kojih je uzeto tkivo karotidnog plaka blizu 70% nije imalo prethodne simptomatske događaje. Na **Grafiku R2**, prikazane su *PHACTR1*  $2^{-\Delta C_t}$  vrednosti za svaki analizirani uzorak karotidnog plaka. Razlika u nivou transkripcije gena

*PHACTR1* između ispitanika sa AKA koji nisu i onih koji su imali prethodne simptomatske događaje nije bila značajna.



**Grafik R2.** Nivo transkripcije gena *PHACTR1* u odnosu na pojavu prethodnog simptomatskog događaja

Kvantifikacija transkripcije gena *PHACTR1* urađena je na 29 uzorka karotidnog plaka ispitanika sa AKA koji nisu i 15 uzoraka onih koji su imali prethodne simptomatske događaje. Analiza u kompjuterskom programu GraphPad nije pokazala statistički značajnu razliku u nivou transkripcije gena *PHACTR1* u odnosu na pojavu prethodnog simptomatskog događaja,  $p = 0,21$ .



**Grafik R3.** Nivo transkripcije gena *PHACTR1* u odnosu na tip karotidnog plaka

Kvantifikacija transkripcije gena *PHACTR1* urađena je na 32 uzorka hiperehogenog plaka i 12 uzoraka hipoehogenog plaka. Analiza u kompjuterskom programu GraphPad nije pokazala statistički značajnu razliku u nivou transkripcije gena *PHACTR1* u odnosu na tip karotidnog plaka,  $p = 0,15$ .

Hipoehogeni tip plaka imalo je 27,3% ispitanika sa AKA od kojih je uzeto tkivo karotidnog plaka. Na **Grafiku R3.** prikazane su *PHACTR1*  $2^{-\Delta Ct}$  vrednosti za svaki analizirani uzorak karotidnog plaka. Nivo transkripcije gena *PHACTR1*, iako niži u hipoehogenom plaku, nije bio značajno različit od nivoa transkripcije gena *PHACTR1* u hiperehogenom karotidnom plaku.

## 4.2. Ateroskleroza koronarnih arterija (AKOA)

### 4.2.1. Asocijacija varijanti rs9349379 A/G, rs2026458 C/T i rs2876300 A/G u genu *PHACTR1* sa prvim infarktom miokarda (IM)

Ispitanici sa prvim IM bili su značajno stariji od ispitanika iz kontrole grupe, takođe među njima je bilo više pušača i hipertenzivnih osoba. Biohemijska analiza krvi pokazala je značajno viši nivo triglicerida i LDL holesterola kod ispitanika sa IM, a niži nivo HDL holesterola. Ovi podaci prikazani su u **Tabeli R7** koja je na engleskom jeziku objavljena u Kuveljić i sar., 2021. [128]. Više od 50% ispitanika imalo je višesudovnu bolest (VSB) srca, što je teži oblik AKOA.

**Tabela R7.** Vrednosti osnovnih parametara u kontrolnoj grupi i kod ispitanika sa aterosklerozom koronarnih arterija (AKOA) koji su imali prvi infarkt miokarda (IM)

Parametar	Kontrolna grupa n=310	IM n=537	<i>p</i>
Starost, godine	54,12 ± 14,17	58,43 ± 11,25	< 0,01*
Pol, ž/m, %	44,58/55,42	29,40/70,60	< 0,01
BMI, kg/m <sup>2</sup>	25,09 ± 3,68	27,26 ± 3,99	< 0,01*
TC, mmol/l	5,61 ± 1,30	5,58 ± 1,15	ns*
HDLC, mmol/l	1,48 ± 0,86	1,10 ± 0,34	< 0,01*
LDLC, mmol/l	3,31 ± 1,23	3,65 ± 1,03	< 0,01*
TG, mmol/l	1,58 ± 1,09	1,89 ± 1,24	< 0,01*
Hipertenzija, %	27,43	64,51	< 0,01
Pušenje, %	55,04	69,24	< 0,01
DMT II, %	0,00	21,72	N/A
STEMI, %	0,00	89,74	N/A
VSB, %	N/A	51,25	N/A

Vrednosti parametara su prikazane kao sv ± SD za: starost, BMI - indeks telesne mase (eng. *Body Mass Index*), TC - ukupni holesterol (eng. *Total Cholesterol*), HDLC - HDL holesterol (eng. *High-Density Lipoprotein Cholesterol*), LDLC - LDL holesterol (eng. *Low-Density Lipoprotein Cholesterol*) i TG - trigliceridi; DMT II - diabetes melitus tip 2; STEMI - IM sa elevacijom ST segmenta elektrokardiograma; VSB - više-sudovna bolest srca;  $\chi^2$  test je korišćen za poređenje kategorijskih parametara; \* - Mann-Whitney U test je korišćen za poređenje srednjih vrednosti parametara koje nisu u normalnoj raspodeli između kontrole grupe i ispitanika sa IM; ns - nije značajno; N/A - nije primenljivo; vrednosti verovatnoće  $p < 0,05$  su smatrane statistički značajnim.

Ispitivane varijante gena *PHACTR1*: rs9349379, rs2026458 i rs2876300 nisu pokazale odstupanje od HW ravnoteže u kontrolnoj grupi i kod ispitanika sa prvim IM. U **Tabeli R8** prikazana je raspodela frekvencija genotipova i alela varijanti gena *PHACTR1* u kontrolnoj grupi i kod ispitanika sa AKOA koji su imali prvi IM. Genotipovi i aleli odabranih varijanti nisu pokazali statistički značajnu asocijaciju sa IM. Tabela je na engleskom jeziku objavljena kao dopunska tabela u Kuveljić i sar., 2021. [128].

**Tabela R8.** Distribucija frekvencija alela i genotipova varijanti gena *PHACTR1*: rs9349379, rs2026458 i rs2876300 u kontrolnoj grupi i kod ispitanika sa prvim IM

<i>PHACTR1</i>	Kontrolna grupa, n (%)	IM, n (%)	<i>p</i>
<b>rs9349379 A/G</b>	N=298	N=510	
Genotipovi			
AA	104 (34,90)	171 (33,48)	0,54
AG	138 (46,31)	255 (50,11)	
GG	56 (18,79)	84 (16,41)	
Aleli			
A	0,58	0,59	0,85
G	0,42	0,41	
<b>rs2026458 C/T</b>	N=308	N=537	
Genotipovi			
CC	96 (31,17)	176 (32,77)	0,47
CT	147 (47,73)	266 (49,53)	
TT	65 (21,10)	95 (17,69)	
Aleli			
C	0,55	0,58	0,32
T	0,45	0,42	
<b>rs2876300 A/G</b>	N=310	N=533	
Genotipovi			
AA	148 (47,74)	251 (47,09)	0,57
AG	132 (42,58)	218 (40,90)	
GG	30 (9,68)	64 (12,01)	
Aleli			
A	0,69	0,68	0,53
G	0,31	0,32	

Primenom Bonferroni korekcije za višestruko testiranje vrednosti verovatnoće  $p < 0,017$  su smatrane statistički značajnim.

#### 4.2.1.1. Uticaj haplotipova varijanti gena *PHACTR1* na nastanak IM

Distribucija frekvencija haplotipova varijanti gena *PHACTR1* u kontrolnoj grupi i kod ispitanika sa IM, predstavljeni su u **Tabeli R9**. Nijedan haplotip nije pokazao značajnu asocijaciju sa nastankom IM kod ispitanika sa AKOA u poređenju sa referentnim haplotipom. Tabela je na engleskom jeziku objavljena u Kuveljić i sar., 2021. [128].

**Tabela R9.** Uticaj haplotipova varijanti rs9349379, rs2026458 i rs2876300 gena *PHACTR1* na pojavu prvog IM kod ispitanika sa AKOA

<i>PHACTR1</i>	Frekvencija haplotipova				
	Haplotipovi <sup>a</sup>	Kontrolna grupa	IM	OR [95%CI]	<i>p</i>
GTA	0,3559	0,3508	referentni haplotip		
ACG	0,2698	0,2976	1,15 [0,90 - 1,48]		0,27
GCA	0,0608	0,0753	1,31 [0,83 - 2,07]		0,25
ATA	0,0553	0,0493	0,93 [0,55 - 1,58]		0,79
ACA	0,2173	0,2005	0,97 [0,74 - 1,27]		0,82
ATG <sup>b</sup>	0,0380	0,0215	N/A		N/A
GCG <sup>b</sup>	0,0021	0,0027	N/A		N/A
GTG <sup>b</sup>	0,0008	0,0023	N/A		N/A

<sup>a</sup> - Redosled alela u haplotipovima je sledeći: rs9349379 A/G, rs2026458 C/T i rs2876300 A/G; <sup>b</sup> - Haplotipovi sa frekvencijom < 0,05, u obe ispitivane grupe, nisu bili uključeni u statističku analizu; N/A - nije primenljivo; vrednosti verovatnoće *p* < 0,05 su smatrane statistički značajnim.

#### 4.2.1.2. Asocijacija varijanti gena *PHACTR1* sa parametrima težine bolesti

VSB se definiše kao razvoj ateroskleroze u dve ili više koronarnih arterija. Varijanta gena *PHACTR1*, rs2876300, pokazala je povezanost sa razvojem višesudovne bolesti srca kod ispitanika sa AKOA. Raspodela genotipova varijante rs2876300, prema dominantnom modelu nasleđivanja (AA vs. AG+GG), kod ispitanika sa jednosudovnom i višesudovnom bolesti srca prikazana je u **Tabeli R10**. Alel G varijante rs2876300 je značajno i nezavisno asociiran sa povećanim rizikom za razvoj višesudovne bolesti srca (*p*=0,03). Odnos šansi je korigovan na pol, starost, BMI, hipertenziju i ukupni holesterol. Snaga studije je bila 61% za asocijaciju varijante gena *PHACTR1* sa VSB srca na uzorku od 490 ispitanika sa AKOA. Tabela je na engleskom jeziku objavljena u Kuveljić i sar., 2021. [128].

**Tabela R10.** Asocijacija varijante rs2876300 A/G sa višesudovnom bolesti srca, prema dominantnom modelu nasleđivanja

rs2876300 A/G	JSB, n (%)	VSB, n (%)	OR [95%CI]	<i>p</i>	OR <sup>a</sup> [95%CI]	<i>p</i>
AA	125 (52,30)	107 (42,63)	ref. genotip		ref. genotip	
AG + GG	114 (47,70)	144 (57,37)	1,48 [1,03 - 2,11]	0,03	1,64 [1,05 - 2,55]	0,03
G	0,3	0,36	1,34 [1,02 - 1,75]	0,03		

<sup>a</sup> - Korigovan odnos šansi; JSB - jednosudovna bolest srca; VSB - višesudovna bolest srca; vrednosti verovatnoće  $p < 0,05$  su smatrane statistički značajnim.

SYNTAX score (SS) je parametar težine i kompleksnosti koronarne bolesti. Vrednosti  $SS \geq 22$  oslikavaju teži oblik bolesti. Distribucija frekvencija haplotipova varijanti gena *PHACTR1* kod ispitanika sa IM, koji imaju vrednosti SS ispod i iznad granične vrednosti 22, predstavljeni su u **Tabeli R11**. Haplotipovi AT i GC značajno i nezavisno su asocirani sa vrednostima SS iznad 22 u poređenju sa referentnim haplotipom AC. S obzirom na to da su haplotipovi AT i GC pokazali, pojedinačno, značajnu asocijaciju sa višim SS koja je išla u istom smeru, uradili smo i analizu kojom možemo pokazati da li je ovaj efekat homogen. Analiza je dokazala homogeni efekat haplotipova AT i GC u asocijaciji sa  $SS \geq 22$  u poređenju sa haplotipovima AC i GT.

**Tabela R11.** Uticaj haplotipova varijanti rs9349379 i rs2026458 gena *PHACTR1* na vrednosti parametra SYNTAX score (SS)

<i>PHACTR1</i>	Frekvencija haplotipova <sup>a</sup>				Homogeni efekat <sup>c</sup>	
	SS < 22	SS ≥ 22	OR <sup>b</sup> [95% CI]	<i>p</i>	OR [95% CI]	<i>p</i>
AC	0,5109	0,3735	referentni haplotip			
AT	0,0879	0,2299	3.36 [1.10 - 10.28]	0,03	3.49 [1.48 - 8.27]	0,004
GC	0,0705	0,1782	3.42 [1.07 - 10.98]	0,04		
GT	0,3307	0,2184	1.01 [0.44 - 2.35]	0,98		

<sup>a</sup> - Redosled alela u haplotipovima je sledeći: rs9349379 A/G i rs2026458 C/T; <sup>b</sup> - Korigovan odnos šansi na pol, starost, BMI, hipertenziju i ukupni holesterol; <sup>c</sup> - Homogeni efekat - poređenje haplotipova AT i GC sa haplotipovima AC i GT; vrednosti verovatnoće  $p < 0,05$  su smatrane statistički značajnim.



#### 4.2.2. Uticaj varijanti gena *PHACTR1* na remodelovanje leve komore srca, 6 meseci nakon IM

Remodelovanje srca 6 meseci nakon IM praćeno je tokom šest meseci u grupi od 157 ispitanika sa AKOA. Njihovi osnovni parametri prikazani su u **Tabeli R12**, kao i poređenje između grupa ispitanika bez i sa razvijenim maladaptivnim remodelovanjem leve komore srca (mrlk) 6 meseci nakon IM.

**Tabeli R12.** Vrednosti osnovnih parametara ispitanika bez i sa razvijenim maladaptivnim remodelovanjem leve komore srca (mrlk) 6 meseci nakon IM

Parametar	IM n=157	bez mrlk n=109	mrlk n=48	<i>p</i>
Starost, godine	55,47 ± 8,40	55,43 ± 8,22	54,75 ± 8,64	ns*
Pol, ž/m, %	23,16/76,84	25,00/75,00	20,83/79,17	ns
BMI, kg/m <sup>2</sup>	27,49 ± 3,82	27,13 ± 3,86	28,15 ± 3,97	ns*
TC, mmol/l	5,57 ± 1,12	5,46 ± 1,11	5,85 ± 1,19	ns*
HDLC, mmol/l	1,08 ± 0,26	1,07 ± 0,24	1,10 ± 0,31	ns*
LDLC, mmol/l	3,64 ± 1,04	3,48 ± 0,97	4,02 ± 1,18	< 0,01*
TG, mmol/l	1,90 ± 1,13	1,99 ± 1,28	1,71 ± 0,75	ns*
CK <sub>max</sub> , U/l	1812,73 ± 1766,35	1508,58 ± 1432,20	2659,91 ± 2135,04	< 0,01*
CK-MB <sub>max</sub> , U/l	162,82 ± 146,57	144,62 ± 132,13	225,02 ± 158,98	< 0,01*
Tn <sub>max</sub> , U/l	101,91 ± 110,09	103,70 ± 129,28	111,51 ± 67,45	ns*
DMT II, %	33,33	32,41	37,50	ns
Hipertenzija, %	54,24	52,38	57,45	ns
Pušenje, %	76,84	81,13	81,25	ns
STEMI, %	79,41	76,92	85,42	ns
VSB, %	49,68	46,74	54,35	ns
Kolaterale, %	11,49	12,50	11,36	ns
Proksimalne lezije, %	45,14	43,68	53,66	ns
Prednji zid, %	35,71	31,43	42,22	ns
NYHA klasa ≥ 2, %	23,20	23,17	24,39	ns
Killip klasa ≥ 2, %	10,76	11,46	8,70	ns
Maladaptivno rlk, %	30,57	N/A	N/A	N/A

Vrednosti parametara su prikazane kao  $\pm$  SD za: starost, BMI - indeks telesne mase (eng. *Body Mass Index*), TC - ukupni holesterol (eng. *Total Cholesterol*), HDLC - HDL holesterol (eng. *High-Density Lipoprotein Cholesterol*), LDLC - LDL holesterol (eng. *Low-Density Lipoprotein Cholesterol*), TG - trigliceridi, CK<sub>max</sub> - maksimalni nivo kreatin kinaze (eng. *creatine kinase*), CK-MB<sub>max</sub> - maksimalni nivo izoenzima MB kreatin kinaze, karakterističnog za srčano tkivo i Tn<sub>max</sub> - maksimalni nivo troponina; mrlk - maladaptivno remodelovanje leve komore srca; DMT II - diabetes melitus tip 2; STEMI - IM sa elevacijom ST segmenta elektrokardiograma; VSB - višesudovna bolest srca; NYHA klasa - klasifikacija stepena srčane insuficijencije prema New York Heart Association; Killip klasa - klasifikacija stepena srčane insuficijencije;  $\chi^2$  test je korišćen za poređenje kategorijskih parametara; \* - Mann-Whitney U test je korišćen za poređenje srednjih vrednosti parametara koje nisu u normalnoj raspodeli između ispitanika bez i sa maladaptivnim remodelovanjem leve komore srca; ns - nije značajno; N/A - nije primenljivo; vrednosti verovatnoće  $p < 0,05$  su smatrane statistički značajnim.

U **Tabeli R13** je prikazana raspodela haplotipova varijanti gena *PHACTR1* kod ispitanika sa AKOA koji nisu i onih koji su razvili maladaptivno remodelovanje leve komore srca 6 meseci nakon IM, kao i uticaj haplotipova na razvoj maladaptivnog remodelovanja. Haplotipovi ispitivanih varijanti nisu pokazali značajnu asocijaciju sa maladaptivnim remodelovanjem leve komore srca u poređenju sa referentnim haplotipom.

**Tabela R13.** Uticaj haplotipova varijanti rs9349379, rs2026458 i rs2876300 gena *PHACTR1* na razvoj maladaptivnog remodelovanja leve komore (rlk) srca kod ispitanika sa AKOA 6 meseci nakon prvog IM

<i>PHACTR1</i> Frekvencija haplotipova				
Haplotipovi <sup>a</sup>	bez maladaptivnog rlk	maladaptivno rlk	OR [95% CI]	<i>p</i>
GTA	0,3199	0,3462	referentni haplotip	
ACG	0,2777	0,3086	0,88 [0,44 - 1,75]	0,72
ACA	0,2265	0,1355	0,50 [0,23 - 1,11]	0,09
GCA	0,0838	0,0885	0,91 [0,30 - 2,81]	0,87
ATA	0,0567	0,0460	0,71 [0,15 - 3,43]	0,67
ATG <sup>b</sup>	0,0320	0,0614	N/A	N/A
GCG <sup>b</sup>	0,0033	0,0137	N/A	N/A
GTG <sup>c</sup>	/	/	N/A	N/A

<sup>a</sup> - Redosled alela u haplotipovima je sledeći: rs9349379 A/G, rs2026458 C/T i rs2876300 A/G; <sup>b</sup> - Haplotipovi sa frekvencijom  $< 0,05$ , u obe ispitivane grupe, nisu bili uključeni u statističku analizu; <sup>c</sup> - Thesias nije detektovao prisustvo haplotipa u ispitivanim grupama; N/A - nije primenljivo; vrednosti verovatnoće  $p < 0,05$  su smatrane statistički značajnim.

U okviru doktorske disertacije ispitivali smo i povezanost haplotipova varijanti gena *PHACTR1* sa promenom vrednosti ( $\Delta$ ) ehokardiografskih parametara strukture i funkcije leve komore srca koji su mereni na prijemu i na kontrolnom pregledu 6 meseci nakon IM. U **Tabeli R14** su prikazane srednje vrednosti promene ehokardiografskih parametara strukture leve komore srca za svaki haplotip. Haplotip GCA povezan je, u poređenju sa referentnim haplotipom GTA, sa značajnim smanjenjem mase leve komore srca 6 meseci nakon IM. Nakon Bonferoni korekcije zbog testiranja više parametara ova asocijacija više nije bila značajna. U **Tabeli R15** prikazane su srednje vrednosti promene ehokardiografskih parametara funkcije leve komore srca za svaki haplotip. Nijedan haplotip nije pokazao značajnu asocijaciju sa ukupno trinaest ispitivanih ehokardiografskih parametara.

**Tabela R14.** Uticaj haplotipova varijanti rs9349379, rs2026458 i rs2876300 gena *PHACTR1* na promenu ehokardiografskih parametara strukture leve komore (LK) srca tokom 6 meseci od IM

Ehokardiografski parametar	srednja vrednost [95% CI]	<i>p</i>
<b><math>\Delta</math> end-dijastolnog volumena LK, ml</b>		
GTA	-1,04 [-9,88 - 7,80]	ref. haplotip
ACG	3,86 [-5,98 - 13,70]	0,53
ACA	5,16 [-10,86 - 21,16]	0,51
GCA	9,96 [-19,12 - 39,06]	0,50
ATA	-4,50 [-31,50 - 22,46]	0,81
<b><math>\Delta</math> end-sistolnog volumena LK, ml</b>		
GTA	-0,78 [-8,00 - 6,42]	ref. haplotip
ACG	3,82 [-4,02 - 11,68]	0,48
ACA	4,36 [-4,68 - 13,42]	0,41
GCA	-0,66 [-24,64 - 23,32]	0,99
ATA	-1,44 [-26,60 - 23,72]	0,96
<b><math>\Delta</math> end-dijastolnog dijametra LK, mm</b>		
GTA	1,74 [0,28 - 3,20]	ref. haplotip
ACG	0,42 [-1,34 - 2,18]	0,31
ACA	1,14 [-1,00 - 3,28]	0,66
GCA	0,46 [-2,98 - 3,90]	0,52
ATA	-3,42 [-8,82 - 2,00]	0,08

nastavak **Tabele R14** je na sledećoj strani

<b>Δ end-sistolnog dijametra LK, mm</b>		
GTA	0,94 [-0,74 - 2,62]	ref. haplotip
ACG	-0,54 [-2,84 - 1,74]	0,38
ACA	0,18 [-2,72 - 3,08]	0,67
GCA	2,54 [-1,48 - 6,56]	0,47
ATA	-7,80 [-16,50 - 0,90]	0,06
<b>Δ mase LK, g</b>		
GTA	0,12 [-19,08 - 19,32]	ref. haplotip
ACG	4,26 [-26,32 - 34,86]	0,84
ACA	-0,02 [-26,94 - 26,90]	0,99
GCA	-57,16 [-104,78 - -9,54]	0,03
ATA	-68,92 [-163,54 - 25,70]	0,17
<b>Δ dugačkog dijametra LK, mm</b>		
GTA	0,11 [-3,48 - 3,68]	ref. haplotip
ACG	-0,61 [-4,80 - 3,58]	0,84
ACA	4,62 [0,00 - 9,26]	0,19
GCA	1,66 [-6,02 - 9,34]	0,70
ATA	-8,92 [-19,36 - 1,52]	0,14
ATG	5,39 [-1,02 - 11,80]	0,14

Prema Bonferroni korekciji, zbog testiranja 13 ehokardiografskih parametara strukture i funkcije leve komore srca, vrednosti verovatnoće  $p < 0,004$  su smatrane statistički značajnim.

**Tabela R15.** Uticaj haplotipova varijanti rs9349379, rs2026458 i rs2876300 gena *PHACTR1* na promenu ehokardiografskih parametara funkcije leve komore (LK) srca tokom 6 meseci od IM

Ehokardiografski parametar	srednja vrednost [95% CI]	p
<b>Δ udarnog volumena LK, ml</b>		
GTA	8,28 [0,06 - 16,50]	ref. haplotip
ACG	3,52 [-4,28 - 11,32]	0,49
ACA	6,40 [-6,02 - 18,82]	0,81
GCA	-0,12 [-15,96 - 15,70]	0,37
ATA	3,40 [-27,50 - 34,32]	0,76

nastavak Tabele R15 je na sledećoj strani

<b>Δ ejekcione frakcije LK, %</b>		
GTA	0,98 [-2,44 - 4,40]	ref. haplotip
ACG	1,58 [-2,58 - 5,72]	0,84
ACA	-1,18 [-4,72 - 2,34]	0,47
GCA	1,52 [-9,96 - 13,00]	0,93
ATA	5,90 [-6,92 - 18,74]	0,48
<b>Δ kratkog dijametra LK, mm</b>		
GTA	0,18 [-1,41 - 1,78]	ref. haplotip
ACG	0,18 [-1,68 - 2,03]	0,99
ACA	1,17 [-2,61 - 4,97]	0,66
GCA	0,72 [-6,87 - 8,31]	0,89
<b>Δ ukupnog radijalnog deformiteta miokarda, %</b>		
GTA	3,19 [-0,58 - 6,96]	ref. haplotip
ACG	1,60 [-3,12 - 6,34]	0,68
ACA	4,41 [-1,00 - 9,82]	0,73
GCA	-4,01 [-11,64 - 3,62]	0,10
ATA	0,87 [-15,74 - 17,48]	0,80
<b>Δ ukupnog longitudinalnog deformiteta miokarda, %</b>		
GTA	-0,08 [-1,08 - 0,92]	ref. haplotip
ACG	-0,95 [-2,28 - 0,38]	0,37
ACA	-1,50 [-3,56 - 0,56]	0,24
GCA	-0,37 [-4,10 - 3,36]	0,89
ATA	-0,39 [-5,58 - 4,80]	0,91
<b>Δ bazalnog cirkumferentnog deformiteta miokarda, %</b>		
GTA	-0,53 [-2,32 - 1,24]	ref. haplotip
ACG	-1,76 [-4,02 - 0,48]	0,43
ACA	-3,37 [-6,02 - -0,72]	0,11
GCA	-1,05 [-6,42 - 4,30]	0,86
<b>Δ apikalnog cirkumferentnog deformiteta miokarda, %</b>		
GTA	0,01 [-2,14 - 2,18]	ref. haplotip
ACG	-1,21 [-3,62 - 1,20]	0,51
ACA	-3,55 [-7,00 - -1,00]	0,11
GCA	-1,89 [-7,44 - 3,66]	0,54

Prema Bonferroni korekciji, zbog testiranja 13 ehokardiografskih parametara strukture i funkcije leve komore srca, vrednosti verovatnoće  $p < 0,004$  su smatrane statistički značajnim.

### 4.2.3. Nivo transkripcije gena *PHACTR1* u mononuklearnim ćelijama periferne krvi (MČPK)

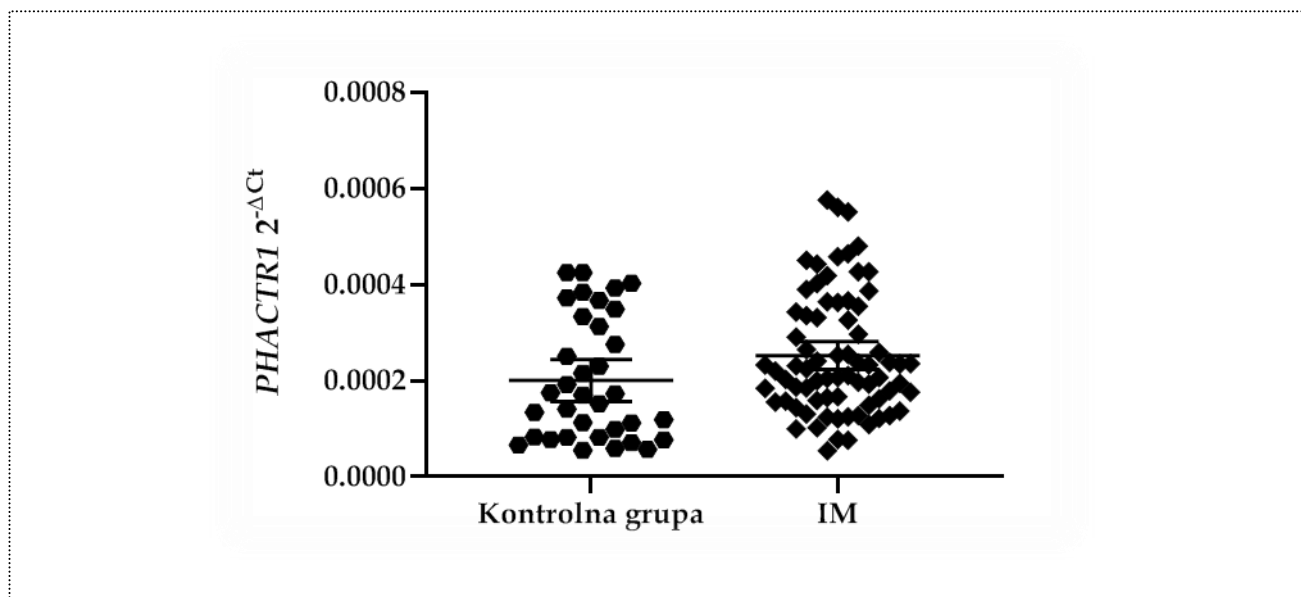
Analiza nivoa transkripcije ispitivanih gena u MČPK urađena je na uzorcima periferne krvi 35 ispitanika iz kontrolne grupe i 74 ispitanika sa AKOA 6 meseci nakon prvog IM. Vrednosti i poređenje njihovih osnovnih podataka prikazani su u **Tabeli R16**. Tabela je objavljena na engleskom jeziku u Kuveljić i sar., 2021. [128].

**Tabela R16.** Vrednosti osnovnih parametara u kontrolnoj grupi i kod ispitanika sa AKOA od kojih je uzeta krv 6 meseci nakon prvog IM

Parametar	Kontrolna grupa n=35	IM n=74	<i>p</i>
Starost, godine	51,51 ± 9,68	54,47 ± 8,02	ns*
Pol, ž/m, %	51,35/48,65	23,68/76,32	< 0,01
BMI, kg/m <sup>2</sup>	26,38 ± 3,63	27,33 ± 3,87	ns*
TC, mmol/l	5,56 ± 0,99	5,42 ± 1,05	ns*
HDLC, mmol/l	1,50 ± 0,30	1,07 ± 0,25	< 0,01*
LDLC, mmol/l	3,54 ± 0,86	3,48 ± 1,08	ns*
TG, mmol/l	1,29 ± 0,71	1,90 ± 1,23	< 0,01*
DMT II, %	0,00	33,33	NA
Hipertenzija, %	28,57	52,00	ns
Pušenje, %	38,10	38,67	ns

Vrednosti parametara su prikazane kao sv ± SD za: starost, BMI - indeks telesne mase (eng. *Body Mass Index*), TC - ukupni holesterol (eng. *Total Cholesterol*), HDLC - HDL holesterol (eng. *High-Density Lipoprotein Cholesterol*), LDLC - LDL holesterol (eng. *Low-Density Lipoprotein Cholesterol*) i TG - trigliceridi; DMT II - diabetes melitus tip 2; VSB - više-sudovna bolest srca;  $\chi^2$  test je korišćen za poređenje kategorijskih parametara; \*- Mann-Whitney U test je korišćen za poređenje srednjih vrednosti parametara koje nisu u normalnoj raspodeli između kontrolne grupe i ispitanika sa IM; ns - nije značajno; NA - nije primenljivo; vrednosti verovatnoće  $p < 0,05$  su smatrane statistički značajnim.

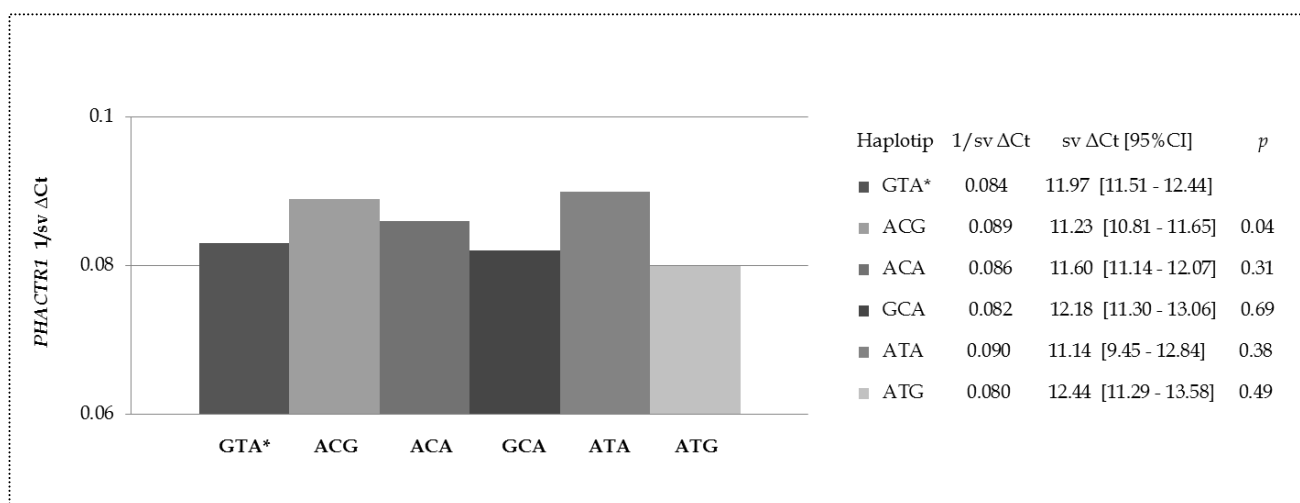
Analiza nivoa transkripcije gena *PHACTR1*, nezavisno od ispitivanih varijanti gena *PHACTR1*, pokazala je da je nivo transkripcije gena *PHACTR1* statistički značajno viši u MČPK ispitanika 6 meseci nakon IM u odnosu na MČPK ispitanika iz kontrole grupe,  $p = 0,02$ . Na **Grafiku R4** predstavljene su *PHACTR1* 2<sup>-ΔCt</sup> vrednosti za svaki analizirani uzorak MČPK, podeljene prema kontrolnoj grupi i ispitanicima sa AKOA 6 meseci nakon IM. Grafik je je publikovan na engleskom jeziku u Kuveljić i sar., 2021. [128].



**Grafik R4.** Nivo transkripcije gena *PHACTR1* u mononuklearnim ćelijama periferne krvi u kontrolnoj grupi i kod ispitanika sa AKOA 6 meseci nakon prvog IM

Kvantifikacija transkripcije gena *PHACTR1* urađena je na 35 uzoraka MČPK ispitanika iz kontrole grupe i 74 uzorka MČPK ispitanika sa AKOA 6 meseci nakon prvog IM. Analizom u kompjuterskom programu GraphPad pokazano je da je nivo transkripcije gena *PHACTR1* značajno povišen u MČPK ispitanika sa AKOA 6 meseci nakon IM, u odnosu na MČPK ispitanika iz kontrole grupe,  $p = 0,02$ ; vrednosti verovatnoće  $p < 0,05$  su smatrane statistički značajnim.

Dalje smo ispitivali uticaj haplotipova varijanti rs9349379, rs2026458 i rs2876300 na nivo transkripcije gena *PHACTR1* u MČPK kod ispitanika sa AKOA 6 meseci nakon prvog IM. Na **Grafiku R5** prikazane su srednje  $\Delta Ct$  vrednosti za svaki haplotip, kao i verovatnoće uticaja haplotipova ispitivanih varijanti na nivo transkripcije gena *PHACTR1*. Pokazano je da haplotip ACG ima statistički značajno viši nivo transkripcije gena *PHACTR1* u MČPK kod ispitanika 6 meseci nakon IM, u odnosu na referentni haplotip GTA ( $p = 0,04$ ). Grafik je publikovan na engleskom jeziku u Kuveljić i sar., 2021. [128].

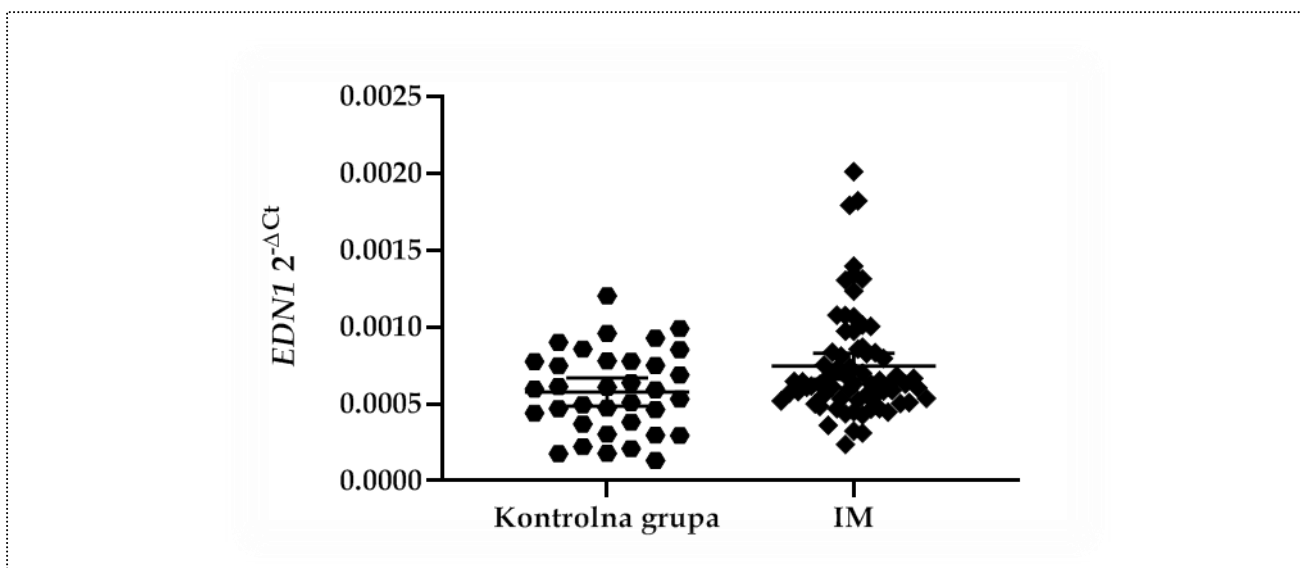


**Grafik R5.** Nivo transkripcije gena *PHACTR1* u mononuklearnim ćelijama periferne krvi (MČPK) u odnosu na haplotipove varijanti gena *PHACTR1*

Kvantifikacija transkripcije gena *PHACTR1* urađena je na 74 uzorka MČPK ispitanika sa AKOA 6 meseci nakon prvog IM. Na grafiku su rezultati prikazani kao  $1/\text{sv } \Delta\text{Ct}$ , što su srednje vrednosti  $\Delta\text{Ct}$  za svaki haplotip. Pokazano je da haplotip ACG ima statistički značajno povišen nivo transkripcije gena *PHACTR1* u MČPK 6 meseci nakon IM, u odnosu na referentni haplotip GTA,  $\text{sv } \Delta\text{Ct} = 11,23$ ; 95% CI 10,81–11,65,  $p = 0,04$ . \* - Referentni haplotip; Redosled alela u haplotipovima je sledeći: rs9349379 A/G, rs2026458 C/T i rs2876300 A/G; Haplotipovi GCG i GTG sa frekvencijom  $< 0,05$ , u obe ispitivane grupe, nisu bili uključeni u statističku analizu; vrednosti verovatnoće  $p < 0,05$  su smatrane statistički značajnim.

#### 4.2.4. Nivo transkripcije gena *EDN1* u mononuklearnim ćelijama periferne krvi

Analizom transkripcije gena *EDN1* u MČPK ispitanika iz kontrolne grupe i ispitanika sa AKOA 6 meseci nakon prvog IM, nezavisno od ispitivanih varijanti gena *PHACTR1*, ustanovili smo značajno povišeni nivo iRNK *EDN1* kod ispitanika sa AKOA u odnosu na kontrolnu grupu,  $p = 0,03$ . Na **Grafiku R6** predstavljene su  $EDN1 2^{-\Delta\text{Ct}}$  vrednosti za svaki analizirani uzorak MČPK, u okviru kontrolne grupe i grupe ispitanika sa AKOA, 6 meseci nakon IM.



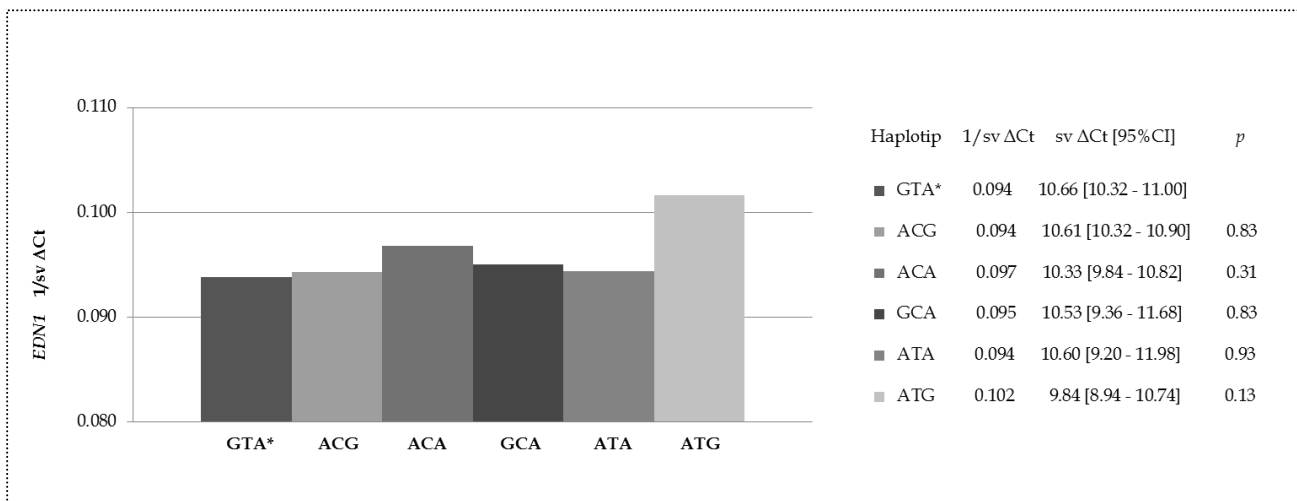
**Grafik R6.** Nivo transkripcije gena *EDN1* u mononuklearnim ćelijama periferne krvi u kontrolnoj grupi i kod ispitanika sa AKOA 6 meseci nakon prvog IM

Kvantifikacija transkripcije gena *EDN1* urađena je na 35 uzoraka MČPK ispitanika iz kontrole grupe i 69 uzorka MČPK ispitanika sa AKOA 6 meseci nakon prvog IM. Analizom u kompjuterskom programu GraphPad pokazano je da je nivo transkripcije gena *EDN1* statistički značajno povišen u MČPK ispitanika sa AKOA 6 meseci nakon IM, u odnosu na MČPK ispitanika iz kontrole grupe,  $p = 0,03$ ; vrednosti verovatnoće  $p < 0,05$  su smatrane statistički značajnim.

Analizirali smo uticaj *PHACTR1* varijanti pojedinačno i u haplotipu na nivo transkripcije gena *EDN1* u MČPK kod ispitanika sa AKOA 6 meseci nakon prvog IM. Varijante rs9349379, rs2026458 i rs2876300 pojedinačno nisu imale uticaja na transkripciju



gena *EDN1* (rezultati nisu prikazani). Na **Grafiku R7** prikazane su srednje vrednosti  $\Delta Ct$  za svaki haplotip. Nijedan haplotip nije pokazao statistički značajnu asocijaciju sa nivoom transkripcije gena *EDN1*.



**Grafik R7.** Nivo transkripcije gena *EDN1* u mononuklearnim ćelijama periferne krvi (MČPK) u odnosu na haplotipove varijanti gena *PHACTR1*

Kvantifikacija transkripcije gena *EDN1* urađena je na 69 uzorka MČPK ispitanika sa AKOA 6 meseci nakon prvog IM. Na grafiku su rezultati prikazani kao  $1/sv \Delta Ct$ , jer je parameter  $Ct$  obrnuto proporcionalan nivou transkripcije. Nijedan haplotip nije imao značajan uticaj na nivo transkripcije gena *EDN1* u MČPK 6 meseci nakon IM, u odnosu na referentni haplotip GTA. \* - Referentni haplotip; Redosled alela u haplotipovima je sledeći: rs9349379 A/G, rs2026458 C/T i rs2876300 A/G; Haplotipovi GCG i GTG sa frekvencijom  $< 0,05$ , u obe ispitivane grupe, nisu bili uključeni u statističku analizu; vrednosti verovatnoće  $p < 0,05$  su smatrane statistički značajnim.

## 5. DISKUSIJA

Sedam miliona ljudi godišnje umre od posledica kardiovaskularnih bolesti (KVB), podaci su Svetske zdravstvene organizacije, dok daleko više ljudi doživi akutni događaj, a kod skoro svake druge osobe razvija se subklinička, asimptomatska ateroskleroza. Iako su poznati brojni faktori rizika za nastanak, razvoj i komplikacije KVB, kako sredinski, tako i genski, i dalje je smrtnost, kao i broj obolelih izuzetno veliki. Uvođenje procene rizika, za nastanak fatalnih KV događaja u kliničku praksu, na osnovu tradicionalnih faktora rizika (starenje, pol, porodična istorija KVB, krvni pritisak, dijabetes, lipidni i pušački status) [129], svakako je doprinelo smanjenju smrtnosti u poslednjih nekoliko decenija, ali i dalje nijedan genski marker nije uvršćen u standardnu kliničku praksu procene rizika. Mnoga znanja koja su proistekla iz genetičkih istraživanja upotrebljena su u razvoju terapije za KVB, ali njihov potpuni potencijal nije iskorišćen i u svrhu dijagnostike i prevencije. Od 2015. godine izvedeno je više studija [130, 131], koje su upoređivale procenu rizika za nastanak i razvoj koronarne bolesti (KB) na osnovu uobičajenih faktora rizika i na osnovu stepena genetičkog rizika, parametra određenog prema broju genskih varijanti asociranih sa KB [63]. Pokazalo se da je stratifikacija ispitanika prema stepenu genetičkog rizika jednaka, ako ne i efikasnija od stratifikacije na osnovu konvencionalnih metoda procene rizika za KB, ipak rutinska klinička primena još uvek nije preporučena zbog mogućih etničkih razlika jer je većina studija vršena na ispitanicima evropskog porekla, ali i na ispitanicima sa već potvrđenom KB. Prednosti procene stepena genetičkog rizika su da je nezavisan od starosti i uobičajenih faktora rizika i u korelaciji je sa subkliničkom aterosklerozom, a njegovo određivanje je lako dostupno i relativno jeftino [63]. Danas se u kliničkoj praksi terapija uvodi tek kao sekundarna prevencija nakon akutnog događaja, a u budućnosti najviše koristi od procene stepena genetičkog rizika imaće osobe sa procenjenim visokim stepenom genetičkog rizika koje će zato biti uključene u sistem primarne terapijske prevencije, pre nego što potencijalno prežive prvi akutni događaj.

Većina genskih varijanti za koje je utvrđeno da nose deo genetičkog rizika za KB nalaze se u okviru gena čiji je tačan uticaj na KB nepoznat i rasvetljavanje njihovog mehanizma delovanja doprinelo bi znanju o aterosklerozi i uvećalo potencijal za razvijanje novih tretmana i terapija u prevenciji i lečenju KB. Jedan od gena za koji se ne zna tačan mehanizam dejstva, a koji je bio jako asociran sa aterosklerozom koronarnih arterija i IM [81] je *PHACTR1*. U ovoj doktorskoj disertaciji validirana je asocijacija gena *PHACTR1* sa aterosklerozom koronarnih arterija, u srpskoj populaciji, a prvi put ispitivana asocijacija gena *PHACTR1* sa aterosklerozom karotidnih arterija. Kao potencijalni marker rizika za aterosklerozu, gen *PHACTR1* je u ovoj studiji ispitivan kroz tri izabrane genske varijante, a u dva različita tipa tkiva. Dosadašnja istraživanja su otkrila da *PHACTR1* ima uticaj na kardiovaskularni sistem, i u fiziološkom i u patološkom stanju, a naše istraživanje ukazalo je na to da varijante gena *PHACTR1* doprinose razvoju ateroskelroze i utiču na transkripciju gena *PHACTR1* i u tkivu aterosklerotskog plaka i u cirkulaciji.

U ovoj doktorskoj disertaciji odredili smo frekvencije odabranih varijanti gena *PHACTR1*: rs9349379, rs2026458 i rs2876300, u srpskoj populaciji, na uzorku od 310 ispitanika iz kontrolne grupe i konstatovali da su u skladu sa frekvencijama u ostalim

evropskim populacijama. Prema projektu 1000 genoma [124], globalno je alel G genske varijante rs9349379 ređi i njegova frekvencija je 0,38. Ipak distribucija frekvencija između populacija se vrlo razlikuje, tako da je alel A ređi alel u populacijama Istočne Azije, sa frekvencijom 0,31, dok je alel G toliko redak u afričkim populacijama da je skoro na nivou mutacije, sa frekvencijom 0,03. U srpskoj populaciji frekvencija ređeg alela G u kontrolnoj grupi je bila 0,42, što je nešto više u odnosu na prosečnu frekvenciju u evropskim populacijama koja je 0,40. Kod druge dve odabrane varijante distribucija frekvencija nema toliki raspon u svetskim populacijama, a ređi aleli su isti u svim populacijama. Ređi alel genske varijante rs2026458 je alel T i globalno je njegova frekvencija 0,35. U evropskim populacijama frekvencija ređeg alela je 0,47, a dobijeni podaci za srpsku populaciju sa frekvencijom 0,42 bili su nešto niži nego u evropskim populacijama. Ređi alel genske varijante rs2876300 je alel G i globalno je njegova frekvencija 0,17, dok je u evropskim populacijama frekvencija alela G povećana i iznosi 0,30, a vrlo slično je bilo i u srpskoj populaciji, 0,31.

### ***Varijante gena PHACTR1 u aterosklerozi karotidnih arterija***

Prisustvo karotidnog plaka (KP) je jasan znak uznapredovale karotidne ateroskleroze. U zavisnosti od tipa KP, on može biti faktor rizika za pojavu akutnog događaja, mnogo značajniji od povećanog zadebljanja regiona intima - medija (IMT) karotidne arterije [132]. IMT je dobar marker subkliničke ateroskleroze, jer prethodi nastanku plaka, ali se može javiti i nezavisno od aterosklerotskih procesa, npr. sa godinama ili kod obolelih od neaterosklerotskih tipova KVB, dok plak nastaje isključivo putem proaterogenih procesa. U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivali smo povezanost odabranih varijanti gena *PHACTR1* sa prisustvom karotidnog plaka kod ispitanika sa aterosklerozom karotidnih arterija (AKA). Pojedinačno, varijante gena *PHACTR1* nisu pokazale značajnu asocijaciju sa prisustvom KP. Jedino je alel C varijante rs2026458 asociran sa prisustvom KP kod ispitanika sa AKA, ali se značajnost izgubila nakon korekcije zbog višestrukog testiranja, odnosno ispitivanja tri genske varijante. Ipak, haplotipska analiza tri odabrane varijante gena *PHACTR1* dala je značajne rezultate, imajući u vidu da je u ovoj doktorskoj disertaciji prvi put ispitivana asocijacija gena *PHACTR1* sa aterosklerozom karotidnih arterija. Snaga studije je iznosila 80% za asocijaciju haplotipova varijanti gena *PHACTR1* sa prisustvom KP na uzorku od 501 ispitanika sa AKA. Pokazali smo značajnu i nezavisnu asocijaciju haplotipa ACA, varijanti gena *PHACTR1*, sa prisustvom karotidnog plaka u odnosu na referentni haplotip GTA [127]. Rezultat smo korigovali na pol, starost, BMI, hipertenziju i ukupni holesterol, čime smo pokazali da je uticaj haplotipa varijanti gena *PHACTR1* na aterosklerozu karotidnih arterija nezavisan od uobičajenih faktora rizika. Prethodno je pokazan nezavisan uticaj varijante rs9349379 u koronarnim arterijama [78]. Asocirani haplotip ACA sadržao je češće alele sve tri genske varijante, dok prisustvo haplotipa sa sva tri ređa alela, GTG, nije detektovano u ispitivanoj populaciji. Takođe, haplotipovi ATG i GCG, bili su slabo zastupljeni, sa frekvencijom <0,05, zbog čega nisu bili uključeni u statističku obradu rezultata.

Kiando i sar., koji su ispitivali vezu između neaterosklerotskog fenotipa, fibromuskularne displazije (FMD), i varijante rs9349379 gena *PHACTR1*, u studiju su uključili i veliku grupu kontrolnih ispitanika, skoro dve i po hiljade [103]. Utvrdili su značajno povećanje IMT karotidne arterije kod zdravih nosilaca alela A varijante rs9349379, kao i značajno suženje lumena krvnog suda. Kako povećanje IMT prethodi nastanku plaka, ovaj podatak, zajedno sa asocijacijom alela A, u haplotipu ACA, sa prisustvom KP govori u prilog povezanosti varijante rs9349379 sa promenama u zidu karotidne arterije. Promene u zidu krvnih sudova su u sprezi sa endotelnom disfunkcijom, a u nekoliko studija pokazano je da je *PHACTR1* u vezi sa endotelnom disfunkcijom posredstvom uticaja na oksidativni stres i inflamaciju [92, 93]. Jarray i sar., ukazali su na to da je *PHACTR1* preko regulacije funkcije protein fosfataze 1 (PP1), bio uključen u proces produkcije NO [92], glavnog vazodilatatora i medijatora fiziološke funkcije endotela. Pokazali su da je utišavanje transkripcije gena *PHACTR1* u EĆ dovelo do inhibicije fosforilujuće aktivnosti PP1 [95], što je prouzrokovalo nedostatak  $Ca^{2+}$  u ćeliji, jer je njegov unos preko CREB/ $Ca^{2+}$  zavisnog puta bio obustavljen. A pošto su i CREB i eNOS fosforilacija, posredstvom AMPK [92], takođe bile obustavljene, došlo je do smanjene produkcije NO, što dovodi do endotelne disfunkcije. Takođe, metodom utišavanja transkripcije gena *PHACTR1* u EĆ, Zhang i sar. su pokazali da dolazi do smanjenja produkcije NO, ali putem smanjenja fosforilacije p47phox, subjedinice NADPH oksidaze [93]. Pored toga, pokazali su važnu ulogu *PHACTR1* u indukovanju inflamacije izazvane oksidativnim stresom, odnosno prisustvom oksidovanih LDL u EĆ. *PHACTR1* je, zahvaljujući svojim RPEL domenima, učestvovao u MRTF-A posredovanoj translokaciji p65 u jedro, gde p65 indukuje transkripciju NF- $\kappa$ B, potentnog proinflamatornog faktora [93]. Oksidativni stres, endotelna disfunkcija i hronična inflamacija su procesi koji se nalaze u srži nastanka i progresije ateroskleroze, a činjenica da *PHACTR1* ima udela u njima ide u prilog pretpostavci da je *PHACTR1* jedan od sistemskih medijatora ateroskleroze.

Ispitanici sa aterosklerozom karotidnih arterija u ovoj doktorskoj disertaciji su u proseku bili stariji od šezdeset pet godina, sa stenozom >70% i bez simptomatskih događaja u prethodnih šest meseci, što ukazuje na uznapredovalu, ali stabilnu AKA. Ovo je moglo biti jedno od objašnjenja zašto haplotipovi varijanti gena *PHACTR1* nisu pokazali značajnu asocijaciju sa prethodnim CVI i sa ultrasonografski definisanim hipoehogenim tipom karotidnog plaka. Haplotip ACA, asociiran sa prisustvom KP, imao je manju frekvenciju kod ispitanika koji su doživeli CVI u odnosu na one koji nisu, a takođe i kod ispitanika sa hipoehogenim tipom plaka u odnosu na one sa hiperehogenim plakom. Važno je naglasiti da tokom progresije ateroskleroze dolazi do formiranja plakova sa velikim lipidnim jezgrom i tankom fibroznom kapom koji su skloni pucanju (hipoehogeni tip plaka) [16] i izazivanju akutnih događaja (CVI) [24], ali i do stvaranja plakova sa kalcifikacijama koji dovode do visokog stepena stenozе i okluzije krvnog suda. Kalcifikovani plakovi su manje skloni pucanju [133], te je veliki procenat kalcifikovanih plakova, blizu 60%, među našim ispitanicima, bio znak stabilne ateroskleroze. Naši rezultati ukazuju na to da su haplotipovi varijanti gena *PHACTR1* povezani sa hroničnom inflamacijom i napredovanjem ateroskleroze više nego sa akutnim događajima. Ipak, treba napomenuti da je broj ispitanika koji je doživeo CVI u našoj grupi ispitanika sa AKA bio relativno mali, tako da bi istraživanje trebalo sprovesti na većoj grupi ispitanika. Takođe, za definisanje tipa karotidnog plaka korišćena je metoda Dopler ultrasonografije. Iako je podudarnost ultrasonografske procene podtipova karotidnog plaka bila stopostotna sa postoperativnim nalazom, uvođenjem kontrastne ultrasonografije ili dinamičke kontrastne

magnetne rezonance [134, 135], mogli bi se sagledati dodatni aspekti aterosklerotskih lezija, npr. prisutnost i razvijenost procesa neovaskularizacije. To bi doprinelo finijem i preciznijem definisanju plaka koji je potencijalno podložan pucanju [136].

Proces neovaskularizacije koristi iste mehanizme kao proces angiogeneze. Okidač za neovaskularizaciju je hipoksija koja aktivira VEGF, a Jarray i sar., ukazali su da VEGF indukuje povećanje transkripcije gena *PHACTR1*, i da je *PHACTR1* uključen u formiranje vaskularnih tubula [94]. Pokazali su da je utišavanje transkripcije gena *PHACTR1* vodilo obustavljanju formiranja tubula krvnih sudova putem apoptoze [94]. Proces neovaskularizacije često je neusklađen i nedovoljno regulisan, te vodi formiranju defektnih krvnih sudova. Na taj način može doći do krvarenja unutar plaka, koje je faktor nestabilnosti, jer omogućava ulazak dodatnih inflamatornih ćelija i akumulaciju lipida u plaku. Neovaskularizacija, takođe, omogućava kalcifikaciju [136], jer novi krvni sudovi mogu da posluže kao potpora osteoprogenitoskim ćelijama čija diferencijacija je pod uticajem citokina i angiogenih faktora, kao što je VEGF. Periciti, ćelije koje su odgovorne za sazrevanje i stabilnost krvnih sudova, takođe mogu da se diferenciraju u osteoprogenitorske ćelije, predvodnike procesa kalcifikacije. Pokazano je da su kalcifikacije bile prisutne samo na mestima obilne neovaskularizacije [137]. Pored učešća u procesu neovaskularizacije, pokazana je i direktna veza *PHACTR1* sa procesom kalcifikacije. Naime, Aherrahrou i sar., su uvideli da je pod uticajem kalcifikacije rastao nivo transkripcije gena *PHACTR1* u GMĆ aorte [76]. Dakle, *PHACTR1* bi mogao, kroz svoju angažovanost u procesima neovaskularizacije i kalcifikacije, da doprinosi razvoju uznapredovalog aterosklerotskog plaka, a samim tim i opštoj progresiji ateroskleroze.

Ispitujući uticaj varijanti gena *PHACTR1* na nivo njegove transkripcije u karotidnom plaku, pokazali smo asocijaciju haplotipa ACG sa značajno povišenom transkripcijom gena *PHACTR1* u karotidnom plaku, u poređenju sa referentnim haplotipom GTA [127]. Isti haplotip, ACG, asociirali smo sa povišenim nivoom transkripcije gena *PHACTR1* i u mononuklearnim ćelijama periferne krvi (MČPK) ispitanika sa aterosklerozom kornarnih arterija (AKOA) šest meseci nakon IM [128]. Ova saznanja u skladu su sa podacima GTE<sub>x</sub> projekta [107], prema kojima svaki od alela u haplotipu ACG pojedinačno dovodi do povećanja nivoa transkripcije gena *PHACTR1* u aorti i tibijalnoj arteriji. Nekoliko studija je do sada ispitalo transkripciju gena *PHACTR1* i uticaj genskih varijanti na nju, ali nijedna nije ispitala uticaj haplotipova na nivo iRNK *PHACTR1*. Beaudoin i sar., pokazali su da je varijanta rs9349379 eQTL za gen *PHACTR1* u koronarnim arterijama [78], a pretpostavljeni mehanizam delovanja je bio da ređi alel G narušava mesto vezivanja transkripcionog faktora MEF2A (eng. *myocyte enhancer factor 2A*) čime bi dovodio do smanjenja transkripcije gena *PHACTR1* [78]. Transkripcioni faktor MEF2A [138] uključen je u rani razvoj kardiovaskularnog sistema kroz procese proliferacije ćelija, diferencijacije mišića i apoptoze. Vrlo visok nivo MEF2A bio je prisutan u endotelskim i glatkim mišićnim ćelijama arterija, a neke varijante gena *MEF2A* povezivane su sa KB [139]. Ipak, zbog izrazite konzerviranosti četiri proteina familije transkripcionih faktora MEF2, Beaudoin i sar., nisu mogli sa potpunom sigurnošću da utvrde da li se za mesto na DNK na kome se nalazi varijanta rs9349379 vezuje samo MEF2A ili i MEF2C [78]. Takođe, u još jednoj studiji koja je rađena na kulturi ćelija humanih fibroblasta je pokazano da češći alel A genske varijante rs9349379 povećava transkripciju gena *PHACTR1* [103].

Pošto smo prethodno haplotip ACA asociirali sa prisustvom karotidnog plaka, a haplotip ACG sa povišenom transkripcijom gena *PHACTR1* u karotidnom plaku, uradili smo dodatnu analizu u kojoj smo ispitali da li aleli A i G treće ispitivane varijante

rs2876300 menjaju uticaj haplotipa AC, koga čine češći aleli genskih varijanti rs9349379 i rs2026458, na nivo transkripcije gena *PHACTR1*. Pokazali smo da je transkripcija gena *PHACTR1* značajno smanjena kod haplotipa ACA u odnosu na haplotip ACG. Kako se varijanta rs2876300 nalazi u okviru genskog pojačivača transkripcije (eng. *gene enhancer*, GH), to može značiti da ona ima uticaj na regulaciju transkripcije, bilo preko interakcije sa hromatinom ili izmenom vezujućeg mesta transkripcionih faktora. GH06J012893, pojačivač transkripcije u okviru kojeg se nalazi varijanta rs2876300, u mogućnosti je da veže dvadeset četiri transkripcionih faktora i da učestvuje u regulaciji pet gena, uključujući gen *PHACTR1* [140]. Osim varijante rs2876300, i genska varijanta rs9349379 nalazi se u okviru pojačivača transkripcije, GH06J012903, koji reguliše transkripciju šest gena. U okviru ENCODE projekta su ispitali četiri uzorka tkiva aorte [141], i pokazali da u hromatinu na mestu varijante rs9349379 postoji acetilacija lizina 27 na histonu 3 (H3K27ac), što je epigenetsko obeležje aktivnog pojačivača transkripcije. Od svih gena čiju transkripciju su u mogućnosti da regulišu dva pomenuta pojačivača transkripcije, jedino je *PHACTR1* protein-kodirajući gen, što dodatno ukazuje na to da on jeste gen preko kojeg su varijante u lokusu 6p24 povezane sa aterosklerozom. Ostali geni, čiju transkripciju potencijalno mogu da regulišu, kodiraju mikroRNK (miRNK) i dugačke nekodirajuće RNK (eng. *long non-coding RNA*, lncRNA). Imajući u vidu da su miRNK i lncRNK značajni regulatorni faktori, nije isključeno da bi ispitivane varijante mogle preko njih da utiču na kardiovaskularni sistem. Istraživanja bi se na dalje mogla kretati u pravcu ispitivanja uticaja varijanti gena *PHACTR1* na pomenute miRNK i lncRNK, kao obećavajućim markerima u dijagnostici i terapiji bolesti.

Zhang i sar., su jedini do sada uporedili nivo transkripcije gena *PHACTR1* u zdravim karotidnim arterijama i karotidnim arterijama sa prisustvom plaka [93]. Iako na malom uzorku (3 vs. 3), pokazali su da je u obolelim karotidnim arterijama bio povišen nivo iRNK *PHACTR1*. Nivo proteina *PHACTR1* takođe je bio povišen u plaku, a najviše je bio prisutan u endotelskim ćelijama [93]. Kasikara i sar., su u najnovijoj studiji o *PHACTR1* pokazali da je nivo iRNK *PHACTR1* bio najviši u makrofagima i monocitima [98] u odnosu na ostale ćelije prisutne u plaku karotidne arterije. Kasikara i sar., su u makrofagima detektovali proteine *PHACTR1* koji potiču i sa dugačkog transkripta, za koji se do sada smatralo da se može naći samo u mozgu [79, 80]. Pokazali su da alel G, ređi alel varijante rs9349379 gena *PHACTR1*, dovodi do smanjenja nivoa dugačkog transkripta u makrofagima, a ne utiče na ostale transkripte [98]. Ova tvrdnja je u suprotnosti sa dosadašnjim istraživanjima, budući da su Reschen i sar., pokazali da isti alel dovodi do smanjenja nivoa kratkog transkripta, koji se jedini i može detektovati u makrofagima [79], dok su Codina-Fauteux i sar., pored kratkog detektovali i jedan transkript srednje dužine [80]. U ovoj doktorskoj disertaciji odabrali smo esej koji je u mogućnosti da detektuje sve transkripte gena *PHACTR1*, osim kratkog transkripta. Podaci iz literature [79, 80] ukazivali su na to da su detektovani transkripti srednje dužine, ipak nismo mogli da isključimo mogućnost da je detektovan i dugački transkript. A nova istraživanja [98] potvrdila su tu mogućnost, pokazujući da je polje transkriptomike gena *PHACTR1* još nedovoljno ispitano i da zahteva detaljnija istraživanja.

## *Varijante gena PHACTR1 u aterosklerozi koronarnih arterija*

Gen *PHACTR1* je bio asociran sa infarktom miokarda u GWA studijama i validacionim studijama koje su usledile ipak, u studiji na srpskoj populaciji, nismo validirali asocijaciju varijanti u genu *PHACTR1* sa IM ni pojedinačno ni u haplotipu. Gen *PHACTR1* je prvobitno bio povezan sa KVB preko varijante rs12526453 u GWA studiji na ispitanicima sa ranim IM [81]. Kasnije se varijanta rs9349379 istakla kao najznačajnija u *PHACTR1* lokusu i bila je asocirana sa IM u studiji koja je obuhvatila sedam hiljada ispitanika evropskog porekla [84], uključujući i ispitanike iz studije sa ranim IM [81]. Opsežna studija Beaudoin i sar., na preko hiljadu ispitanika koji su doživeli IM definitivno je potvrdila da je varijanta rs9349379 bila jače asocirana sa IM nego varijanta rs12526453 [78]. Mora se istaći da je kriterijum za učešće u navedenim studijama bio manje specifičan po pitanju tipa infarkta miokarda od kriterijuma u našem istraživanju u kojem su učestvovali samo ispitanici sa prvim IM i to isključivo kao posledicom ishemijske bolesti srca. Strožiji odabir ispitanika i njihov relativno mali broj mogli bi biti glavni faktori koji su uticali na rezultat vezan za nepostojanje povezanosti varijanti u genu *PHACTR1* sa IM u ovoj studiji. Međutim, važno je istaći da su naši rezultati u skladu sa GWA studijom CHARGE konzorcijuma u kojoj nije pokazana asocijacija gena *PHACTR1* ni sa IM ni sa KB [142], naročito jer je u pitanju bila prospektivna studija u kojoj je jedan fenotip od interesa bio prvi IM. Na početku ove studije dvadeset četiri hiljade ispitanika bilo je bez KB i IM, a nakon u proseku osam godina, 10% ispitanika razvilo je KB, a više od 6% doživelo je IM. Ni u jednoj od ovih grupa ispitanika nije pokazana asocijacija sa genskom varijantom iz *PHACTR1* lokusa [142]. U našoj studiji je frekvencija ređeg alela G varijante rs9349379 u kontrolnoj grupi (0,42) nešto viša u odnosu na frekvenciju u evropskim populacijama (0,40) što bi moglo biti od značaja u asocijacionim studijama, pogotovo imajući u vidu da je povezanost rs9349379 gena *PHACTR1* sa IM postignuta na jako velikom broju ispitanika [84] gde, u statističkom smislu, razlika u frekvenciji alela od samo nekoliko procenata može uticati na rezultat i dostići predviđenu značajnost.

U ovoj doktorskoj disertaciji, asocirali smo ređi alel G varijante rs2876300 gena *PHACTR1* sa višesudovnom bolešću (VSB) srca [128], koja predstavlja teži oblik bolesti, jer je povezana sa većom smrtnošću u odnosu na jednosudovnu bolest (JSB) [143]. Snaga studije je bila 61% za asocijaciju varijante gena *PHACTR1* sa VSB na uzorku od 490 ispitanika sa AKOA. Slična asocijacija pokazana je u libanskoj populaciji između varijanti u genu *PHACTR1* i broja krvnih sudova sa stenozom [144], gde je jačina asocijacije rasla sa brojem krvnih sudova koji su imali stenozu. VSB je važan faktor u proceni odabira tretmana za obolelog [145], pogotovu kod obolelih sa STEMI IM, kod kojih blizu polovine obolelih ima VSB. Većina ispitanika u našoj studiji, blizu 90%, je imala STEMI IM, a preko 50% ispitanika imalo je VSB. Rasprave na temu odabira najbolje metode revaskularizacije, kod obolelih od VSB, još uvek su otvorene, tako da bi identifikovanje genskih markera asociranih sa parametrima težine bolesti doprinelo odgovoru na aktuelna pitanja u ovoj oblasti. Varijante u genu *PHACTR1*, rs9349379 i rs2026458, asocirane su sa još jednim dobro poznatim faktorom rizika za razvoj uznapredovale ateroskleroze, sa kalcifikacijom koronarnih arterija (KKA) [84]. Pechlivanis i sar., potvrdili su asocijaciju ovih varijanti gena *PHACTR1* sa stepenom KKA, a dodatno su gensku varijantu rs9349379 povezali i sa prisustvom kalcifikacije [85]. Takođe je genska varijanta rs9349379 bila asocirana sa stepenom KKA, u multietničkoj studiji koja je ispitivala parametre subkliničke ateroskleroze [146]. Varijanta je bila asocirana sa prisustvom i sa stepenom KKA samo kod

ispitanika evropskog porekla, ali ne i kod ispitanika afro-američkog, hispano i kineskog porekla. Asocijacija varijanti u genu *PHACTR1* sa kalcifikacijom koronarnih arterija i sa višesudovnom bolešću, kandiduje ih za potencijalne modifikatore toka bolesti i faktore rizika za razvoj koronarne bolesti. Moguće je da upravo preko sistemske stenoze i kalcifikacije gen *PHACTR1* posredno utiče na IM i koronarnu bolest.

U prilog našoj pretpostavci da varijante u genu *PHACTR1* vode uznapređovalom obliku bolesti govori i pokazana značajna asocijacija haplotipova varijanti gena *PHACTR1* sa vrednostima SYNTAX skora (SS) koji je indikator težine koronarne bolesti. SYNTAX skor koristi se za procenu postoperativnog toka bolesti i ima veliku ulogu u odabiru metode revaskularizacije kod obolelih od VSB. Za sada su, u kliničkoj praksi, vrednosti SS  $\geq 22$ , uz prisustvo dijabetesa, kod obolelih od VSB dovoljni za odluku da metod revaskularizacije bude ugradnja grafta, umesto perkutane koronarne intervencije (PCI) [119]. Što se tiče obolelih sa nižim vrednostima SS, pitanje tretmana i dalje je bez adekvatne i jasne preporuke. Potrebno je izvagati dobrobit i rizike između PCI, rutinske metode gde postoji rizik od ponovnog IM i ugradnje grafta, zahtevnije metode tokom koje postoji rizik od CVI. Uvođenje procene genetičkog rizika u kliničku praksu doprinelo bi individualizaciji pristupa u odabiru tretmana obolelih od VSB i uopšte u lečenju KB i ateroskleroze. Haplotipovi AT i GC, varijanti rs9349379 i rs2026458, gena *PHACTR1* pokazali su značajan homogeni efekat u asocijaciji sa SS, u smislu istog smera i jačine asocijacije sa ovim parametrom. Asocirani haplotipovi su kombinacija češćih i ređih alela ispitivane dve varijante gena *PHACTR1*, što je ukazalo na to da su te dve heterozigotne kombinacije nosioci rizika za uznapređovali oblik KB. Varijante gena *PHACTR1* asocirane su i sa kalcifikacijom koronarnih arterija i sa višesudovnom bolešću, koje su bitni parametri pri izračunavanju SS, te se na osnovu ovih asocijacija posredno može sugerisati da varijante gena *PHACTR1* doprinose razvoju uznapređovale ateroskleroze. Imajući u vidu da je većina ispitanika u našem istraživanju preživela akutni događaj, a da nismo pokazali asocijaciju varijanti u genu *PHACTR1* sa akutnim aterosklerotskim događajima, ali jesmo sa vešesudovnom bolešću, kao i sa prisustvom karotidnog plaka, možemo reći da su varijante u genu *PHACTR1* značajne za razvoj i progresiju ateroskleroze.

Nakon IM dolazi do procesa remodelovanja tkiva, koji je u prvoj fazi protektivan proces, ali ako se produži može dovesti do hroničnog narušavanja strukture i funkcije srca. U ranoj fazi se uklanjaju ostaci kardiomiocita, a stvaraju nove komponente VCM kao potpora formiranju ožiljnog tkiva na mestu ishemijske povrede srca. U pokušaju da se nadomesti narušena struktura i funkcija srca, dolazi do hipertrofije preživelih kardiomiocita i dilatacije leve komore. Ukoliko se proces remodelovanja prolongira, on postaje maladaptivan, a posledica su hronične srčane tegobe i srčana insuficijencija. U našem istraživanju deo ispitanika sa AKOA smo prospektivno pratili šest meseci nakon IM sa ciljem da se ispita uticaj varijanti gena *PHACTR1* na proces remodelovanja leve komore srca. Ispitali smo razliku u vrednostima ehokardiografskih parametara strukture i funkcije srca na prijemu (3-5 dana nakon IM) i na kontrolnom pregledu šest meseci nakon IM. Odabrali smo trinaest ehokardiografskih parametara koji opisuju stanje srca nakon ishemijske povrede i proces remodelovanja, a koriste se i za praćenje oporavka srca i predikciju budućih događaja. Ejekciona frakcija glavni je pokazatelj sistolne funkcije leve komore srca zajedno sa udarnim volumenom [147], dok su deformiteti miokarda, koji mogu biti radijalni, longitudinalni i cirkumferentni, značajni parametri određivanja sistolne funkcije kod ispitanika sa očuvanom ejekcionom frakcijom [148]. Dimenzije srca, opisane masom, volumenom i dijametrima u sistoli i diastoli srca, standardni su parametri koji se koriste u dijagnostičke i prognostičke svrhe [149]. Nijedan haplotip



izabranih varijanti u genu *PHACTR1* nije pokazao statistički značajanu asocijaciju sa promenama u ovim parametrima tokom šest meseci, u odnosu na referentni haplotip. Naši rezultati su u skladu sa do sada jedinim dostupnim istraživanjem objavljenim u literaturi [96]. Naime, ispitivana je asocijacija varijante rs12526453 gena *PHACTR1*, a koja nije analizirana u našoj studiji, sa ehokardiografskim parametrima strukture i funkcije srca između ispitanika sa poremećenom dijastolnom funkcijom srca i zdravih ispitanika [96] i pokazalo se da ova varijanta gena *PHACTR1* nema značajan efekat na dijastolnu funkciju srca. U istoj studiji je, na animalnom modelu, pokazano da ni povišen nivo iRNK *PHACTR1* ne utiče na ehokardiografske parametre strukture i funkcije leve komore srca pacova u periodu od dve nedelje nakon indukovanog IM.

Jedna trećina naših ispitanika razvila je maladaptivno remodelovanje šest meseci nakon IM. Analizirali smo da li haplotipovi varijanti gena *PHACTR1* imaju uticaj na razvoj maladaptivnog remodelovanja, međutim pokazalo se da, u odnosu na referentni haplotip, nijedan haplotip nije statistički značajno asociiran sa ovim fenotipom. Dosadašnja istraživanja pokazala su da gen *PHACTR1* posredno utiče na funkciju enzima metaloproteinaza matriksa (MMP) [92], koji su ključni regulatori homeostaze vanćelijskog matriksa (VĆM) i samim tim učestvuju u procesu remodelovanja. U ćelijama u kojima je u potpunosti bila utišana transkripcija gena *PHACTR1*, Jarray i sar., su primetili da je nivo tkivnih inhibitora MMP (TIMP 1 i 2) bio povišen. Inhibicijom enzima MMP zaustavlja se razgradnja VĆM, a u procesu remodelovanja to znači da dolazi do fibroze srčanog tkiva. Ovaj podatak, dodatno uz uticaj gena *PHACTR1* na strukturu aktinskih filamenata u srčanom tkivu [95, 96], dao je osnov za istraživanje gena *PHACTR1* u procesu remodelovanja, međutim za sada se pokazalo da gen *PHACTR1* nema značajan uticaj na proces oporavka srca nakon IM. Ipak treba uzeti u obzir relativno mali broj ispitanika koji je učestvovao u prospektivnom delu naše studije, kao i da bi naši rezultati na većem broju ispitanika dali precizniju procenu potencijalne povezanosti ovog gena sa procesom remodelovanja LK srca.

Kao što je već napomenuto, haplotip ACG smo asociirali sa povišenim nivoom transkripcije gena *PHACTR1* u mononuklearnim ćelijama periferne krvi (MĆPK) ispitanika sa AKOA šest meseci nakon IM [128]. Pored toga, pokazali smo da je nivo transkripcije gena *PHACTR1* bio značajno povišen u MĆPK ispitanika sa AKOA šest meseci nakon IM u odnosu na nivo transkripcije gena *PHACTR1* u MĆPK kontrolne grupe ispitanika [128]. Ovaj rezultat pokazao je da je povišen nivo iRNK *PHACTR1* bio prisutan u cirkulaciji čak i šest meseci nakon akutnog događaja, što je ukazalo na potencijalnu kontinuiranu ulogu *PHACTR1* u hroničnoj vaskularnoj inflamaciji i progresiji ateroskleroze. Naši rezultati su u skladu sa studijom koja je ukazala da postoji razlika u nivou transkripcije gena *PHACTR1* između ispitanika koji u istoriji bolesti imaju IM i kontrolnih ispitanika [150]. Nedavno su Li i sar., na uzorku od devedeset ispitanika sa IM i trideset zdravih ispitanika, pokazali da je nivo iRNK *PHACTR1* bio povišen u cirkulišućim monocitima ispitanika sa IM [97]. Takođe su pokazali da se nivo iRNK *PHACTR1* u monocitima povećavao sa progresijom ateroskleroze, kao i da je nivo iRNK *PHACTR1* u monocitima rastao sa brojem obolelih sudova, a bio je povišen i u monocitima ispitanika sa plakovima bogatim lipidima i prisutnom tankom fibroznom kapom. U daljim istraživanjima na *PHACTR1*<sup>-/-</sup> miševima, zaključili su da je odsustvo gena *PHACTR1* vodilo ubrzanoj progresiji ateroskleroze [97]. Došlo je do povećanja sadržaja lipida i do ekspanzije makrofaga pro-inflamatornog fenotipa, M1, što se ogleda u prikazivanju markera TNF- $\alpha$ , IL-6 i iNOS, a smanjenju broja anti-inflamatornih makrofaga, M2, čiji su markeri Arg-1, IL-10 and CD206. Ova izmena u fenotipu makrofaga bila je prisutna i kod

ispitanika sa IM u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika. Pretpostavka je bila da *PHACTR1* utiče na MAPK ili CREB signalne puteve koji su regulatori polarizacije makrofaga i formiranja penastih ćelija [97]. Kasikara i sar., pokazali su da je nivo iRNK *PHACTR1* u aterosklerotskoj leziji najviši u makrofagima anti-inflamatornog fenotipa [98]. Njihovo istraživanje je pokazalo da je smanjenje transkripcije gena *PHACTR1*, kao posledica ređeg alela G varijante rs9349379, dovodilo do defekta u procesu eferocitoze [98]. Pošto je translokacija PP1 u jedro, posredstvom *PHACTR1*, bila smanjena, pojačavala se defosforilacija lakog lanca miozina, koji učestvuje u organizaciji citoskleta pri fagocitozi. Novija istraživanja [97, 98] ukazala su na to da *PHACTR1* ima ulogu u aterosklerotskim procesima i u makrofagima koji potiču od monocita, a ne samo u endotelskim ćelijama.

Mnoge studije na animalnim modelima i kulturama ćelija pokazale su da je nivo transkripcije gena *PHACTR1* bio povišen u uslovima poremećene vaskularne homeostaze. Studija Erbilgin i sar., na miševima, pokazala je da je nivo iRNK *PHACTR1* u aterosklerotskim lezijama aorte i mišijim endotelskim ćelijama aorte bio povišen [77]. Takođe, u odgovoru na indukovanu kalcifikaciju nivo iRNK *PHACTR1* povećavao se u mišijim GMC, kao i u kulturi humanih GMC aorte [76], dok je u makrofagima i humanim endotelskim ćelijama dolazilo do povećanja nivoa iRNK *PHACTR1* pod uticajem oksidovanih lipida i inflamatornih stimulusa, kao glavnih okidača razvoja procesa ateroskleroze [79, 93]. Samo je u studiji Kelloniemi i sar., pokazano smanjenje nivoa iRNK *PHACTR1* kod pacova nakon indukovanog IM [96], pri čemu se nivo vratio na kontrolni posle dve nedelje. Ipak, isti autori, uvideli su povećanje nivoa proteina *PHACTR1* u tkivu srca kod obolelih od kardiomiopatije u poređenju sa kontrolnom grupom. Iako je broj uzoraka bio mali (4 vs. 2) i rezultat se nije odnosio na iRNK, možemo reći da se u većini studija došlo do zaključka da u patološkim uslovima dolazi do povećanja nivoa transkripcije gena *PHACTR1*. Naš rezultat potkrepio je ovu tvrdnju na uzorcima mononuklearnih ćelija periferne krvi ispitanika sa KB šest meseci nakon IM.

Gupta i sar., predložili su mehanizam delovanja preko koga bi varijanta rs9349379 mogla biti povezana sa koronarnom bolešću. Taj put delovanja je podrazumevao uticaj ove varijante na gen endotelin 1 (*EDN1*) [89], a ne na gen *PHACTR1*. Gen *EDN1* lociran je kao i *PHACTR1* na hromozomu 6p24.1, a studija Gupta i sar., jedina je do sada pokazala da varijanta rs9349379 utiče na transkripciju gena *EDN1* i da ne utiče na transkripciju gena *PHACTR1*. Predloženi mehanizam [89] podrazumevao bi povećanje transkripcije gena *EDN1* preko ređeg alela G varijante rs9349379 i posledično povećanje nivoa proteina *EDN1*. Vezivanje proteina *EDN1* za receptor *EDN1<sub>A</sub>* na vaskularnim endotelnim ćelijama dovodi do vazokonstrukcije, proliferacije, produkcije VCM i fibroze, što su sve procesi koji doprinose razvoju ateroskleroze. I zaista nivo transkripcije gena *EDN1*, kao i gena *PHACTR1*, jeste bio značajno povišen kod ispitanika sa IM u našoj studiji, u odnosu na kontrolnu grupu, ali ispitivane varijante u genu *PHACTR1* nisu bile asociirane sa nivoom iRNK *EDN1* [128]. Prema Gupta i sar., genotip AA varijante rs9349379 bio je asociiran sa smanjenom transkripcijom gena *EDN1*. Ipak, na našim uzorcima, kao i u još nekoliko studija [78, 109], varijanta rs9349379 nije imala statistički značajan uticaj na transkripciju gena *EDN1*, u MČPK ispitanika sa IM, ni pojedinačno ni u haplotipu sa genskim varijantama rs2026458 i rs2876300 [128]. Podaci iz GTE<sub>x</sub> projekta [107] ukazuju na to da je varijanta rs9349379 tkivno-specifični eQTL za gen *PHACTR1* u aorti, tibijalnoj i koronarnoj arteriji, ali ne i za gen *EDN1*. Beaudoin i sar., prvi su pokazali da je varijanta rs9349379 eQTL za gen *PHACTR1* u koronarnim arterijama i da ne utiče na transkripciju gena *EDN1* i još sedam gena koji se nalaze na udaljenosti od 1Mb oko ove varijante [78]. Wang i Musunuru replicirali su eksperiment Gupta i sar., koristeći isti tip ćelija - humane

vaskularne endotelne ćelije i istu metodu - CRISPR/Cas9 i nisu dobili isti rezultat [109], nego je i njihovo istraživanje još jedna potvrda da je varijanta rs9349379 eQTL za gen *PHACTR1*. Gen *EDN1* udaljen je 600 Kb od varijante rs9349379, što ne predstavlja prepreku, jer se različitim hromatinskim rearanžmanima udaljeni regioni mogu dovesti u vrlo blizak položaj. Ipak prema sprovedenim istraživanjima Gupta i sar., u ovom slučaju je to izuzetno malo verovatno, te je predloženo da do kontakta može doći posredno preko regiona pojačivača transkripcije koji se nalazi na pola puta između varijante rs9349379 i gena *EDN1* [89]. Za dokazivanje ovakve pretpostavke o regulaciji gena *EDN1* preko varijante rs9349379 potrebno je još istraživanja. Naš rezultat u skladu je sa većinom studija koje govore u prilog uzročnoj vezi varijante rs9349379 i gena *PHACTR1*, i ukazao je na to da varijanta rs9349379 ne utiče na transkripciju gena *EDN1* ni u cirkulaciji [128].

Rezultate dobijene u ovoj doktorskoj disertaciji trebalo bi potvrditi i istraživanje proširiti na veći broj ispitanika sa IM, kao i uzoraka tkiva karotidnog plaka, što bi pojačalo snagu studije. Broj prospektivno praćenih ispitanika bio je relativno mali i njegovo povećanje svakako bi doprinelo izučavanju procesa remodelovanja srca kroz uticaj gena *PHACTR1* na ehokardiografske parametre strukture i funkcije srca. Dodatno, prikupljanje uzoraka zdravog tkiva karotidne arterije i ispitivanje relativnog nivoa transkripcije gena *PHACTR1* u njima omogućilo bi poređenje sa našim rezultatima vezanim za karotidni plak. Validacija naših rezultata na drugim populacijama doprinela bi utvrđivanju asocijacije gena *PHACTR1* sa aterosklerozom. Bilo bi od značaja za izučavanje ateroskleroze, kao inflamatorne bolesti, kada bi se u istraživanje uključio i kratki transkript gena *PHACTR1*, budući da je on identifikovan isključivo u imunskim ćelijama. Takođe bi bilo značajno identifikovati prisustvo različitih transkripta gena *PHACTR1* u ispitivanim tkivima, kao i uticaj odabranih genskih varijanti na njih. Potvrđivanje uticaja haplotipova ispitivanih genskih varijanti i na proteinskom nivou doprinelo bi upoznavanju mehanizma delovanja *PHACTR1* u kardiovaskularnom sistemu. Kao i istraživanje odnosa *PHACTR1* sa drugim genima i proteinima sa kojima je umrežen. Proširivanje istraživanja genske regulacije *PHACTR1* na polje nekodirajućih elemenata, kao što su miRNK i lncRNK, moglo bi da bude perspektivno i značajno za buduću personalizaciju medicine.

Naši rezultati ukazuju na to da gen *PHACTR1* doprinosi razvoju ateroskleroze i njenih komplikacija, ali nije direktno povezan sa akutnim događajima u aterosklerozi, ni sa procesom remodelovanja srca nakon IM. Gen *PHACTR1* ima ulogu u aterosklerozi u humanim tkivima, budući da smo uvideli da je nivo transkripcije gena *PHACTR1* povišen šest meseci nakon IM i da haplotipovi genskih varijanti rs9349379, rs2026458 i rs2876300 utiču na nivo transkripcije gena *PHACTR1* u karotidnom plaku, dakle direktno na mestu razvoja ateroskleroze, ali i u cirkulaciji, u mononuklearnim ćelijama periferne krvi.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Haplotip ACA, varijanti rs9349379, rs2026458 i rs2876300, gena *PHACTR1* značajno i nezavisno je asociran sa prisustvom karotidnog plaka u odnosu na referentni haplotip GTA.
2. Ispitivane varijante gena *PHACTR1* nisu asocirane sa akutnim događajima u aterosklerozi (infarktom miokarda i cerebrovaskularnim insultom), ni pojedinačno ni u haplotipu.
3. Ređi alel G, varijante rs2876300, gena *PHACTR1* asociran je sa višesudovnom bolesšću srca, odnosno težim oblikom ateroskleroze koronarnih arterija.
4. Haplotipovi AT i GC, varijanti rs9349379 i rs2026458 gena *PHACTR1* pokazuju značajan homogeni efekat i nezavisnu asocijaciju sa višim vrednostima SYNTAX skora, odnosno lošijom prognozom kod ispitanika sa AKOA nakon perkutane koronarne intervencije.
5. Haplotipovi ispitivanih varijanti gena *PHACTR1* nisu asocirani sa promenama u ehokardiografskim parametrima strukture i funkcije srca, niti sa maladaptivnim remodelovanjem leve komore srca 6 meseci nakon infarka miokarda.
6. Haplotip ACG, varijanti rs9349379, rs2026458 i rs2876300, gena *PHACTR1* povezan je sa značajno višim nivoom transkripcije gena *PHACTR1* u karotidnom plaku, kao i u mononuklearnim ćelijama periferne krvi kod ispitanika sa AKOA šest meseci nakon prvog IM, u odnosu na referentni haplotip GTA.
7. Nivo transkripcije gena *PHACTR1* i *EDN1* u MĆPK kod ispitanika sa AKOA šest meseci nakon IM značajno je povišen u odnosu na ispitanike iz kontrolne grupe.
8. Ispitivane varijante gena *PHACTR1* nemaju značajan uticaj na transkripciju gena *EDN1* u MĆPK kod ispitanika sa AKOA šest meseci nakon IM.

## 7. LITERATURA

1. Peace A, Van Mil A, Jones H, Thijssen DHJ. Similarities and Differences Between Carotid Artery and Coronary Artery Function. *Curr Cardiol Rev.* 2018;14(4):254-63.
2. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation.* 2007;115(10):1285-95.
3. Gimbrone MA, Jr., García-Cardeña G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;118(4):620-36.
4. Davies PF. Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2009;6(1):16-26.
5. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res.* 2014;114(12):1852-66.
6. 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.
7. Badimon L, Padró T, Vilahur G. Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care.* 2012;1(1):60-74.
8. Gradinaru D, Borsa C, Ionescu C, Prada GI. Oxidized LDL and NO synthesis--Biomarkers of endothelial dysfunction and ageing. *Mech Ageing Dev.* 2015;151:101-13.
9. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340(2):115-26.
10. Leitinger N, Schulman IG. Phenotypic polarization of macrophages in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(6):1120-6.
11. Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, et al. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2019;5(1):019-0106.
12. Doran AC, Meller N, McNamara CA. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(5):812-9.
13. Schrijvers DM, De Meyer GR, Kockx MM, Herman AG, Martinet W. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(6):1256-61.
14. Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(1):36-46.
15. Badimon JJ, Lettino M, Toschi V, Fuster V, Berrozpe M, Chesebro JH, et al. Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques: effects of tissue factor pathway inhibitor on plaque thrombogenicity under flow conditions. *Circulation.* 1999;99(14):1780-7.
16. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(5):1262-75.
17. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000;407(6801):233-41.
18. Nicoll R, Henein MY. Arterial calcification: friend or foe? *Int J Cardiol.* 2013;167(2):322-7.
19. Ehara S, Kobayashi Y, Yoshiyama M, Shimada K, Shimada Y, Fukuda D, et al. Spotty calcification typifies the culprit plaque in patients with acute myocardial infarction: an intravascular ultrasound study. *Circulation.* 2004;110(22):3424-9.
20. Shi X, Gao J, Lv Q, Cai H, Wang F, Ye R, et al. Calcification in Atherosclerotic Plaque Vulnerability: Friend or Foe? *Front Physiol.* 2020;11(56).
21. Ibrahim P, Jashari F, Nicoll R, Bajraktari G, Wester P, Henein MY. Coronary and carotid atherosclerosis: how useful is the imaging? *Atherosclerosis.* 2013;231(2):323-33.
22. Hellings WE, Peeters W, Moll FL, Piers SR, van Setten J, Van der Spek PJ, et al. Composition of carotid atherosclerotic plaque is associated with cardiovascular outcome: a prognostic study. *Circulation.* 2010;121(17):1941-50.

23. Schaar JA, Muller JE, Falk E, Virmani R, Fuster V, Serruys PW, et al. Terminology for high-risk and vulnerable coronary artery plaques. Report of a meeting on the vulnerable plaque, June 17 and 18, 2003, Santorini, Greece. *Eur Heart J*. 2004;25(12):1077-82.
24. Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the vulnerable plaque. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47(8 Suppl):065.
25. Jia H, Abtahian F, Aguirre AD, Lee S, Chia S, Lowe H, et al. In vivo diagnosis of plaque erosion and calcified nodule in patients with acute coronary syndrome by intravascular optical coherence tomography. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(19):1748-58.
26. Varnava AM, Mills PG, Davies MJ. Relationship between coronary artery remodeling and plaque vulnerability. *Circulation*. 2002;105(8):939-43.
27. Burke AP, Kolodgie FD, Farb A, Weber D, Virmani R. Morphological predictors of arterial remodeling in coronary atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105(3):297-303.
28. Arbab-Zadeh A, Fuster V. The myth of the "vulnerable plaque": transitioning from a focus on individual lesions to atherosclerotic disease burden for coronary artery disease risk assessment. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(8):846-55.
29. Lloyd-Jones DM, Nam BH, D'Agostino RB, Sr., Levy D, Murabito JM, Wang TJ, et al. Parental cardiovascular disease as a risk factor for cardiovascular disease in middle-aged adults: a prospective study of parents and offspring. *Jama*. 2004;291(18):2204-11.
30. Mendis S. The contribution of the Framingham Heart Study to the prevention of cardiovascular disease: a global perspective. *Prog Cardiovasc Dis*. 2010;53(1):10-4.
31. Nilsson PM. Early vascular aging (EVA): consequences and prevention. *Vasc Health Risk Manag*. 2008;4(3):547-52.
32. Albrektsen G, Heuch I, Løchen M-L, Thelle DS, Wilsgaard T, Njølstad I, et al. Lifelong Gender Gap in Risk of Incident Myocardial Infarction: The Tromsø Study. *JAMA Internal Medicine*. 2016;176(11):1673-9. 10.1001/jamainternmed.2016.5451.
33. Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2020;141(9):e139-e596.
34. Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron*. 2010;67(2):181-98. 10.1016/j.neuron.2010.07.002.
35. Li H, Horke S, Förstermann U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2014;237(1):208-19.
36. Steinberg D. The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. *J Lipid Res*. 2009;50(81):15.
37. Jin RC, Loscalzo J. Vascular Nitric Oxide: Formation and Function. *J Blood Med*. 2010;1(1):147-62.
38. Jashari F, Ibrahimi P, Nicoll R, Bajraktari G, Wester P, Henein MY. Coronary and carotid atherosclerosis: similarities and differences. *Atherosclerosis*. 2013;227(2):193-200. 10.1016/j.atherosclerosis.2012.11.008.
39. Sigala F, Oikonomou E, Antonopoulos AS, Galyfos G, Tousoulis D. Coronary versus carotid artery plaques. Similarities and differences regarding biomarkers morphology and prognosis. *Curr Opin Pharmacol*. 2018;39:9-18.
40. Virmani R, Ladich ER, Burke AP, Kolodgie FD. Histopathology of carotid atherosclerotic disease. *Neurosurgery*. 2006;59(5 Suppl 3).
41. O'Donnell MJ, Xavier D, Liu L, Zhang H, Chin SL, Rao-Melacini P, et al. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet*. 2010;376(9735):112-23.
42. Genser B, März W. Low density lipoprotein cholesterol, statins and cardiovascular events: a meta-analysis. *Clin Res Cardiol*. 2006;95(8):393-404.
43. Touzé E, Varenne O, Chatellier G, Peyrard S, Rothwell PM, Mas JL. Risk of myocardial infarction and vascular death after transient ischemic attack and ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Stroke*. 2005;36(12):2748-55.

44. Sturm JW, Donnan GA, Dewey HM, Macdonell RA, Gilligan AK, Srikanth V, et al. Quality of life after stroke: the North East Melbourne Stroke Incidence Study (NEMESIS). *Stroke*. 2004;35(10):2340-5.
45. Krishnamurthi RV, Ikeda T, Feigin VL. Global, Regional and Country-Specific Burden of Ischaemic Stroke, Intracerebral Haemorrhage and Subarachnoid Haemorrhage: A Systematic Analysis of the Global Burden of Disease Study 2017. *Neuroepidemiology*. 2020;54(2):171-9.
46. Andersen KK, Olsen TS, Dehlendorff C, Kammersgaard LP. Hemorrhagic and ischemic strokes compared: stroke severity, mortality, and risk factors. *Stroke*. 2009;40(6):2068-72.
47. Campbell BCV, De Silva DA, Macleod MR, Coutts SB, Schwamm LH, Davis SM, et al. Ischaemic stroke. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):019-0118.
48. Bolli R, Marbán E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev*. 1999;79(2):609-34.
49. Frangogiannis NG. Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Compr Physiol*. 2015;5(4):1841-75.
50. Sridhar S, Botbol Y, Macian F, Cuervo AM. Autophagy and disease: always two sides to a problem. *J Pathol*. 2012;226(2):255-73.
51. Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48(3):504-11.
52. Prabhu SD, Frangogiannis NG. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res*. 2016;119(1):91-112.
53. Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev*. 2007;87(4):1285-342. 10.1152/physrev.00012.2007.
54. Frangogiannis NG. The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling. *J Clin Invest*. 2017;127(5):1600-12.
55. Jugdutt BI. Extracellular Matrix and Cardiac Remodeling. In: Villarreal FJ, editor. *Interstitial Fibrosis in Heart Failure*. New York, NY: Springer New York; 2005. p. 23-55.
56. Galli A, Lombardi F. Postinfarct Left Ventricular Remodelling: A Prevailing Cause of Heart Failure. *Cardiol Res Pract*. 2016;2579832(10):18.
57. Van Lint P, Libert C. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2007;82(6):1375-81.
58. Sciarretta S, Yee D, Nagarajan N, Bianchi F, Saito T, Valenti V, et al. Trehalose-Induced Activation of Autophagy Improves Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2018;71(18):1999-2010.
59. Lehrman MA, Schneider WJ, Südhof TC, Brown MS, Goldstein JL, Russell DW. Mutation in LDL receptor: Alu-Alu recombination deletes exons encoding transmembrane and cytoplasmic domains. *Science*. 1985;227(4683):140-6.
60. Soria LF, Ludwig EH, Clarke HR, Vega GL, Grundy SM, McCarthy BJ. Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(2):587-91.
61. Abifadel M, Varret M, Rabès JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet*. 2003;34(2):154-6.
62. Musunuru K, Kathiresan S. Genetics of Common, Complex Coronary Artery Disease. *Cell*. 2019;177(1):132-45.
63. Roberts R, Campillo A, Schmitt M. Prediction and management of CAD risk based on genetic stratification. *Trends Cardiovasc Med*. 2020;30(6):328-34.
64. Erdmann J, Kessler T, Munoz Venegas L, Schunkert H. A decade of genome-wide association studies for coronary artery disease: the challenges ahead. *Cardiovasc Res*. 2018;114(9):1241-57.
65. Lin J, Musunuru K. From Genotype to Phenotype: A Primer on the Functional Follow-up of Genome-Wide Association Studies in Cardiovascular Disease. *Circ Genom Precis Med*. 2018;11(2):30.

66. Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. 2007;449(7164):851-61.
67. Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, Hengstenberg C, Mangino M, Mayer B, et al. Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2007;357(5):443-53.
68. Helgadóttir A, Thorleifsson G, Manolescu A, Gretarsdóttir S, Blondal T, Jonasdóttir A, et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science*. 2007;316(5830):1491-3.
69. McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, Stewart A, Roberts R, Cox DR, et al. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science*. 2007;316(5830):1488-91.
70. Moulleron S, Wiezlak M, O'Reilly N, Treisman R, McDonald NQ. Structures of the Phactr1 RPEL domain and RPEL motif complexes with G-actin reveal the molecular basis for actin binding cooperativity. *Structure*. 2012;20(11):1960-70. 10.1016/j.str.2012.08.031.
71. Allen PB, Greenfield AT, Svenningsson P, Haspeslagh DC, Greengard P. Phactrs 1-4: A family of protein phosphatase 1 and actin regulatory proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(18):7187-92. 10.1073/pnas.0401673101.
72. Wiezlak M, Diring J, Abella J, Moulleron S, Way M, McDonald NQ, et al. G-actin regulates the shuttling and PP1 binding of the RPEL protein Phactr1 to control actomyosin assembly. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 23):5860-72. 10.1242/jcs.112078.
73. Cohen PT. Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci*. 2002;115(Pt 2):241-56.
74. Fedoryshchak RO, Přečková M, Butler AM, Lee R, O'Reilly N, Flynn HR, et al. Molecular basis for substrate specificity of the Phactr1/PP1 phosphatase holoenzyme. *Elife*. 2020;9. 10.7554/eLife.61509.
75. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015;347(6220):1260419. 10.1126/science.1260419.
76. Aherrahrou R, Aherrahrou Z, Schunkert H, Erdmann J. Coronary artery disease associated gene Phactr1 modulates severity of vascular calcification in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;491(2):396-402. 10.1016/j.bbrc.2017.07.090.
77. Erbilgin A, Civelek M, Romanoski CE, Pan C, Hagopian R, Berliner JA, et al. Identification of CAD candidate genes in GWAS loci and their expression in vascular cells. *J Lipid Res*. 2013;54(7):1894-905. 10.1194/jlr.M037085.
78. Beaudoin M, Gupta RM, Won HH, Lo KS, Do R, Henderson CA, et al. Myocardial Infarction-Associated SNP at 6p24 Interferes With MEF2 Binding and Associates With PHACTR1 Expression Levels in Human Coronary Arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(6):1472-9. 10.1161/atvbaha.115.305534.
79. Reschen ME, Lin D, Chalisey A, Soilleux EJ, O'Callaghan CA. Genetic and environmental risk factors for atherosclerosis regulate transcription of phosphatase and actin regulating gene PHACTR1. *Atherosclerosis*. 2016;250:95-105. 10.1016/j.atherosclerosis.2016.04.025.
80. Codina-Fauteux VA, Beaudoin M, Lalonde S, Lo KS, Lettre G. PHACTR1 splicing isoforms and eQTLs in atherosclerosis-relevant human cells. *BMC Med Genet*. 2018;19(1):97. 10.1186/s12881-018-0616-7.
81. Kathiresan S, Voight BF, Purcell S, Musunuru K, Ardissino D, Mannucci PM, et al. Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nat Genet*. 2009;41(3):334-41. 10.1038/ng.327.
82. Schunkert H, König IR, Kathiresan S, Reilly MP, Assimes TL, Holm H, et al. Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nat Genet*. 2011;43(4):333-8. 10.1038/ng.784.
83. A genome-wide association study in Europeans and South Asians identifies five new loci for coronary artery disease. *Nat Genet*. 2011;43(4):339-44.
84. O'Donnell CJ, Kavousi M, Smith AV, Kardina SL, Feitosa MF, Hwang SJ, et al. Genome-wide association study for coronary artery calcification with follow-up in myocardial infarction. *Circulation*. 2011;124(25):2855-64. 10.1161/circulationaha.110.974899.



85. Pechlivanis S, Muhleisen TW, Mohlenkamp S, Schadendorf D, Erbel R, Jockel KH, et al. Risk loci for coronary artery calcification replicated at 9p21 and 6q24 in the Heinz Nixdorf Recall Study. *BMC Med Genet.* 2013;14:23. 10.1186/1471-2350-14-23.
86. Bevan S, Traylor M, Adib-Samii P, Malik R, Paul NL, Jackson C, et al. Genetic heritability of ischemic stroke and the contribution of previously reported candidate gene and genome-wide associations. *Stroke.* 2012;43(12):3161-7. 10.1161/strokeaha.112.665760.
87. Deloukas P, Kanoni S, Willenborg C, Farrall M, Assimes TL, Thompson JR, et al. Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nat Genet.* 2013;45(1):25-33. 10.1038/ng.2480.
88. Bush WS, Oetjens MT, Crawford DC. Unravelling the human genome-phenome relationship using phenome-wide association studies. *Nat Rev Genet.* 2016;17(3):129-45.
89. Gupta RM, Hadaya J, Trehan A, Zekavat SM, Roselli C, Klarin D, et al. A Genetic Variant Associated with Five Vascular Diseases Is a Distal Regulator of Endothelin-1 Gene Expression. *Cell.* 2017;170(3):522-33 e15. 10.1016/j.cell.2017.06.049.
90. Jansen H, Lieb W, Schunkert H. Mendelian Randomization for the Identification of Causal Pathways in Atherosclerotic Vascular Disease. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2016;30(1):41-9.
91. Do R, Stitzel NO, Won HH, Jørgensen AB, Duga S, Angelica Merlini P, et al. Exome sequencing identifies rare LDLR and APOA5 alleles conferring risk for myocardial infarction. *Nature.* 2015;518(7537):102-6.
92. Jarray R, Pavoni S, Borriello L, Allain B, Lopez N, Bianco S, et al. Disruption of phactr-1 pathway triggers pro-inflammatory and pro-atherogenic factors: New insights in atherosclerosis development. *Biochimie.* 2015;118:151-61. 10.1016/j.biochi.2015.09.008.
93. Zhang Z, Jiang F, Zeng L, Wang X, Tu S. PHACTR1 regulates oxidative stress and inflammation to coronary artery endothelial cells via interaction with NF-kappaB/p65. *Atherosclerosis.* 2018;278:180-9. 10.1016/j.atherosclerosis.2018.08.041.
94. Jarray R, Allain B, Borriello L, Biard D, Loukaci A, Larghero J, et al. Depletion of the novel protein PHACTR-1 from human endothelial cells abolishes tube formation and induces cell death receptor apoptosis. *Biochimie.* 2011;93(10):1668-75. 10.1016/j.biochi.2011.07.010.
95. Allain B, Jarray R, Borriello L, Leforban B, Dufour S, Liu WQ, et al. Neuropilin-1 regulates a new VEGF-induced gene, Phactr-1, which controls tubulogenesis and modulates lamellipodial dynamics in human endothelial cells. *Cell Signal.* 2012;24(1):214-23. 10.1016/j.cellsig.2011.09.003.
96. Kelloniemi A, Szabo Z, Serpi R, Napankangas J, Ohukainen P, Tenhunen O, et al. The Early-Onset Myocardial Infarction Associated PHACTR1 Gene Regulates Skeletal and Cardiac Alpha-Actin Gene Expression. *PLoS One.* 2015;10(6):e0130502. 10.1371/journal.pone.0130502.
97. Li T, Ding L, Wang Y, Yang O, Wang S, Kong J. Genetic deficiency of Phactr1 promotes atherosclerosis development via facilitating M1 macrophage polarization and foam cell formation. *Clin Sci.* 2020;134(17):2353-68.
98. Kasikara C, Schilperoort M, Gerlach BD, Xue C, Wang X, Zheng Z, et al. Deficiency of macrophage PHACTR1 impairs efferocytosis and promotes atherosclerotic plaque necrosis. *J Clin Invest.* 2021;25(145275).
99. Buniello A, MacArthur JAL, Cerezo M, Harris LW, Hayhurst J, Malangone C, et al. The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D1005-D12.
100. Surendran P, Drenos F, Young R, Warren H, Cook JP, Manning AK, et al. Trans-ancestry meta-analyses identify rare and common variants associated with blood pressure and hypertension. *Nat Genet.* 2016;48(10):1151-61. 10.1038/ng.3654.
101. Debette S, Kamatani Y, Metso TM, Kloss M, Chauhan G, Engelter ST, et al. Common variation in PHACTR1 is associated with susceptibility to cervical artery dissection. *Nat Genet.* 2015;47(1):78-83. 10.1038/ng.3154.
102. Anttila V, Winsvold BS, Gormley P, Kurth T, Bettella F, McMahon G, et al. Genome-wide meta-analysis identifies new susceptibility loci for migraine. *Nat Genet.* 2013;45(8):912-7. 10.1038/ng.2676.

103. Kiando SR, Tucker NR, Castro-Vega LJ, Katz A, D'Escamard V, Treard C, et al. PHACTR1 Is a Genetic Susceptibility Locus for Fibromuscular Dysplasia Supporting Its Complex Genetic Pattern of Inheritance. *PLoS Genet.* 2016;12(10):e1006367. 10.1371/journal.pgen.1006367.
104. Freilinger T, Anttila V, de Vries B, Malik R, Kallela M, Terwindt GM, et al. Genome-wide association analysis identifies susceptibility loci for migraine without aura. *Nat Genet.* 2012;44(7):777-82.
105. Winsvold BS, Bettella F, Witoelar A, Anttila V, Gormley P, Kurth T, et al. Shared genetic risk between migraine and coronary artery disease: A genome-wide analysis of common variants. *PLoS One.* 2017;12(9):e0185663. 10.1371/journal.pone.0185663.
106. Adlam D, Olson TM, Combaret N, Kovacic JC, Iismaa SE, Al-Hussaini A, et al. Association of the PHACTR1/EDN1 Genetic Locus With Spontaneous Coronary Artery Dissection. *J Am Coll Cardiol.* 2019;73(1):58-66.
107. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat Genet.* 2013;45(6):580-5.
108. Aguet F, Brown AA, Castel SE, Davis JR, Mohammadi P, Segrè AV, et al. Local genetic effects on gene expression across 44 human tissues. *bioRxiv.* 2016:074450. 10.1101/074450.
109. Wang X, Musunuru K. Confirmation of Causal rs9349379- PHACTR1 Expression Quantitative Trait Locus in Human-Induced Pluripotent Stem Cell Endothelial Cells. *Circ Genom Precis Med.* 2018;11(10):e002327. 10.1161/circgen.118.002327.
110. Machiela MJ, Chanock SJ. LDlink: a web-based application for exploring population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants. *Bioinformatics.* 2015;31(21):3555-7. 10.1093/bioinformatics/btv402.
111. 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.
112. Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, Bornstein N, et al. Mannheim carotid intima-media thickness and plaque consensus (2004-2006-2011). An update on behalf of the advisory board of the 3rd, 4th and 5th watching the risk symposia, at the 13th, 15th and 20th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, Brussels, Belgium, 2006, and Hamburg, Germany, 2011. *Cerebrovasc Dis.* 2012;34(4):290-6.
113. Fedak A, Ciuk K, Urbanik A. Ultrasonography of vulnerable atherosclerotic plaque in the carotid arteries: B-mode imaging. *J Ultrason.* 2020;20(81):e135-e45.
114. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, et al. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2015;16(3):233-70. 10.1093/ehjci/jev014.
115. Geyer H, Caracciolo G, Abe H, Wilansky S, Carerj S, Gentile F, et al. Assessment of myocardial mechanics using speckle tracking echocardiography: fundamentals and clinical applications. *J Am Soc Echocardiogr.* 2010;23(4):351-69; quiz 453-5. 10.1016/j.echo.2010.02.015.
116. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35(3):569-82. 10.1016/s0735-1097(99)00630-0.
117. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, et al. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail.* 2012;14(8):803-69. 10.1093/eurjhf/hfs105.
118. Sianos G, Morel MA, Kappetein AP, Morice MC, Colombo A, Dawkins K, et al. The SYNTAX Score: an angiographic tool grading the complexity of coronary artery disease. *EuroIntervention.* 2005;1(2):219-27.
119. Hui SK, Lindale E, Sun L, Ruel M. Genetics of coronary artery disease: should they impact the choice of revascularization? *Curr Opin Cardiol.* 2018;33(6):605-12.

120. Steinvil A, Sadeh B, Arbel Y, Justo D, Belei A, Borenstein N, et al. Prevalence and predictors of concomitant carotid and coronary artery atherosclerotic disease. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57(7):779-83.
121. Weiß CH. StatSoft, Inc., Tulsa, OK.: STATISTICA, Version 8. AStA Advances in Statistical Analysis. 2007;91(3):339-41. 10.1007/s10182-007-0038-x.
122. Tregouet DA, Garelle V. A new JAVA interface implementation of THESIAS: testing haplotype effects in association studies. *Bioinformatics*. 2007;23(8):1038-9. 10.1093/bioinformatics/btm058.
123. Tregouet DA, Escolano S, Tired L, Mallet A, Golmard JL. A new algorithm for haplotype-based association analysis: the Stochastic-EM algorithm. *Ann Hum Genet*. 2004;68(Pt 2):165-77. 10.1046/j.1529-8817.2003.00085.x.
124. Auton A, Abecasis GR, Altshuler DM, Durbin RM, Bentley DR, Chakravarti A, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68-74. 10.1038/nature15393.
125. Ardlie KG, Kruglyak L, Seielstad M. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Rev Genet*. 2002;3(4):299-309. 10.1038/nrg777.
126. Menashe I, Rosenberg PS, Chen BE. PGA: power calculator for case-control genetic association analyses. *BMC Genet*. 2008;9:36. 10.1186/1471-2156-9-36.
127. Kuveljic J, Djuric T, Stankovic A, Koncar I, Alavantic D, Zivkovic M. PHACTR1 haplotypes are associated with carotid plaque presence and affect PHACTR1 mRNA expression in carotid plaque tissue. *Gene*. 2019;710:273-8. 10.1016/j.gene.2019.06.020.
128. Kuveljic J, Djuric T, Stankovic G, Dekleva M, Stankovic A, Alavantic D, et al. Association of PHACTR1 intronic variants with the first myocardial infarction and their effect on PHACTR1 mRNA expression in PBMCs. *Gene*. 2021;775(145428):16.
129. Goff DC, Jr., Lloyd-Jones DM, Bennett G, Coady S, D'Agostino RB, Gibbons R, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014;129(25 Suppl 2):12.
130. Mega JL, Stitzel NO, Smith JG, Chasman DI, Caulfield M, Devlin JJ, et al. Genetic risk, coronary heart disease events, and the clinical benefit of statin therapy: an analysis of primary and secondary prevention trials. *Lancet*. 2015;385(9984):2264-71.
131. Natarajan P, Young R, Stitzel NO, Padmanabhan S, Baber U, Mehran R, et al. Polygenic Risk Score Identifies Subgroup With Higher Burden of Atherosclerosis and Greater Relative Benefit From Statin Therapy in the Primary Prevention Setting. *Circulation*. 2017;135(22):2091-101.
132. Inaba Y, Chen JA, Bergmann SR. Carotid plaque, compared with carotid intima-media thickness, more accurately predicts coronary artery disease events: a meta-analysis. *Atherosclerosis*. 2012;220(1):128-33. 10.1016/j.atherosclerosis.2011.06.044.
133. Kwee RM. Systematic review on the association between calcification in carotid plaques and clinical ischemic symptoms. *J Vasc Surg*. 2010;51(4):1015-25. 10.1016/j.jvs.2009.08.072.
134. Cattaneo M, Sun J, Staub D, Xu D, Gallino JM, Santini P, et al. Imaging of Carotid Plaque Neovascularization by Contrast-Enhanced Ultrasound and Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging. *Cerebrovasc Dis*. 2019;48(3-6):140-8.
135. Tarkin JM, Dweck MR, Evans NR, Takx RA, Brown AJ, Tawakol A, et al. Imaging Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):750-69.
136. de Vries MR, Quax PH. Plaque angiogenesis and its relation to inflammation and atherosclerotic plaque destabilization. *Curr Opin Lipidol*. 2016;27(5):499-506. 10.1097/mol.0000000000000339.
137. Collett GD, Canfield AE. Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification. *Circ Res*. 2005;96(9):930-8. 10.1161/01.RES.0000163634.51301.0d.
138. Jiang Y, Liu HB. Myocyte Enhancer Factor-2A Gene Mutation and Coronary Artery Disease. *Chin Med J*. 2015;128(19):2688-91.
139. Liu Y, Niu W, Wu Z, Su X, Chen Q, Lu L, et al. Variants in exon 11 of MEF2A gene and coronary artery disease: evidence from a case-control study, systematic review, and meta-analysis. *PLoS One*. 2012;7(2):21.

140. Fishilevich S, Nudel R, Rappaport N, Hadar R, Plaschkes I, Iny Stein T, et al. GeneHancer: genome-wide integration of enhancers and target genes in GeneCards. Database : the journal of biological databases and curation. 2017;2017:bax028. 10.1093/database/bax028.
141. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. Nature. 2012;489(7414):57-74. 10.1038/nature11247.
142. Dehghan A, Bis JC, White CC, Smith AV, Morrison AC, Cupples LA, et al. 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. 10.1371/journal.pone.0144997.
143. Cayla G, Lattuca B. Long-Term Outcomes on Multivessel Disease STEMI Patients: Which Is the Culprit Lesion?: J Am Coll Cardiol. 2019 Dec 24;74(25):3095-3098. doi: 10.1016/j.jacc.2019.10.037.
144. Hager J, Kamatani Y, Cazier JB, Youhanna S, Ghassibe-Sabbagh M, Platt DE, et al. Genome-wide association study in a Lebanese cohort confirms PHACTR1 as a major determinant of coronary artery stenosis. PLoS One. 2012;7(6):e38663. 10.1371/journal.pone.0038663.
145. Gershlick AH, Banning AS, Parker E, Wang D, Budgeon CA, Kelly DJ, et al. Long-Term Follow-Up of Complete Versus Lesion-Only Revascularization in STEMI and Multivessel Disease: The CvLPRIT Trial. J Am Coll Cardiol. 2019;74(25):3083-94.
146. Vargas JD, Manichaikul A, Wang XQ, Rich SS, Rotter JI, Post WS, et al. Common genetic variants and subclinical atherosclerosis: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). Atherosclerosis. 2016;245:230-6. 10.1016/j.atherosclerosis.2015.11.034.
147. Luis SA, Chan J, Pellikka PA. Echocardiographic Assessment of Left Ventricular Systolic Function: An Overview of Contemporary Techniques, Including Speckle-Tracking Echocardiography. Mayo Clin Proc. 2019;94(1):125-38.
148. Stokke TM, Hasselberg NE, Smedsrud MK, Sarvari SI, Haugaa KH, Smiseth OA, et al. Geometry as a Confounder When Assessing Ventricular Systolic Function: Comparison Between Ejection Fraction and Strain. J Am Coll Cardiol. 2017;70(8):942-54.
149. Gibson PH, Becher H, Choy JB. Classification of left ventricular size: diameter or volume with contrast echocardiography? Open Heart. 2014;1(1):2014-000147.
150. Hartmann K, Seweryn M, Handleman SK, Rempala GA, Sadee W. Non-linear interactions between candidate genes of myocardial infarction revealed in mRNA expression profiles. BMC Genomics. 2016;17(1):738. 10.1186/s12864-016-3075-6.

## Lista skraćenica po abecednom redu

AKA - ateroskleroza karotidnih arterija

AKOA - ateroskleroza koronarnih arterija

CRP - C reaktivni protein

CVI - cerebrovaskularni insult

EĆ - endotelske ćelije

EDN1 - endotelin 1

eQTL - eng. *expression quantitative trait locus*

FMD - fibromuskularna displazija

GMĆ - glatke mišićne ćelije

GTE<sub>x</sub> baza podataka - eng. *Genotype-Tissue Expression Project*

GWA studije - studije asocijacije celokupnog genoma (eng. *Genome Wide Association Studies*)

IM - infarkt miokarda

IMT - zadebljanje regiona intima - medija (eng. *intima - media thickness*)

KB - koronarna bolest

KKA - kalcifikacija koronarnih arterija

KV događaj - kardiovaskularni događaj

KVB - kardiovaskularne bolesti

LD - neravnoteža vezanosti (eng. *linkage disequilibrium*)

LK srca - leva komora srca

MĆPK - mononuklearne ćelije periferne krvi

MMP - metaloproteinaze matriksa

NLS sekvence - eng. *nuclear localisation signals*

OR - odnos šansi (eng. *odds ratio*)

PHACTR1 - regulator protein fosfataze i aktina 1 (eng. *protein phosphatase and actin regulator 1*)

PP1c - katalitička subjedinica protein fosfataze 1 (eng. *protein phosphatase 1*)

RIND - reverzibilni ishemijski neurološki deficit (eng. *reversible ischemic neurological deficit*)

ROS - reaktivne vrste kiseonika (eng. *reactive oxygen species*)

STEMI - infarkt miokarda sa elevacijom ST segmenta elektrokardiograma

TIA - prolazni ishemijski napad (eng. *transient ischaemic attack*)

TIMP - tkivni inhibitori metaloproteinaza matriksa

VBI - vertebrobazilarna isuficijencija (eng. *vertebrobasilar insufficiency*)

VĆM - vanćelijski matriks

VEGF - vaskularni endotelni faktor rasta (eng. *vascular endothelial growth factor*)

VSB - višesudovna bolešt

## BIOGRAFIJA AUTORA

Jovana Kuveljić je rođena 09.10.1984. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i VI beogradsku gimnaziju. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2003./2004. godine, studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija, smer Primenjena genetika. Diplomirala je 02.02.2011. godine sa ocenom 10 na diplomskom ispitu i prosečnom ocenom 8.26. Diplomski rad na temu "Uspešnost u parenju jedinki *Drosophila subobscura* sa ekološki različitih staništa ukrštanih u srodstvu tokom više generacija", uradila je na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković” u Laboratoriji za genetiku populacija i ekogenotoksikologiju, pod mentorstvom dr Tanje Savić. Školske 2011/2012. godine upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Molekularna biologija, modul Molekularna biologija eukariota, rukovodilac modula prof. dr Gordana Matić.

Zaposlena je u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke „Vinča”- Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu, od 01.11.2012. godine. Prvo na projektu naučnog savetnika dr Dragana Alavantića, a zatim od 01.01.2020. godine, u okviru teme „Genetska epidemiologija masovnih nezaraznih bolesti u populaciji Srbije”, rukovodilac teme naučni savetnik dr Maja Živković. U zvanje istraživač saradnik rezabrana je 29.08.2019. godine.

Jovana Kuveljić je publikovala dva rada iz doktorske disertacije, a koautor je još dva naučna rada objavljena u časopisima od međunarodnog značaja. Takođe je autor jednog rada štampanog u nacionalnom časopisu bez kategorije. Učestvovala je na tri međunarodna kongresa kao autor tri kongresna saopštenja. Takođe je i koautor na još pet kongresnih saopštenja koja su štampana u izvodu.





# Изјава о ауторству

Потписана Јована Кувелић

број индекса Б3042/2011

## Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

### **Повезаност гена *PNACTR1* са настанком и компликацијама атеросклерозе код човека**

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

**Потпис аутора**

У Београду, 26.05.2021.

---

# Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: **Јована Кувелић**

Број индекса: Б3042/2011

Студијски програм: Молекуларна биологија

Наслов рада:

**Повезаност гена *RNASTR1* са настанком и компликацијама атеросклерозе код човека**

Ментор: др Тамара Ђурић Делић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, 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 у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, 26.05.2021.

---

## Изјава о коришћењу

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

**Повезаност гена *PNACTR1* са настанком и компликацијама атеросклерозе код човека**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла 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/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство - некомерцијално - без прераде
4. Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
5. Ауторство - без прераде
6. Ауторство - делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис аутора

У Београду, 26.05.2021.

---

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.