

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ivana I. Grubiša

**GENETIČKI MARKERI OKSIDATIVNOG
STRESA KOD BOLESNIKA SA
MANIFESTNIM DIJABETESOM TIPA 2 I
ATEROSKLEROZOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ivana I. Grubiša

**GENETIC MARKERS OF OXIDATIVE
STRESS IN PATIENTS WITH
MANIFESTED DIABETES TYPE 2 AND
ATHEROSCLEROSIS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

PODACI O MENTORIMA I ČLANOVIMA KOMISIJE

MENTORI

dr Jelena Milašin, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu-Stomatološki fakultet

dr Marina Stamenković-Radak, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

ČLANOVI KOMISIJE

dr sci Nada Vučinić, viši naučni saradnik
Kliničko-bolnički centar „Zvezdara“, Beograd

dr Ivana Novaković, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu-Medicinski fakultet

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Najveću zahvalnost dugujem dr sci Nadi Vučinić za ukazano poverenje, za podršku i pomoć koju mi je pružila u mom profesionalnom usavršavanju i na znanju koje mi je nesebično prenela. Bila je čast raditi sa Vama.

Najsrdahnije se zahvaljujem mentorki prof dr Jeleni Milašin na strpljenju, vođenju kroz eksperimentalni rad, na satima provedenim u razgovoru...nadam se da ću sve ono što sam naučila znati da primenim u budućem radu.

Najsrdahnije se zahvaljujem mentorki prof dr Marini Stamenković-Radak, na strpljenju, pomoći i veoma korisnim primedbama i sugestijama koje sam dobijala tokom godina svog stručnog usavršavanja.

Zahvaljujem se i prof dr Ivani Novaković na čitanju teze.

Zahvaljujem se Aleksandri, Lidiji, Milici, Aleksandru i Mariji na nesebičnoj pomoći u prikupljanju materijala i savetima prilikom pisanja teze.

Porodica je bila moja najveća podrška tokom ovih godina. Hvala vam. Jovane, neizmerno hvala na podršci i razumevnju.

Genetički markeri oksidativnog stresa kod bolesnika sa manifestnim dijabetesom tipa 2 i aterosklerozom

Rezime

Ateroskleroza je kompleksno i multifaktorsko oboljenje koje obuhvata veliki broj tipova ćelija kao i brojne fiziološke procese. Veruje se da oksidativni stres igra važnu ulogu u inicijaciji i progresiji ateroskleroze. Kardiovaskularne bolesti (CVD) predstavljaju vodeći uzrok smrtnosti u Srbiji i pronalaženje markera oksidativnog stresa, uključujući i genske varijante, doprinelo bi smanjenju broja obolelih.

Studija asocijacije, koja je obuhvatala 140 obolelih od diabetes mellitus tip 2 sa kardiovaskularnim komplikacijama (DM+A), 60 obolelih od neke od kliničkih manifestacija ateroskleroze (A) i 100 zdravih kontrola (K) je sprovedena da bi se utvrdila značajnost polimorfizama gena koji su povezani sa oksidativnim stresom, metabolizmom lipida i detoksifikacijom kao markera oksidativnog stresa i faktora rizika za nastanak oboljenja. Za studiju su odabrani polimorfizmi gena čiji produkti imaju antioksidativnu ulogu u plazmi (*pon1* Q192R, L55M i C(-107)T), antioksidativnu ulogu i ulogu u metabolizmu lipida u plazmi i ćeliji (*apoE* 112/158 polimorfizam) i antioksidativnu i detoksifikujuću ulogu u ćeliji (*GSTM1**0, *GSTT1**0 i *GSTP1* Ile105Val). Genomska DNK je izolovana ili iz ćelija periferne krvi ili iz epitelnih ćelija bukalne sluzokože. Genotipizacija je rađena restrikcijom PCR produkata i analizom dužine restrikcijom fragmenata (PCR-RFLP) na agaroznom ili poliakrilamidnom gelu i real-time PCR metodom. Hi-kvadrat i Fišerov egzaktni test su upotrebljeni za utvrđivanje razlika u distribuciji učestalosti ispitivanih genotipova i alela, a logističkom regresionom analizom utvrđivan je rizik za oboljevanje.

Hipertenzija, hiperlipidemija i pozitivna porodična istorija za KVB su faktori rizika za kardiovaskularne komplikacije u čijoj osnovi je ateroskleroza kod obe grupe pacijenata, a pozitivna porodična istorija za KVB je faktor rizika za aterosklerozu kod obolelih od T2DM. Učestalosti alela i genotipova Q192 polimorfizma *pon1* gena pokazale su značajnu razliku između pacijenata sa T2DM i kontrola ($p < 0.0001$) i između pacijenata sa T2DM i grupe bez T2DM (sa aterosklerozom) ($p < 0.0001$). Rezultati logističke regresione analize su pokazali značajno povećanje rizika za razvoj kliničkih manifestacija ateroskleroze kod dijabetičara koji nose R alel i genotipove QR i RR u poređenju sa kontrolama (za R alel: OR=2,22, $p < 0,0001$; za QR genotip: OR=3,36, $p < 0,0001$; za RR genotip: OR=4,29, $p = 0,0012$) i u poređenju sa grupom A (za R alel: OR=2,28, $p < 0,001$; za QR genotip: OR=3,7, $p < 0,0001$; za RR genotip: OR=4,27, $p = 0,006$). Uočena je i značajna razlika u učestalostima *GSTM1* nultog genotipa i *GSTT1* nultog genotipa između obolelih bez T2DM i kontrolne grupe, a logistička regresiona analiza je pokazala 2 puta veći rizik za oboljenje kod osoba sa *GSTM1* nultim genotipom (OR= 2.0, $p < 0.03$) i više od 2 puta povećan rizik kod pacijenata sa *GSTT1* nultim genotipom (OR=2.26, $p < 0.03$). Učestalost kombinovane delecije *GSTM1* i *GSTT1* se značajno razlikovala među grupama. Dijabetičari, nosioci dvostrukog nultog genotipa su imali približno 4,5 puta uvećan rizik za razvoj ateroskleroze (OR=4,4, $p = 0,05$) a rizik od ateroskleroze bio je čak 15 puta veći kod nosilaca nultih genotipova bez T2DM (OR=15,05, $p < 0,0001$) u poređenju sa kontrolnom grupom. Takođe, uočili smo i značajno povećanje rizika za aterosklerozu kod nosilaca dvostruke delecije kod pacijenata bez T2DM u poređenju sa dijabetičarima (za DM+A grupu: OR=0,29, $p = 0,001$). Nije nađena statistički značajna razlika u učestalosti alela i genotipova poređenjem grupa za L55M i C(-107)T polimorfizme *pon1* gena i 112/158

polimorfizam *apoE* gena. Nije uočena povezanost sa rizikom od bolesti ni za jedan od alela i genotipova ova tri polimorfizma.

Možemo zaključiti da su polimorfizam Q192R *pon1* gena kao i kombinovana delecija *GSTM1* i *GSTT1* gena genetički markeri oksidativnog stresa kod obolelih od diabetes mellitus tip 2 sa kliničkim manifestacijama ateroskleroze, a da su *GSTM1* nulti genotip i *GSTT1* nulti genotip, pojedinačno ili udruženo, faktori podložnosti za razvoj ateroskleroze kod pacijenata bez T2DM.

Ključne reči: ateroskleroza, diabetes mellitus tip 2, oksidativni stres, genski polimorfizmi, *apoE*, *pon1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Genetika

UDK : 575.113.1:.[[616-008.9:612.354]+616.13-004.6]

Genetic markers of oxidative stress in patients with manifested diabetes type 2 and atherosclerosis

Abstract

Atherosclerosis is a complex and multifactorial disorder that involves many cell types and organs as well as many physiological processes. It is believed that the oxidative stress plays a critical role in the initiation and progression of atherosclerosis. Cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause of death in Serbia and discovering oxidative stress markers, including gene variants, would contribute to reducing the number of patients.

A association study, comprised 140 patients with diabetes mellitus type 2 and cardiovascular complications (DM+A), 60 patients with clinical manifestations of atherosclerosis (A) and 100 healthy individuals (K), has been undertaken in order to estimate the relevance of polymorphisms in genes related to oxidative stress, lipid metabolism, and detoxification as oxidative stress markers and disease risk factors. Polymorphisms in genes whose products exert an antioxidative role in the plasma (*pon1* Q192R, L55M i C(-107)T), in both plasma and cells (*apoE* 112/158 polymorphisms) and antioxidative and detoxication role in cells (*GSTM1**0, *GSTT1**0 i *GSTP1* Ile105Val) have been selected for the study. Genomic DNA was isolated from peripheral blood cells or from buccal epithelial cells. The genotyping was performed using restriction digestion of PCR products and by analysis of restriction fragment length (PCR-RFLP) on agarose or polyacrilamide gel electrophoresis and the real-time PCR method. Chi-square and Fisher exact test were used for determination of

differences in the analyzed genotype and allele distribution frequencies, and logistic regression analysis was used for disease risk assessment.

Hypertension, hyperlipidemia and positive family history of CVD are risk factors for atherosclerosis-based cardiovascular complications in both patient groups and positive family history of CVD is a risk factor for atherosclerosis in T2DM patients. Allele and genotype frequencies for Q192R polymorphism of *pon1* gene showed significant difference between patients with T2DM and controls ($p < 0.0001$) and between patients with T2DM and the group without T2DM (with atherosclerosis) ($p < 0.0001$). The results of logistic regression analysis showed a significant increase of risk for atherosclerosis development in diabetics that carry R allele and genotypes QR and RR compared with controls (for R allele :OR=2,22, $p < 0,0001$; for QR genotype: OR=3,36, $p < 0,0001$; for RR genotype: OR=4,29, $p = 0,0012$) and compared with group A (for R allele : OR=2,28, $p < 0,001$; for QR genotype: OR=3,7, $p < 0,0001$; for RR genotype: OR=4,27, $p = 0,006$). A significant difference in *GSTM1* null genotype and *GSTT1* null genotype frequencies between patients with atherosclerosis without T2DM and control group were observed and logistic regression analysis showed a 2 fold increase in the risk for disease in patients with the *GSTM1* null genotype (OR= 2.0, $p < 0.03$) and more than 2 fold increase of the risk in patients with *GSTT1* null genotype (OR=2.26, $p < 0.03$). *GSTM1* and *GSTT1* combined deletion frequencies were significantly different between groups. In the group of diabetics, carriers of double null genotypes had an approximately 4.5 fold increase of the risk for atherosclerosis in patients with T2DM (OR=4.4, $p = 0.05$) and 15 fold increase in risk in patients without T2DM (OR=15.05, $p < 0.0001$) compared with control group. Also, we observed a significant increase of the risk for atherosclerosis in double null carriers in patients

without T2DM compared with diabetics (for DM+A group: OR=0.29, p=0.001). No statistically significant difference was found after comparing allele and genotype frequencies between groups for the L55M and C(-107)T polymorphisms in *pon1* gene and 112/158 polymorphism in *apoE* gene. No association with disease risk could be observed for any of the alleles or genotypes of these three polymorphisms.

In conclusion, Q192R polymorphism of *pon1* gene and combined deletion of *GSTM1* and *GSTT1* genes are genetic markers of oxidative stress in patients with diabetes mellitus type 2 with clinical manifestations of atherosclerosis and that *GSTM1* null and *GSTT1* null genotypes, alone or in combination are susceptibility factors for the development of atherosclerosis in patients without T2DM.

Key words: atherosclerosis, diabetes mellitus type 2, oxidative stress, gene polymorphisms, *apoE*, *pon1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*.

Scientific field: Biology

Narrow scientific field: Genetics

UDC: 575.113.1::[[616-008.9:612.354]+616.13-004.6]

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.2. Ateroskleroza	1
1.1.1. Disfunkcija endotela.....	2
1.1.2. Poremećaj u metabolizmu lipida	5
1.1.2.1. Lipoproteini	5
1.1.2.2. Modifikacija lipoproteina i aterogeneza.....	8
1.1.3. Oksidativni stres.....	10
1.1.4. Diabetes mellitus i mehanizmi nastanka ateroskleroze	13
1.1.5. Genetička osnova ateroskleroze	14
1.2. Genetički polimorfizmi	17
1.2.1. Tipovi polimorfizama i mehanizmi njihovog nastanka.....	17
1.3. Oksidativni stres i metabolizam lipida-apolipoprotein E	20
1.3.1. Apolipoproteini	20
1.3.2. Apolipoprotein E.....	20
1.3.2.1. ApoE-struktura	21
1.3.2.2. ApoE-gen i polimorfizmi	22
1.3.2.3. Uloga apoE u metabolizmu lipida.....	24
1.3.2.4. Uloga apoE u oksidativnom stresu i aterogenezi	25
1.4. Oksidativni stres i metabolizam lipida-Paraoksonaza 1	27
1.4.1. Paraoksonaza 1	28
1.4.1.1. PON1-struktura	29
1.4.1.2. PON1-gen i polimorfizmi.....	30
1.4.1.3. Uloga PON1 u metabolizmu lipida	32
1.4.1.4. Uloga PON1 u oksidativnom stresu i aterogenezi.....	33
1.5. Oksidativni stres i detoksifikacija-Glutation S-transferaze	34
1.5.1. Glutation S-transferaze.....	35
1.5.1.1. Citosolne glutation S-transferaze	36

1.5.1.2.	Citosolne glutation S-transferaze-struktura.....	36
1.5.1.3.	Geni i genski polimorfizmi glutation S-transferaza	37
1.5.2.	Uloga GST-aza u oksidativnom stresu i aterogenezi	40
2.	CILJEVI RADA.....	45
3.	ISPITANICI, MATERIJAL I METODE.....	47
3.1.	Ispitanici.....	47
3.2.	Metode.....	48
3.2.1.	Izolacija genomske DNK	49
3.2.1.1.	Izolacija genomske DNK iz limfcita periferne krvi	49
3.2.1.2.	Izolacija genomske DNK iz bukalne sluzokože.....	51
3.2.1.	Lančana reakcija polimeraze (PCR).....	52
3.2.3.	Agarozna gel elektroforeza	55
3.2.4.	Poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE)	57
3.2.5.	Restrikciona digestija PCR produkata i analiza dužine restrikcionih fragmenata.....	59
3.2.5.1.	Ispitivanje genskih polimorfizama PCR-RFLP metodom.....	60
3.2.6.	Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (Real-time PCR)	65
3.2.6.1.	Ispitivanje genskih polimorfizama PCR/Real Time PCR metodom	67
3.2.7.	Statistička analiza.....	69
4.	REZULTATI.....	71
4.1.	Analiza rezultata iz anamneze.....	71
4.2.	Analiza genetičkih rezultata	76
4.2.1.	ApoE 112/158 polimorfizam.....	76
4.2.2.	pon1 Q192R, L55M i C(-107)T polimorfizmi	82
4.2.3.	GST P1, M1, T1 polimorfizmi	95
4.2.3.1.	GSTP1 Ile105Val polimorfizam	95
4.2.3.2.	GSTM1.....	100
4.2.3.3.	GSTT1	103
4.2.3.4.	Analiza kombinovanih genotipova delecionog tipa GSTM1 i GSTT1 gena....	106
5.	DISKUSIJA.....	111
5.1.	Uticaj faktora rizika iz anamneze na oksidativni stres	111

5.2. Uticaj genetičkih faktora na oksidativni stres	114
5.2.1. ApoE 112/158 polimorfizam kao faktor rizika osetljivosti na oksidativni stres	114
5.2.2. Pon1 polimorfizmi kao faktori rizika osetljivosti na oksidativni stres.....	116
5.2.3. GSTP1 Ile105Val, GSTM1*0 i GSTT1*0 polimorfizmi kao faktori rizika osetljivosti na oksidativni stres	119
6. ZAKLJUČCI.....	124
7. LITERATURA.....	126
8. BIOGRAFIJA AUTORA.....	152
9. PRILOZI	153

1. UVOD

1.2. Ateroskleroza

Bolesti srca i krvnih sudova su već decenijama unazad vodeći uzrok radne nesposobnosti i smrtnosti u mlađem i srednjem dobu širom sveta. Približno trećina ukupnog svetskog mortaliteta se pripisuje ovim bolestima, od čega 80% potiče iz zemalja u razvoju i nisko razvijenih zemalja. Prema podacima Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO) za 2010, u Srbiji je 95% smrtnosti posledica hroničnih nezaraznih bolesti, a od toga 58% čine kardiovaskularne bolesti. Po učestalosti moždanog udara smo prvi u Evropi a po umiranju od bolesti srca odmah iza zemalja bivšeg Sovjetskog Saveza (Moldavija, Rusija, Belorusija, Ukrajina) (Mickovski-Katalina i sar., 2005; Institut za javno zdravlje Srbije, 2010).

Ateroskleroza je difuzno, progresivno, kompleksno, hronično i zapaljensko oboljenje arterijskih krvnih sudova koje zahvata sva vaskularna korita i koje se razvija dugi niz godina bez simptoma. Naziv ateroskleroza potiče od grčke reči *athero-* supstanca poput griza i *scleros-*otvrdnuće. Proces aterogeneze može započeti još u najranijem detinjstvu. Karakteriše se deponovanjem unutarćelijskih i vanćelijskih lipida-holesterola, migracijom i proliferacijom monocita/makrofaga u *tunica intima*, formiranjem penušavih ćelija koje su osnov za deponovanje lipida, proliferacijom glatkih mišićnih ćelija, akumulacijom vezivno-tkivnih proteina u intimi krvnog suda, kao i povećanom ekspresijom adhezivnih molekula na osetljivim mestima u endotelu arterijskih sudova. Aterogeneza je proces stvaranja ateroma koji se sastoji iz lipidnog jezgra okruženog vezivnim tkivom koje je praćeno sužavanjem krvnog suda i otežanim protokom krvi kroz tkiva. Arterijski krvni sudovi postaju zadebljali i tvrdi. U kasnijim stadijumima bolesti dolazi i do pucanja ateromatoznog plaka i aterotromboze.

Ateroskleroza se nalazi u osnovi 80% kardiovaskularnih oboljenja i klinički se može manifestovati kao:

-koronarna bolest srca (angina pectoris, infarkt miokarda, iznenadna srčana smrt),

-cerebrovaskularna bolest (prolazni ishemični napadi, šlog),

-periferna vaskularna bolest (bolovi, napetost i slabost tokom kretanja, ulceracije, gangrena).

Ateroskleroza je kompleksno i multifaktorsko oboljenje koje se karakteriše brojnim predisponirajućim faktorima. Klasični faktori rizika za nastanak ateroskleroze su: starost, pol, hipertenzija, hiperlipidemija i hiperlipoproteinemija (dislipidemija), hiperhomocisteinemija, diabetes mellitus, pušenje, gojaznost, genetički faktori, infekcije, kao i pozitivna porodična istorija kardiovaskularnih bolesti. Kombinacijom faktora rizika povećava se mogućnost za pojavu ateroskleroze.

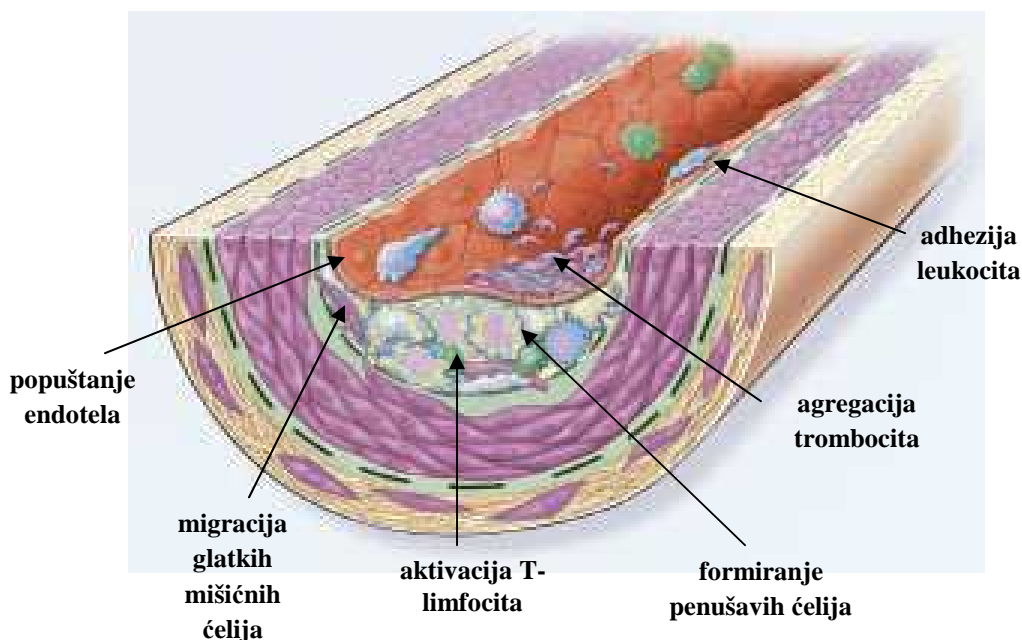
Dva ključna poremećaja koja vode aterogenezi su disfunkcija endotela krvnih sudova i poremećaj metabolizma lipida.

1.1.1. Disfunkcija endotela

Do 1981. godine se smatralo da je endotel krvnih sudova prosti zid koji razdvaja krvne sudove i unutrašnjost tela. Međutim, danas je sasvim jasno da je on multifunkcionalan i da ima krucijalnu ulogu u aterogenezi zbog svoje lokacije između krvotoka i zida krvnog suda. Endotelne ćelije luče različite vazoaktivne supstance kao što su vazodilatatori (azot-oksidi, prostaciklini) i vazokonstriktori (endotelin-1, angiotenzin II, tromboksan A₂) i na taj način utiču na protok krvi u telu. Zdrav endotel održava vaskularni tonus i strukturu regulišući ravnotežu između vazodilatacije i vazokonstrukcije. Takođe, reguliše deobu i migraciju glatkih mišićnih ćelija i interakciju limfocita sa zidom krvnog suda čime ostvaruje anti-inflamatornu ulogu. Svoju anti-

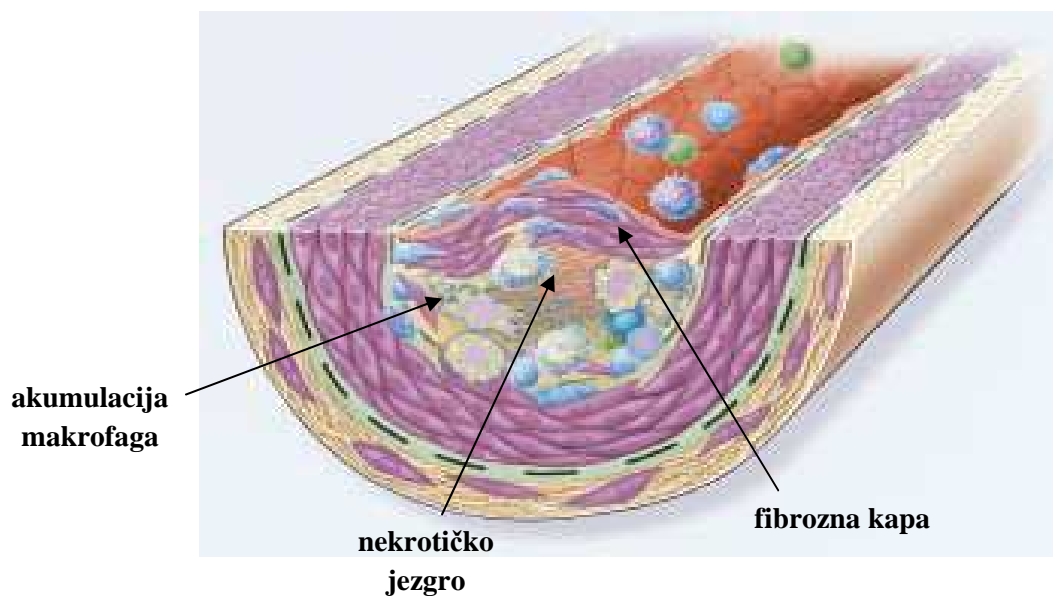
oksidativnu ulogu obavlja kroz sprečavanje modifikacije makromolekula u arterijskom zidu. Smatra se da je endotel najveći endokrini organ u telu čoveka (Higashi i sar., 2009).

Inicijalni korak u nastanku ateroskleroze je disfunkcija endotela krvnog suda. Endotelna disfunkcija pokreće čitav niz sukcesivnih reakcija koje dovode do nastanka ateroma: endotel postaje permeabilan i luče se brojni adhezivni molekuli, vazoaktivni molekuli, citokini (interleukini, interferoni, faktor nekroze tumora-TNF- α), faktori rasta; aktiviraju se trombociti, smanjuje se aktivnost fibrinolitičkog sistema i dolazi do hronične inflamatorne reakcije. Imunski odgovor je posredovan makrofagima i podtipovima T-ćelija. Ako inflamatorni odgovor ne neutrališe ili u potpunosti ne ukloni „iritirajući“ agens, inflamacija se nastavlja. Na ovaj se način početna lezija u vidu masne pruge razvija u intermedijernu leziju ili fibrozni plak. Lezija u vidu **masne pruge** može da se javi i kod novorođenčadi i dece u mlađem uzrastu i sastoji se iz penušavih ćelija (makrofaga koji su akumulirali este holesterola i lipidne perokside) i od T-limfocita (Slika 1). Ovo su neproliferativne lezije koje ne dovode do izdizanja endotelne površine.



Slika 1. Formiranje masne pruge (Ross, 1999)

Fibrozni plak nastaje progresijom masnih pruga uz nakupljanje lipida i kolagena i dolazi do proliferacije i migracije glatkih mišićnih ćelija iz medije u intimu krvnog suda i formira se karakteristična fibromuskularna kapa. Sloj glatkomišićnih ćelija i kolagena je tanak i kažemo da su to lokalizovane proliferacije na intimi krvnog suda. Pri produženoj inflamaciji, dolazi do zadebljavanja zida arterije, a arterija se sve više širi da bi lumen krvnog suda ostao nepromenjen (tzv. remodeliranje krvnog suda) (Glagov i sar., 1987). Dalja inflamacija dovodi do ciklusa akumulacije monocita i limfocita, migracije i proliferacije glatkih mišićnih ćelija, oslobađanja hidrolitičkih enzima, citokina, hemokina i faktora rasta i formiranja fibroznog tkiva koje vodi povećavanju i restrukturiranju postojećeg fibroznog plaka u **aterom** (Slika 2). Arterije više ne mogu da održavaju lumen dilatacijom, pa lezije ulaze u lumen krvnog suda i menjaju tok krvi.

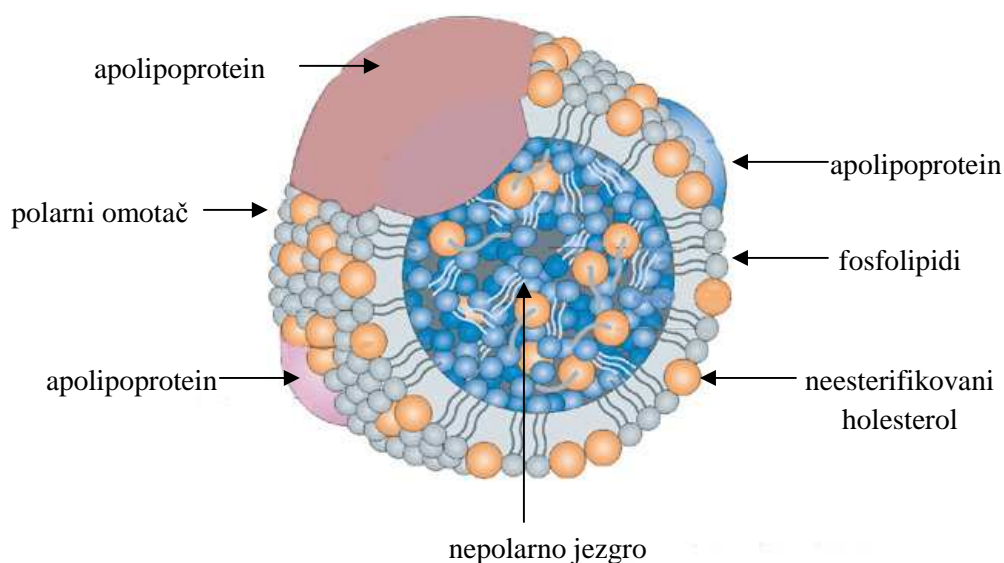


Slika 2. Aterom (Ross, 1999)

1.1.2. Poremećaj u metabolizmu lipida

1.1.2.1. Lipoproteini

Lipoproteini plazme (LP) su transportni oblici lipida u sistemskej cirkulaciji. Predstavljaju komplekse lipida (holesterola-esterifikovanog i neesterifikovanog, triglicerida, masnih kiselina i fosfolipida) i jednog ili više specifičnih proteina-apolipoproteina. Sfernog su oblika i sintetišu se u jetri i epitelnim ćelijama intestinuma. Građeni su od hidrofobnog jezgra i hidrofilnog omotača. Jezgro LP sadrži trigliceride, estre holesterola, masne kiseline i vitamine koji se rastvaraju u mastima. Omotač LP je građen od apolipoproteina, fosfolipida i holesterola (Slika 3)



Slika 3 Građa lipoproteinske čestice (Wasan i sar., 2008)

Trigliceridi su osnovni izvor energije i deponuju se u masnom tkivu, fosfolipidi grade ćelijske membrane, a holesterol takođe ulazi u sastav ćelijskih membrana i prekursor je za sintezu steroidnih hormona i žučnih kiselina. Organizam dobija

holesterol na dva načina: biosintezom u jetri (oko 70% holesterola) i unosom preko hrane (30%). Ako se u organizam unosi više holesterola smanjiće se sinteza u jetri. Samo hepatocite sintetišu holesterol, sve druge ćelije ga preuzimaju iz plazme u vidu lipoproteina male gustine (LDL) partikula.

LP se mogu klasifikovati na osnovu različitih fizičko-hemijskih osobina kao što su molekulska masa, flotaciona gustina, veličina i elektroforetska pokretljivost i na osnovu toga se dele na: hilomikrone, lipoproteine veoma male gustine (VLDL), lipoproteine srednje (intermedijarne) gustine (IDL), lipoproteine male gustine (LDL) i lipoproteine velike gustine (HDL). Gustina čestice je direktno proporcionalna sadržaju proteina, a obrnuto sadržaju lipida. Veličina LP čestica varira od 10 do 1000nm, a gustina od 0.9 do 1.21 g/mL.

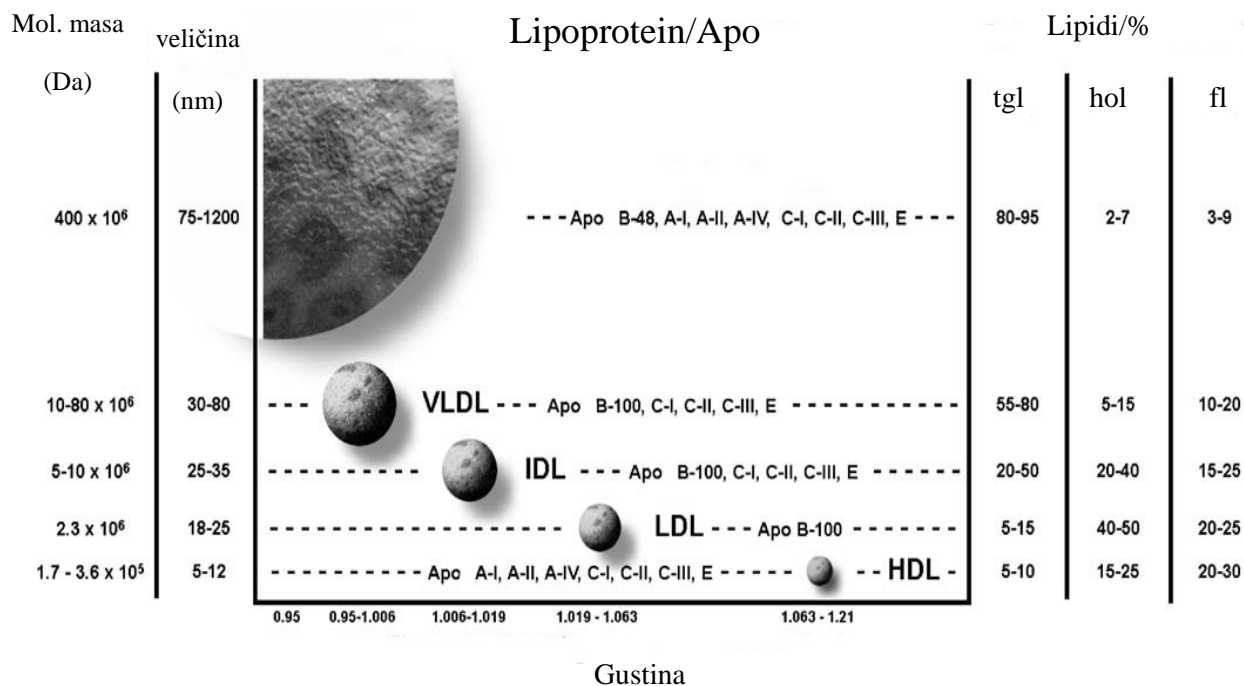
Hilomikroni su najveće (1200nm) i najmanje guste partikule (Slika 4). Sadrže 1-2% proteina, 80-95% triglicerida, 3-9% fosfolipida, ~3% estara holesterola i 2-7% holesterola. Hilomikroni sadrže nekoliko tipova apolipoproteina: apoA-I,II i IV, apoB-48, apo C-I,II i III, apoE (Saland i Ginsberg, 2007). Sintetišu se u intestinumu i transportuju egzogene trigliceride do adipoznog tkiva i mišića, a holesterol do jetre. Lipoprotein lipaza hidrolizuje trigliceride iz hilomikrona do monoacilglicerola i slobodnih masnih kiselina. Ostatke hilomikrona, koji sadrže holesterol, zahvaljujući apoE preuzima jetra receptor-posredovanom endocitozom.

Lipoproteini veoma male gustine (VLDL) su veličine 20-80nm i gustine ~1.00 (Slika 4). Sadrže 5-12% proteina, 55-80% triglicerida, 10-20% fosfolipida, 12-15% estara holesterola, i 5-15% holesterola. Od apolipoproteina sadrže apoB-100, apo C-I,II i III i apoE (Saland i Ginsberg, 2007). Nastaju u jetri i učestvuju u transportu endogenih triglicerida i holesterola do ekstrahepatičnih tkiva. Lipoprotein lipaza hidrolizuje trigliceride iz VLDL i na taj način nastaju manje čestice veće gustine (β -VLDL, IDL, LDL).

Lipoproteini srednje (intermedijarne) gustine (IDL) su manje (25-35nm) i gušće (1.0006-1.019) partikule u odnosu na VLDL. Sadrže 10-12% proteina, 20-50% triglicerida, 15-25% fosfolipida, 32-35% estara holesterola i 20-40% holesterola i iste apolipoproteine kao i VLDL (Slika 4).

Lipoproteini male gustine (LDL) su veličine 18-25nm i gustine 1.019-1.063. Sadrže 20-2% proteina, 5-15% triglicerida, 20-25% fosfolipida, 40-50% holesterola. Imaju samo apoB-100 (Saland i Ginsberg, 2007) (Slika 4). Predstavljaju krajnji produkt katabolizma VLDL čestica i prenose endogeni holesterol iz jetre do drugih tkiva. Ove partikule su podložne oksidaciji i zbog malog promera lako dospevaju u subendotel krvnog suda gde dolazi do niza procesa koji vode nastanku aterogenog plaka. Takođe, usled defektnog LDL receptora kod pacijenata obolelih od familijarne hiperholesterolemije, LDL se akumulira u plazmi i u najvećem broju slučajeva dolazi do nastanka koronarne bolesti srca.

Lipoproteini velike gustine (HDL) su najmanjeg dijametra (5-12nm) ali imaju najveću gustinu (1.063-1.12). Sadrže oko 55% proteina, 5-10% triglicerida, 20-30% fosfolipida, 15-25% holesterola. Imaju apoA-I, II i IV, apoC-I, II i III i apoE (Slika 4). Prenose holesterol iz perifernih tkiva do jetre odakle se on izlučuje u vidu žučnih kiselina (reverzni transport holesterola). Takođe, HDL čestice nose i antioksidativne enzime: paraoksonazu 1 (PON1), aktivirajući faktor trombocita (PAF-AH), ali i proteine koji vrše transfer lipida: lecitin:holesterol acil transferazu (LCAT) i holesteril estar transfer protein (CETP). Enzimi na ovim partikulama učestvuju u razgradnji ox-LDL i neutrališu njihov proinflamatorni efekat ali i sprečavaju ekspresiju adhezivnog vaskularnog molekula 1 (VCAM-1) (De Backer i sar., 2003). Iz tih razloga ove partikule se smatraju antiaterogenim, antiinflamatornim, antioksidativnim i vazodilatatornim. Smanjena koncentracija HDL-a predstavlja faktor rizika za nastanak ateroskleroze.



Slika 4. Klasifikacija lipoproteina na osnovu flotacione gustine (Saland i Ginsberg, 2007)

1.1.2.2. Modifikacija lipoproteina i aterogeneza

Brojne kliničke i epidemiološke studije su pokazale da su povišen nivo LDL partikula kao i njihova hemijska modifikacija faktori za početak rane ateroskleroze. LDL partikule u svom neizmenjenom obliku nisu aterogene Ali, izmenjene LDL partikule, koje mogu biti modifikovane oksidacijom, glikacijom, agregacijom, asocijacijom sa proteoglikanima ili inkorporacijom u imunske komplekse, su bitna stavka u inicijaciji ove bolesti. Biološki najreaktivnije su oksidovane LDL čestice (ox-LDL).

U odgovoru na povećan nivo holesterola u plazmi, smanjuje se njegov unos u ćelije nishodnom regulacijom ekspresije LDL receptora na njihovoj površini. Pošto je povećana koncentracija LDL partikula u krvotoku one su podložne modifikaciji od strane reaktivnih čestica kiseonika i azota, koje su produkti normalnog ćelijskog

metabolizma. Endotelne ćelije, glatke mišićne ćelije i makrofagi su glavni izvor oksidujućih čestica za oksidativnu modifikaciju makromolekula u subendotelu. U ranoj fazi, blaga oksidacija dovodi do nastanka minimalno modifikovanih LDL (mm-LDL) u subendotelnom prostoru kao posledice peroksidacije nezasićenih masnih kiselina u fosfolipidima i oksidacije lecitina. Modifikovane LDL su proinflamatorne jer stimulišu produkciju signalnih molekula i faktora rasta (vaskularni adhezioni molekul-1, VCAM-1, monocitni hemotaksični protein-1, MCP-1 i stimulišući faktor monocitnih kolonija, M-CSF) koji utiču na kretanje cirkulišućih monocita i T-limfocita i njihovu infiltraciju u subendotel krvnog suda i inflamacije. Takođe, dolazi i do proliferacije i diferencijacije monocita u makrofage (Madamanchi i sar., 2005).

Daljom oksidacijom dolazi do modifikacije lizinskih ostataka na apoB-100, koji su ključni za prepoznavanje LDL od strane specifičnih receptora. To dovodi do smanjenog afiniteta LDL partikula za LDL receptore. Vremenom LDL partikule toliko bivaju modifikovane (glikozilovane, ox-LDL ili u formi takozvanih završnih produkata glikozilacije – eng *Advanced Glycosilation Endproducts*, AGE čestice) da se više ne mogu unositi u makrofage putem LDL-receptora, već pomoću receptora-čistača (engl. *scavenger*). Karakteristika ovog receptornog puta jeste da nema nizvodne regulacije receptora, niti blokade sinteze intracelularnog holesterola inhibicijom enzima HMG-CoA reduktaze. Nekontrolisanim unosom ox-LDL makrofagi akumuliraju estre holesterola i lipidne perokside i prelaze u tzv. *penušave* ćelije (Vlassara, 1994; Jessup i sar., 2004).

Pored toga što su proinflamatorne, oksidativno modifikovane LDL partikule inhibiraju endotelnu azot-oksida sintetazu (eNOS) i utiču na pojavu vazokonstrukcije jer smanjuju količinu raspoloživog azot-oksida (NO). Oštećuju endotelne ćelije i dovode do apoptoze i nekroze vaskularnih ćelija, a to sve dovodi do „curenja“ ćelijskih lipida i lizosomalnih enzima koji pospešuju nastanak plaka. Dolazi do proliferacije makrofaga i glatkih mišićnih ćelija, sinteze i lučenja brojnih faktora rasta i proinflamatornih citokina iz okolnih ćelija, agregacije trombocita i debljanja intime krvnog suda i nastanak hipertenzije i ateroskleroze (Ross, 1999; Chisolm i Steinberg, 2000). Takođe, ove izmenjene čestice utiču na zadržavanje makrofaga u arterijskom zidu inhibirajući njihovu mobilnost. Povećana je i produkcija slobodnih radikala koji intenziviraju

oksidaciju LDL. Citotoksični efekat dovodi do povećanja koncentracije kalcijuma u endotelnim ćelijama što inicira endotelnu disfunkciju. Penušave ćelije vremenom propadaju i od ćelijskog detritusa formira se lipidno jezgro ateromatoznog plaka (Haffner, 1999).

Specifična arterijska mesta, kao što su račve i krivine, dovode do akumuliranja viškova cirkulišućih LDL, do oštećenja endotela na ovim mestima i do promena u protoku krvi. Na ovakvim mestima u endotelu se eksprimiraju specifični molekuli koji su odgovorni za adheziju, migraciju i akumulaciju monocita i T-limfocita. Promene u krvotoku menjaju ekspresiju gena koji u svom promotorskom regionu imaju elemente koji reaguju na trenje, a to su uglavnom geni koji daju informaciju za sintezu adhezionih molekula. Promene u krvotoku određuju koja će mesta u zidu arterije „dobiti“ leziju (McMillan, 1985).

1.1.3. Oksidativni stres

Oksidativni stres igra ključnu ulogu u oštećenju endotela i u modifikaciji ključnih makromolekula. Takođe, sve ćelije i svi signalni molekuli uključeni u proces aterogeneze utiču na produkciju velike količine slobodnih radikala koji dalje podstiču napredovanje ateroskleroze.

Reaktivne vrste kiseonika i azota (RVO i RVN) su produkti normalnog ćelijskog metabolizma i u zavisnosti od nivoa produkcije mogu imati povoljne ili štetne efekte. Pri niskim koncentracijama imaju ulogu u odbrani organizma od infektivnih agenasa i u različitim signalnim putevima. Pri povišenim koncentracijama ovih reaktivnih vrsta govorimo o oksidativnom i nitrosativnom stresu koji se dešavaju i/ili pri jako visokoj produkciji reaktivnih vrsta kiseonika i azota i/ili usled oslabljene antioksidativne zaštite.

Reaktivne vrste kiseonika. Oksidativni stres potiče od metaboličkih reakcija koje koriste kiseonik i predstavlja poremećenu ravnotežu između produkcije reaktivnih vrsta kiseonika i antioksidativne zaštite. RVO mogu oštetiti makromolekule i inhibirati

njihove funkcije, a proizvode ih različiti enzimi koji učestvuju u ćelijskim oksidativnim procesima kao što su nikotinamid-adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaza, ksantin oksidaze (XO), nespregnute endotelne azotoksid sintetaze (eNOS) i mnogi drugi pomoću kojih kiseonik podleže univalentnoj redukciji do superoksid anjona (O_2^-). Tu su i ciklooksigenaza, lipooksigenaza ali i mitohondrijski transport elektrona koji neenzimskim putem, zahvaljujući interakciji kiseonika sa redoks aktivnim jedinjenjem ubikvinonom, stvara O_2^- .

Slobodni radikali su molekuli koji imaju nesporene jedan ili dva elektrona i veoma su reaktivni, a oni poreklom od kiseonika su biološki najznačajniji. Superoksid anjon (O_2^-) je primarna reaktivna kiseonična vrsta koja utiče na vazokonstrikcije i odgovoran je za eliminaciju NO iz zida krvnog suda. Superoksid anjon može reagovati sa drugim molekulima i na taj način nastaju sekundarne reaktivne kiseonične vrste. Tokom procesa stvaranja adenozin tri fosfata (ATP), iz mitohondrija može doći do "curenja" elektrona koji mogu uticati na stvaranje superoksid anjona. Takođe, superoksid anjon se stvara u samim mitohondrijama i izlazi iz njih difuzijom kroz membrane. Povišena produkcija O_2^- u uslovima stresa oslobađa gvožđe (Fe^{2+}) iz molekula kao što je hemoglobin što dovodi do nastanka hidroksi radikala (OH) u tzv. Fentonovoj reakciji. Hidroksi radikal ima veoma kratko vreme poluživota (10^{-9} s) i oksiduje ono što mu se nađe u okruženju. Vodonik peroksid (H_2O_2) je mala, nenaelektrisana reaktivna čestica koja nema slobodan elektron i nije slobodni radikal, ali se smatra visoko reaktivnom kiseoničnom vrstom i lako difunduje kroz ćelijske membrane. U fiziološkim uslovima, H_2O_2 nastaje od kiseonika u peroksimima iz kojih se i oslobađa.

Reaktivne vrste azota. Azot oksid (NO), mali molekul koji sadrži nesporeni elektron, je slobodni radikal koji ima ulogu signalnog molekula u brojnim fiziološkim procesima kao što su regulacija krvnog pritiska, neurotransmisija, regulacija imunskog odgovora. U inflamaciji imuni sistem proizvodi superoksid anjon i azot-oksidi koji interaguju međusobno i nastaje peroksininitrit anjon ($ONOO^-$) koji utiče na fragmentaciju DNK molekula i na lipidnu peroksidaciju (Pacher i sar., 2007).

Antioksidativna zaštita. Antioksidativni sistemi su kompleksni i multifaktorski. Njihova uloga je da neutrališu RVO i RVN. Antioksidativni sistem čine enzimi i

neenzimski antioksidanti. U biološkim sistemima $O_2^{\cdot-}$ se prevodi u H_2O_2 u prisustvu enzima superoksid-dizmutaze (SOD), a zatim se u prisustvu enzima katalaze i glutation-peroksidaze (GH-Px) razlaže do vode. Nedovoljna funkcionalnost i/ili koncentracija enzima i drugih proteina i molekula koji učestvuju u antioksidativnoj zaštiti su u osnovi poremećaja koji vode inicijaciji aterogeneze.

Postoje brojni dokazi da oksidativni stres utiče na pojavu kardiovaskularnih bolesti, i u slučaju hiperprodukcije RVO i/ili u slučaju poremećenih sistema antioksidativne zaštite (Schachinger i sar., 2000; Heitzer i sar., 2001; Gokce i sar., 2002).

Faktori rizika za nastanak ateroskleroze su udruženi sa povećanom produkcijom oksidativnih čestica. Starost je nezavisan faktor rizika za aterosklerozu i povezana je sa pojačanim oksidativnim stresom. Zapaženo je da u uslovima hiperholesterolemije dolazi do disfunkcije endotela i do povišenog nivoa $O_2^{\cdot-}$. LDL čestice u svom nepromenjenom obliku mogu da povećaju produkciju $O_2^{\cdot-}$ (Rueckschloss i sar., 2001), a i povišen nivo LDL u krvi dovodi do povećane infiltracije ovih lipoproteina u subendotel krvnog suda i do pojačane aktivacije NADPH oksidaze. Kod povišenog krvnog pritiska aktiviran je renin-angiotenzin sistem što dovodi do povišenog nivoa angiotenzina II (Ang II) koji utiče na povećano stvaranje superoksid anjona jer stimuliše NADPH oksidazu, a aktivnost ovog enzima dovodi do stvaranja ONOO- jer smanjuje raspoloživost NO i na taj način doprinosi pro-aterogenom efektu Ang II (Ferrario i sar., 2004). Takođe, Ang II stimuliše makrofage da preuzimaju ox-LDL i povećava ekspresiju inflamatornih faktora (citokina, adhezionih molekula). Mehanički stres koji nastaje pri jačem pritisku krvi na krvni sud u uslovima hipertenzije dovodi do disfunkcije endotela i inicira kaskadu događaja koji takođe vode ka pojačanom oksidativnom stresu. Hiperhomocisteinemija je nezavisni faktor rizika za nastanak koronarne bolesti srca. Povećana koncentracija homocisteina u plazmi smanjuje koncentraciju NO i utiče na smanjenu dilataciju perifernih krvnih sudova i malih koronarnih arterija (Ungvari i sar., 2003). Uočeno je da je kod hiperhomocisteinemije povećana sinteza TNF- α koji utiče na povećanu aktivnost NADPH oksidaze i povećane koncentracije $O_2^{\cdot-}$ prvenstveno u koronarnim arteriolama (Ungvari i sar., 2003).

1.1.4. Diabetes mellitus i mehanizmi nastanka ateroskleroze

Diabetes mellitus je faktor rizika za nastanak ateroskleroze. Kao i ateroskleroza, ovo oboljenje je progresivno i povezano sa pojavom oksidativnog stresa. I insulin-zavisni (tip 1) i insulin-nezavisni diabetes (tip 2) se karakterišu hiperglikemijom. Hiperglikemija može indukovati oksidativni stres putem nekoliko različitih mehanizama. Autooksidacija glukoze i neenzimska glikozilacija proteina i lipida generišu superoksid anjon, a stimulisani su i NADPH oksidaza i elektron-transportni lanac u mitohondrijama (Baynes i Thorpe, 1999; Kaneto i sar., 2010).

U brznoj i reverzibilnoj reakciji između redukovanih šećera i proteina prvo se formiraju nestabilne Šifove baze, a zatim se stvaraju stabilni i ireverzibilni završni produkti glikozilacije (AGE produkti). Ovi produkti se vezuju za specifične receptore na površini ćelija i interferiraju sa unutarćelijskim signalnim putevima koji dovode do proinflamatornih odgovora ćelije, a javljaju se i protrombotički efekti. Takođe, H_2O_2 i organski peroksidi utiču na formiranje jonopora i dovode do poremećaja u radu kalcijumovih pumpi, usled čega dolazi do influksa kalcijuma u ćelije (Elliot i sar., 1992).

Povećana koncentracija intraćelijskog kalcijuma je praćena aktivacijom protein kinaze C (PKC), tj PKC β izoforme koja se nalazi na površini endotelnih ćelija. Aktivira se pomoću diacilglicerola u uslovima povišene koncentracije glukoze i masnih kiselina. Dolazi do inaktivacije eNOS i smanjene koncentracije NO ali i do pojačane inflamacije i disfunkcije endotela. NO, pod dejstvom superoksid anjon radikala prelazi u peroksinitrit, pa se količina raspoloživog NO i na ovaj način umanjuje. Takođe, pojačano je stvaranje ox-LDL jer LDL ulaze i zadržavaju se u zidu arterija, a usled pojačanog oksidativnog stresa kod dijabetičara ove partikule progresivno bivaju oksidovane.

Usled hiperglikemije povećana je koncentracija slobodnih masnih kiselina, različitih citokina inflamacije (npr TNF α) i javlja se insulinska rezistencija. Dolazi do trovanja β -ćelija pankreasa glukozom i do njihove apoptoze. Povećana produkcija RVO

aktivira signalni put c-Jun N-terminalne kinaze (JNK) što vodi promeni u regulaciji transkripcije i smanjuje se sinteza i lučenje insulina (Kaneto i sar., 2010; Wellen i Hotamisligil, 2005).

Pored visokog nivoa reaktivnih vrsta kiseonika, kod obolelih od dijabetesa uočena je i oslabljena antioksidativna zaštita.

Diabetes mellitus tip 2 je najčešće metaboličko oboljenje sa mikrovaskularnim i makrovaskularnim komplikacijama. Ovo stanje je povezano sa insulinskom rezistencijom i sličnim metaboličkim abnormalnostima, uključujući hiperglikemiju, hipertenziju, dislipidemiju sa niskom koncentracijom HDL i povišenom koncentracijom triglicerida i slobodnih masnih kiselina. Predstavlja heterogenu grupu metaboličkih bolesti koju karakteriše hiperglikemija. Prema savremenoj, etiološkoj klasifikaciji klinički manifestnog dijabetesa (Expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus, 2002) postoje četiri osnovne kategorije ove bolesti: tip 1 dijabetes, tip 2 dijabetes, drugi specifični oblici šećerne bolesti i gestacijski dijabetes.

I pored svetskog trenda da se broj kardio-vaskularnih bolesti (KVB) smanji uticanjem na faktore rizika, Evropska Asocijacija za Studije Dijabetesa (EASD) objavila je da u 2011 godini 366 miliona ljudi boluje od dijabetesa, a da svake godine od ove bolesti umre oko 4,6 miliona ljudi širom sveta (EASD, 2012). U Republici Srbiji, bez Kosova i Metohije, od DM boluje približno 8,2% populacije. Broj osoba sa T2DM je mnogostruko veći (95%) u odnosu na osobe sa tipom 1. Najmanje polovina osoba sa T2DM ne zna za svoju bolest, a stvaran broj umrlih od dijabetesa je daleko veći od prikazanog jer se prave greške prilikom šifriranja uzroka smrti i dijabetes se često evidentira kao osnovni uzrok smrti, naročito kod umrlih od infarkta, šloga i hronične bubrežne insuficijencije (Institut za javno zdravlje Srbije, 2011)

1.1.5. Genetička osnova ateroskleroze

Aterogeneza obuhvata složene mehanizme i veliki broj tipova ćelija, organa i fizioloških procesa, pa je i genetička osnova ateroskleroze veoma kompleksna. Studije

na miševima su pokazale postojanje više od 100 gena koji mogu uticati na nastanak aterosogenih lezija. Studije na jednojajčanim blizancima su pokazale da genetička osnova utiče na pojavu srčanih oboljenja gotovo u istoj meri kao i drugi faktori rizika (Lusis i sar., 2004). Većina oblika ateroskleroze je posledica interakcije velikog broja gena koji mogu imati različit efekat na ispoljavanje bolesti ali je dejstvo gena uglavnom uvek modifikovano uticajem sredine. Međutim, postojanje nekolicine oboljenja, koja za osnovu imaju promenu u jednom ili najviše dva gena, govori u prilog tome da ateroskleroza može biti i posledica uticaja jednog ili dva gena sa velikom penetrabilnošću, a ne samo multifaktorsko oboljenje.

Familijarna hiperholesterolemija (FH) je najbolje proučen poremećaj u metabolizmu lipida. To je poremećaj koji se nasleđuje autozomno dominantno i 1 u 500 osoba iz opšte populacije je heterozigot za mutaciju u genu za LDL receptor, odnosno obolela dok je u homozigotnom stanju veoma retka (1 u 1 000 000) (Goldstein i Brown, 2009). Bolest karakterišu veoma visoke vrednosti holesterola i LDL-a, a najznačajnije manifestacije su rana pojava ateroskleroze. Homozigoti za mutaciju veoma rano umiru, najčešće od infarkta miokarda. Gen za LDL receptor može biti pogođen različitim tipovima mutacija, a one su uzrok poremećaja u broju, funkciji ili obradi receptora za LDL (LDLR). Do danas je opisano oko 200 mutacija, a najveći broj su takozvane 'privatne' mutacije, odnosno mutacije koje su karakteristične za jednu porodicu. Takođe, ono što je uobičajeno za obolele jeste da nose dve različite mutacije, tj da su složeni heterozigoti.

Familijarni defektni apoB-100 je druga relativno česta hiperholesterolamija (1/800) i posledica je mutacije u genu za apolipoprotein B, i to u delu koji daje informaciju za sintezu LDL-vezujućeg domena. Opisano je 5 mutacija u ovom delu APOB gena i sve su povezane sa smanjenim afinitetom vezivanja apoB za LDL, što vodi njihovoj povećanoj koncentraciji u krvi. Nasleđuje se autozomno dominantno i fenotipski se ispoljava kao FH (Fouchier i sar., 2009).

Tangijerova bolest je redak monogeniski poremećaj koji se nasleđuje autozomno recesivno i karakteriše se delimičnim (u heterozigotnom stanju) ili potpunim (u homozigotnom stanju) odsustvom HDL partikula u serumu, ali i akumulacijom holesterol estara u makrofagima različitih tkiva. Mutacija u ABCA1 transporteru

onemogućava da se putem aktivnog transporta holesterol izbaci iz ćelija perifernih tkiva, pa je jedna od karakteristika bolesti i rana pojava ateroskleze. Bolest se javlja u detinjstvu, a smatra se da je učestalost bolesti 1:1 000 000 (ORPHA, 2012; OMIM, 2012)

Sitosterolemija (fitosterolemija) je retko oboljenje koje se nasleđuje autozomno recesivno a karakteriše se visokim vrednostima biljnih sterola u plazmi. Dolazi do poremećaja usled povećane apsorpcije fitosterola i smanjene ekskrecije putem žuči, što između ostalog, dovodi i do rane pojave ateroskleroze. Uzrok nastanka ove bolesti nalazi se u brojnim mutacijama u genima za transportere ABCG5 i ABCG8. Do danas je opisano 45 slučajeva sitosterolemije (ORPHA, 2012; Lee i sar., 2001)

Homocistinurija je retko oboljenje koje se nasleđuje autozomno recesivno sa učestalošću 1-9 obolelih u 1 000 000. U osnovi ovog oboljenja je deficit enzima cistation beta sintetaze (CBS) koji se manifestuje 12 puta višim nivoom homocisteina u plazmi (ORPHA, 2012).

1.2. Genetički polimorfizmi

Projekat genoma čoveka (1990-2005) pokazao je da imamo oko 25 000 gena koji čine samo 2% ukupne genomske DNK. Ostatak genoma čoveka sastavljen je od repetitivnih sekvenci koje su mahom transkripciono neaktivne. Njihova uloga još nije u potpunosti rasvetljena, ali se pretpostavlja da deo tih sekvenci, koje su ostale očuvane tokom evolucije, ima ulogu u modulaciji genske ekspresije (Turnpenny i Ellard, 2009). Na ovaj način se ostvaruje specifična regulacija aktivnosti gena u različitim tipovima ćelija i u različitim fazama ćelijskog ciklusa.

Varijacije u naslednoj osnovi koje se normalno sreću u populaciji zdravih ljudi nazivamo polimorfizmom. Pojava dve ili više formi nekog gena (alela) sa pojedinačnom učestalošću višom od 1% predstavlja genski polimorfizam. Aleli sa učestalostima manjim od 1% smatraju se retkim varijantama.

1.2.1. Tipovi polimorfizama i mehanizmi njihovog nastanka

Polimorfizmi su posledica mutacija koje mogu biti u vidu zamene jedne baze do variranja u segmentu od čak nekoliko stotina baza. Postoje tri osnovna tipa DNK polimorfizma:

polimorfizam pojedinačnih nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism-SNP*)

polimorfizam broja uzastopnih ponovaka (engl. *Variable Number of Tandem Repeats- VNTR*)

inerciono/delecioni polimorfizam.

Polimorfizam pojedinačnih nukleotida je najčešći izvor genetičkih varijacija u ljudskom genomu i obuhvata oko 90% svih DNK polimorfizama. Nastaje usled mutacija tipa zamene jednog nukleotida drugim (tačkasta mutacija). Tranzicije su zamene bazom istog tipa (purinske baze: A→G ili G→A, pirimidinske baze: C→T ili T→C), dok su transverzije zamene bazom drugog tipa (purin u pirimidin ili obrnuto).

Ukoliko se SNP nalazi u intronu, 5' regulatornom regionu, 3' regionu koji se ne prevodi ili na onim nukleotidnim pozicijama unutar kodona (uglavnom treća pozicija) čija zamena ne dovodi do zamene aminokiseline, one neće uticati na strukturu proteina i to su tzv *tihe* ili *sinonimne* mutacije. Ako mutacija dovodi do promene u polipeptidu, ona je označena kao *nesinonimna*. Zapaženo je da se nesinonimne mutacije javljaju ređe nego sinonimne. Ukoliko usled supstitucije dođe do zamene kodona za jednu aminokiselinu kodonom za drugu i dođe do promene aminokiseline u odgovarajućem proteinu tada se govori o mutaciji sa pogrešnim kodirajućim značenjem (*missense*). Besmislene (*nonsense*) mutacije nastaju kada se kodon za jednu aminokiselinu zameni jednim od tri stop-kodona, i dovode do prekida sinteze polipeptidnog lanca. Bilo koji tip tačkastih mutacija u promotorskom regionu može promeniti interakciju sa transkripcionim faktorom, i dovesti do smanjene ili do prekomerne ekspresije polipeptida što može imati različite posledice.

Polimorfizmi broja uzastopnih ponovaka su visokopolimorfni zbog prisustva različitog broja tandemskih ponovaka kratkih DNK sekvenci za koje je dokazano da se nasleđuju kodominantno po Mendelovim pravilima. Dva tipa VNTR su *minisateliti* (ponovci do 10-15 baznih parova) i *mikrosateliti* (ponovci do 5 baznih parova)

Inserciono/delecioni polimorfizmi mogu obuhvatiti jedan bazni par ili mikrosatelitne i/ili minisatelitne ponavljajuće sekvence. Delecije i insercije baza mogu biti sa promenom okvira čitanja (engl. *frameshift* mutacije) a sreću se i delecije i duplikacije čitavih gena.

U analizi poligenskih poremećaja primenjuju se populacione studije asocijacije. U studijama asocijacije ispituje se zastupljenost određenih genskih polimorfizama kod pacijenata i porede se sa njihovom zastupljenošću kod zdravih

osoba. Na taj način se utvrđuje eventualna povezanost polimorfizma sa pojavom bolesti (Thompson i sar., 1991). SNP-ovi su veoma informativni i učestali u opštoj populaciji i iz tog razloga se primenjuju u ovakvom tipu studija. Alel ili genotip je povezan sa povećanim rizikom kada je njegova učestalost statistički značajno veća kod pacijenata nego u kontrolnoj grupi.

Osetljivost na oksidativni stres udružena sa aterosklerozom verovatno ima genetičku pozadinu. Takođe, hipertenzija, hiperlipidemija i diabetes su multifaktorski poremećaji sa jasnim genetičkim udelom. Nepovoljna kombinacija većeg broja polimorfizama koji imaju ulogu u oksidativnom stresu je povezana sa stepenom oboljenja kod dijabetičara i sa progresijom ateroskleroze kod njih. Veliki broj obolelih od dijabetesa i kardiovaskularnih bolesti u čijoj osnovi je ateroskleroza nemaju ni jedan od klasičnih faktora rizika. Takođe, veliki je broj gena kandidata čije mutacije/polimorfizmi se dovode u vezu sa osetljivošću na oksidativni stres. To su ili geni odgovorni za sintezu enzima koji učestvuju u produkciji ćelijskih reaktivnih vrsta kiseonika ili enzima/proteina sa antioksidativnom ulogom.

SNP-ovi se danas proučavaju kao potencijalni genetički markeri predispozicije za nastanak oboljenja. Analiza polimorfizama u genima čiji produkti ispoljavaju antioksidativna svojstva i imaju ulogu u metabolizmu lipida, a samim tim mogu biti povezani sa povećanom osetljivošću na oksidativni stres, u mnogome bi doprinela ukupnoj slici o ovom patološkom stanju i bolestima koje se razvijaju kao njegova posledica. Za ovu studiju asocijacije odabrani su geni čiji produkti imaju antioksidativnu ulogu u plazmi i ćeliji (pon1), antioksidativnu ulogu i ulogu u metabolizmu lipida u plazmi i ćeliji (apoE) i antioksidativnu i detoksifikujuću ulogu u ćeliji (GSTM1, GSTT1, GSTP1)

1.3. Oksidativni stres i metabolizam lipida-apolipoprotein E

1.3.1. Apolipoproteini

Apolipoproteini su specifični proteini koji se nalaze na površini lipoproteinskih partikula. Imaju ulogu u regulaciji lipidnog metabolizma: određuju specifičnu ulogu svakog tipa LP u lipidnom metabolizmu, vrše transport i redistribuciju lipida zahvaljujući interakciji sa specifičnim lipoproteinskim receptorima na površini ćelije pa i regulišu nivo LP u plazmi. Kao kofaktori enzima omogućavaju aktivaciju i funkcionisanje enzimskih reakcija u ovom metaboličkom putu (npr. reakcija lecitin:holesterol aciltransferaze (eng. LCAT) se aktivira u prisustvu apoA-I), a zajedno sa fosfolipidima stvaraju hidrofilnu površinu LP partikule i tako stabilizuju i održavaju njihovu strukturu.

Apolipoproteini plazme su grupisani u pet tipova: A, B, C, D i E, a neki od njih su podeljeni na podtipove, npr. A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III.

1.3.2. Apolipoprotein E

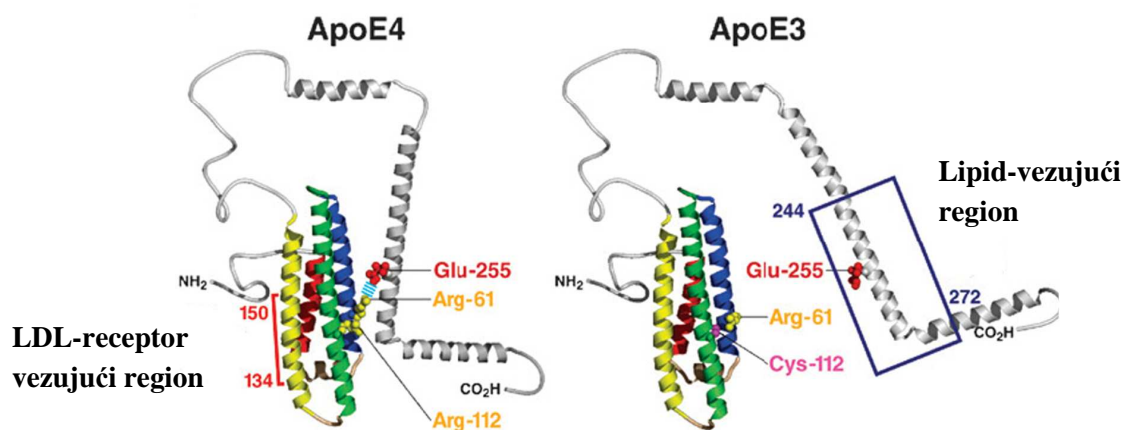
Apolipoprotein E (apoE), slično drugim apolipoproteinima, učestvuje u metabolizmu lipoproteina, stabilizuje i održava strukturni integritet lipoproteina, služi kao kofaktor u enzimskim reakcijama i kao ligand za lipoproteinske receptore, a uključen je i u reverzni transport holesterola. Takođe, apoE ima i anti-aterogena svojstva, inhibira proliferaciju T-ćelija, utiče na proliferaciju glatkih mišićnih ćelija u zidovima krvnih sudova i ima antioksidativna svojstva. Pokazano je da učestvuje i u zapaljenskim procesima i u osetljivosti na infektivne bolesti. ApoE je jedan od glavnih proteinskih konstituenata nekoliko lipoproteinskih klasa (Slika 4). Najveća sinteza apoE je u jetri (>75%), zatim u mozgu, intersticijalnoj tečnosti, a u manjem obimu se sintetiše

i u tankom crevu, bubrezima, slezini, nadbubrežnoj žlezdi, jajnicima, placenti, testisima. Makrofagi i drugi tipovi ćelija takođe sintetišu apoE. ApoE poreklom iz makrofaga se u velikoj količini može naći na mestu nastanka aterogenog plaka gde utiče na mnoge procese kao što su agregaciju trombocita (Riddell i sar., 1997), efluks holesterola iz makrofaga (Bellosta i sar., 1995), ekspresija adhezionih molekula od strane endotelnih ćelija (Stannard i sar., 2001) i inhibicija proliferacije i migracije glatkih mišićnih ćelija (Zeleny i sar., 2002).

1.3.2.1. ApoE-struktura

ApoE je monomerni glikoprotein molekulske mase 34 kDa koji se sastoji iz 299 amino kiselina. U svom sastavu ima 10% arginina što ga čini „argininom bogatim proteinom“ (Shore i Shore, 1973). Sintetiše se kao polipeptid od 317 aminokiselina, ali transportom kroz membranu endoplazmatičnog retikuluma dolazi do posttranslacionog cepanja signalnog peptida od 18 aminokiselina i nastanka zrelog proteina. ApoE se iz ćelija luči kao O-glikozilirani protein.

ApoE ima dva strukturna domena, N-terminalni domen i C-terminalni domen a između njih se nalazi centralni deo u vidu šarke (Slika 5) N-terminalni domen (1.-191. aminokiseline) sadrži receptor-vezujući region (134.-150. i 172. aminokiseline) i formira 4 antiparalelno postavljena α -heliksa. C-terminalni domen (225.-299. aminokiseline) sadrži glavni lipid-vezujući region (244.-272. aminokiseline) (Mahley i Rall, 2000). U odsustvu lipida apoE podleže samoagregaciji gradeći tetramer.



Slika 5. Struktura apoE (Mahley i sar., 2009)

1.3.2.2. ApoE-gen i polimorfizmi

Kod ljudi, gen za apoE se nalazi na hromozomu 19 (19q3.2), u genskom klasteru koji čine geni za apo C-I, C-II, C-IV i pseudogen C-I (Allan i sar., 1995). Sastoji se od 3597 nukleotida, a kodira iRNK od 1163 nukleotida. Gen ima četiri egzona i tri introna i sadrži multiple ponovke od 66 baznih parova (Paik i sar., 1985).

Zamena TGC→CGC u egzonu 4 apoE gena, određuje tri kodominantna alela (ϵ_2 , ϵ_3 , i ϵ_4) koji u populacijama ljudi daju informaciju za sintezu tri proteinske izoforme: apoE2, E3 i E4 (Mahley i Rall, 2009). Ove tri izoforme razlikuju se u dve amino-kiseline na pozicijama 112 i 158. Izoforma E3 sadrži cistein na poziciji 112 i Arginin na poziciji 158 (Cys112; Arg158), apoE4 izoforma sadrži arginin na obe pozicije (Arg112; Arg158), a izoforma apoE2 cistein na obe pozicije (Cys112; Cys158) (Tabela 1)

Tabela 1. Aleli apoE gena i proteinske izoforme apoE

Alel	apoE 112	apoE 158	protein
ε2	TGC→Cys	TGC→Cys	ApoE2: Cys112/Cys158
ε3	TGC→Cys	CGC→Arg	ApoE3: Cys112/Arg158
ε4	CGC→Arg	CGC→Arg	ApoE4: Arg112/Arg158

Posmatrajući celokupnu ljudsku populaciju, alel ε3 je najzastupljeniji (60-90%), alel ε4 je zastupljen sa 10-20%, a alel ε2 sa 0-20% (Singh i sar., 2006). Takođe, alel ε4 je učestaliji u populacijama na severu Evrope (~14-19%) u odnosu na populacije Južne Evrope (~7-12%). Analizirane populacije u Africi, Japanu, kod Amerikanaca meksičkog porekla i američkih Indijanaca pokazuju ili nisku učestalost alela ε2 ili on uopšte nije detektovan (Eichner i sar., 2002).

Smatra se da je apoE gen divergirao od gena za apo A-I i A-VI (hromozom 11) (Li i sar., 1988). Analiza sekvence gena za apoE kod šimpanzi pokazala je da je sličan sekvenci alela ε4 kod ljudi, a da su aleli ε2 i ε3 divergirali od predačkog ε4 (Fullerton i sar., 2000). Alel ε3 je favorizovan u odnosu na ε4 verovatno usled selektivnog pritiska infektivnih bolesti na populacije ljudi: prvobitni ε4, koji je 'štiti'o od specifičnih endemskih infektivnih bolesti (npr., parazitskih bolesti), zamenjen je alelom ε3 koji je bio delotvorniji protiv novih infektivnih bolesti virusnog porekla (kuga, male boginje) koje su nastale usled promena načina života tj formiranjem naselja (Mahley i sar., 2009; Fullerton i sar., 2000; Hanlon i Rubinsztein, 1995; Seixas i sar., 1999). Odsustvo asocijacije ε4 alela sa bolestima koje pogađaju afričke populacije u sub-Saharskom predelu i prisustvo te asocijacije kod Afro-Amerikanaca daje potvrdu da je alel ε4 u kombinaciji sa zapadnjačkim načinom života faktor rizika za nastanak kardiovaskularnih i neurodegenerativnih oboljenja (Corbo i Sacchi, 1999).

Pored ova tri alela, detektovano je oko 30 varijanti u kodirajućem regionu i oko 18 u nekodirajućem regionu ovog gena (Nickerson i sar., 2000).

Postojanje tri alela apoE gena određuje postojanje 6 genotipova (ϵ 2/2, 2/3, 2/4, 3/3, 3/4, 4/4) i 6 različitih fenotipova: E 2/2, E2/3, E2/4, E3/3, E3/4, E4/4 (Hatters i sar., 2006).

1.3.2.3. Uloga apoE u metabolizmu lipida

Postojanje razlika u aminokiselinskom sastavu vode strukturnim razlikama među izoproteinima koje utiču i na njihovu funkciju. Izoforme proteina apoE se međusobno razlikuju i po afinitetu vezivanja za LDL receptor i po afinitetu vezivanja za lipoproteinske partikule (Eichner i sar., 2002).

ApoE se vezuje za različite receptore na površini ćelija: LDL (B/E) receptor, LDL receptor vezujući protein (LRP), apolipoprotein E receptor 2 (apoER2), VLDL receptor ('remnant' ili apoE), i na taj način ostvaruje svoju metaboličku ulogu. Vezivanjem za receptore u ćelijama jetre omogućava metabolizam ostataka hilomikrona, a interakcijom sa receptorima u perifernim tkivima omogućava metabolizam VLDL i VLDL ostataka (β -VLDL).

Procenjeno je da je 60% varijacije u nivou plazminog holesterola genetički determinisano, a od toga je približno 14% povezano sa apoE polimorfizmima (Davignon i sar., 1988).

Kod apoE2, zamena Arg sa Cys na poziciji 158 dovodi to toga da ova izoforma ima 50-100 puta slabiji afinitet za LDL-R (Weisgraber i sar., 1982). To dovodi do odložene razgradnje hilomikrona i VLDL ostataka i nakupljanja ovih partikula u plazmi. Takođe, slabija je i apoE posredovana konverzija VLDL u LDL što vodi nakupljanju VLDL i nižom produkcijom LDL (Ehnholm i sar., 1984). Niži unos holesterolom bogatih partikula u jetru i smanjena proizvodnja LDL partikula vodi povećanoj sintezi LDL (B/E) receptora što pak vodi povećanom unosu LDL u jetru i smanjenom koncentracijom u plazmi. Iz tih razloga većina ϵ 2/ ϵ 2 osoba ima niži i ukupni i LDL

holesterol u plazmi, ali i povišen nivo triglicerida. To može dovesti do nastanka tip III hiperlipoproteinemije, retkog oboljenja koje se karakteriše ranom pojavom ishemijske bolesti srca ili periferne arterijske bolesti i otkrivena je kod homozigota ϵ_2/ϵ_2 (0,5-1,0 na 100 obolelih u kavkaskim populacijama) (Davignon i sar., 1988; Stengård i sar., 1995).

Kod apoE3 i apoE4 postoji Arg na poziciji 158 koji povećava pozitivan potencijal, i vezivanje za LDL-R je mnogo bolje. LP koji sadrže apoE4 se brže razgrađuju. U ovom slučaju povećan je unos triglicerida i holesterola u jetru. Takođe, povećan je stepen konverzije VLDL ostataka u LDL, što vodi povećanoj koncentraciji LDL u plazmi. Povećan unos holesterola u jetru i povišen nivo LDL vodi smanjenoj sintezi LDL (B/E) receptora što se manifestuje u vidu povišenog nivoa LDL i skoro nepromenjenog nivoa triglicerida u plazmi (Davignon i sar., 1988).

Različite izoforme apoE imaju afinitete za različite LP partikule. ApoE2 se više vezuju za male, fosfolipidima bogate HDL čestice, a apoE4 se uglavnom vezuju za veće, trigliceridima bogate VLDL i IDL. Ova razlika u afinitetima je određena međusobnom interakcijom N- i C- terminalnih domena proteina. ApoE4 je kompaktniji u odnosu na druga dva izoproteina i zbog Arg-112 ima veći afinitet za VLDL (Dong i Weisgraber, 1996). Brojne studije su pokazale da osobe koje nose ϵ_2 alel imaju niži ukupni holesterol i niži LDL holesterol u plazmi za 10% u odnosu na ϵ_3/ϵ_3 osobe, a osobe koje imaju ϵ_4 alel imaju povišen nivo holesterola i LDL u plazmi za oko 5% u odnosu na homozigote za ϵ_3 alel ($\epsilon_2/\epsilon_2 < \epsilon_3/\epsilon_2 < \epsilon_3/\epsilon_3 < \epsilon_4/\epsilon_-$).

Genotipovi sa ϵ_2 alelom imaju najveći prosečni nivo apoE, dok genotipovi sa alelom ϵ_4 imaju najniži prosečni nivo ovog proteina (Mahley i sar., 2009).

1.3.2.4. Uloga apoE u oksidativnom stresu i aterogenezi

Antioksidativnost apoE je jedan od mehanizama kojim ovaj protein utiče na biološke procese i uslovljen je genotipom: različite izoforme imaju različite antioksidativne osobine, pa se i na ovaj način mogu objasniti asocijacije proteina sa brojnim oboljenjima. Smatra se da je antioksidativnost ovih proteinskih formi u vezi sa

brojem –SH grupa: apoE2 ima dve slobodne –SH grupe i najbolji je antioksidans, apoE3 jednu, a apoE4 ni jednu, pa je i naj lošiji (apoE2>E3>E4) (Pedersen i sar., 2000).

Veza između apoE polimorfizama i pojave ateroskleroze je prvi put primećena kod pacijenata sa tip III hiperlipoproteinemijom koji su bili ϵ_2/ϵ_2 genotipa i kod kojih se jako rano razvila koronarna bolest srca (KBS) (Stengård i sar., 1995). ApoE ϵ_4 alel je u velikom broju studija povezan sa povećanim rizikom od nastanka kardiovaskularnih oboljenja kao što su infarkt miokarda, hipertenzija, KBS, bolest koronarne arterije (Eichner i sar., 2002; Anoop i sar., 2010). Populacije u kojima se javlja povišen nivo holesterola u plazmi i koje imaju višu incidencu smrti od KBS imaju veću učestalost alela ϵ_4 (Schiele i sar., 2000). Pokazano je da ϵ_4/ϵ - osobe imaju za 42% povećan rizik od KBS u odnosu na ϵ_3/ϵ_3 osobe (Wilson i sar., 1996). U odnosu na mlađu populaciju, u populaciji starijih ljudi smanjena je učestalost apoE4 (Lewis i Brunner, 2004).

1.4. Oksidativni stres i metabolizam lipida-Paraoksonaza 1

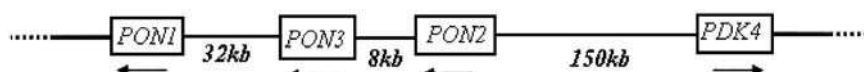
Familija paraoksonaza (PON1, PON2, PON3) kod ljudi je familija hidrolaza sa najširoom supstratnom specifičnošću. Ova tri enzima imaju različitu distribuciju po ćelijama i tkivima i njihova pojedinačna fiziološka uloga i precizni mehanizmi delovanja još nisu utvrđeni. Naziv „paraoksonaza“ za ovu proteinsku familiju i nije najprikladniji s obzirom da PON2 i PON3 ne ispoljavaju paraoksonaznu aktivnost (Draganov i sar., 2002; Ng i sar., 2001). Filogenetske, strukturne i biohemijske studije su pokazale da su sva tri PON primarno laktonaze sa različitim supstratnim specifičnostima. Takođe, sva tri enzima imaju i arilesteraznu aktivnost koja je, sa izuzetkom hidrolize fenilacetata kod PON1, veoma slaba. Fosfodiesterazna aktivnost je rezervisana samo za PON1 (Rosenblat i sar., 2006; Sorenson i sar., 1999).

Sva tri PON proteina imaju kapacitet da zaštite ćelije od oksidativnog stresa. Interesantno je da paraoksonaze metabolišu veliki broj acil-homoserin laktona, signalnih molekula koje sintetišu neke vrste gram-negativnih bakterija (Ozer i sar., 2005; Yang i sar., 2005).

Genska familija paraoksonaza kod sisara obuhvata tri gena: pon1, pon2 i pon3. locirana jedan do drugog na dugom kraku hromozoma 7 (7q21.3-22.1) (Slika 6) (Primo-Parmo i sar., 1996). Nazivani su po redu po kom su otkriveni. Ova tri gena su konzervirana i dele 70% identičnosti na nukleotidnom nivou i 65% na aminokiselinskom nivou. Filogenetske analize su pokazale da je pon2 najstariji član ove familije, a genska familija je najverovatnije nastala tandemskom duplikacijom zajedničkog evolutivnog pretka. U prilog ovoj tvrdnji ide i to što je kod ptica i riba prisutan jedan pon gen najbližnji pon2. Gen sličan pon-u je identifikovan i kod crva *C. elegans*, kod biljaka, bakterija i gljiva. Kod ljudi, pon1 je najmlađi član genske familije i u poređenju sa pon2 i pon3, ima dodatna tri nukleotida u egzonu 4 koji kodira aminokiselinu 105 (Draganov i La Du, 2004; Mackness i sar., 1993).

Kod ljudi, ekspresija PON1 iRNK je ograničena na jetru, dok je PON3 iRNK detektovana i u jetri i u bubrezima. PON2 kod ljudi je više eksprimiran u tkivima poput

srca, bubrega, jetre, pluća, placente, tankog creva, testisa, slezine, ali i u endotelnim ćelijama, glatkim mišićnim ćelijama i makrofagima u zidu arterija. PON1 i PON3 se izlučuju u krvotok gde se asociraju sa HDL partikulama, dok se PON2 nalazi unutar ćelije, asociran sa membranom (Ng i sar., 2001; Primo-Parmo i sar., 1996).



Slika 6. Mapa genskog klastera pon genske familije kod ljudi (Li i sar., 2003).

1.4.1. Paraoksonaza 1

Paraoksonaza 1 je najviše ispitivani enzim iz porodice PON proteina. To je serumsko kalcijum-zavisna esteraza, glikoprotein, koja se sastoji iz 354 amino kiselina sa molekulskom masom od 45 kDa. Enzim je pedesetih godina dvadesetog veka okarakterisan kao organofosfatna hidrolaza, a ime je dobio po jednom od svojih supstrata–paraoksonu, koji je toksični metabolit organofosfatnog insekticida parationa. Ubrzo, otkrivena je još jedna funkcija enzima-arilesterazna aktivnost, pa je termin 'A-esteraza' nakratko zamenio prvobitno 'paraoksonaza'. S obzirom da enzim ima obe aktivnosti, termin 'paraoksonaza' je vraćen u upotrebu (Sorenson i sar., 1995).

Paraoksonaza 1 (PON1) čoveka je primer hidrolitičkog enzima koji je uključen u metabolizam i endogenih i egzogenih jedinjenja. U osnovi, to je laktonaza koja hidrolizuje aromatične i alifatične laktone dugog lanca, ali isto tako metaboliše veliki broj supstrata, uključujući pesticide, bojne otrove i fenilacetat (Costa i sar., 2005). PON1 može sprečiti ili umanjiti oksidaciju LDL partikula i može imati antiaterogenu ulogu (Mackness i sar., 1993), a njena antiinflamatorna uloga se ogleda u hidrolizi derivata oksidovanih lipida koji su okidači inflamacije u procesu aterogeneze

(Khersonsky i Tawfik, 2005). Vezivanjem PON1 za HDL stimuliše se njena enzimaska aktivnost.

1.4.1.1. PON1-struktura

Enzim je visoko konzerviran kod sisara, a nema ga kod riba, ptica i invertebrata (La Du, 1996). Struktura ovog enzima je u vidu šestokrakog β -propelera gde se svaki krak sastoji iz četiri β -ploče i ove sekvence su visokokonzervirane među svim sisarskim PON (Slika 7). Dva jona kalcijuma se nalaze u centralnom tunelu propelera, jedan na vrhu (C1), drugi u središnjem delu (C2). C2 je 'strukturni' kalcijum čija disocijacija vodi ka ireverzibilnoj denaturaciji, a C1 se označava i kao 'katalitički kalcijum' (Harel i sar., 2004)



Slika 7. Struktura PON1 (Harel i sar., 2004)

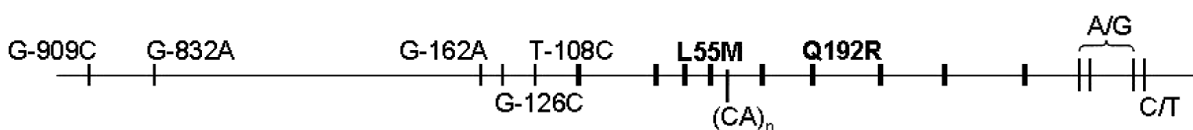
Tri α -heliksa (H1-H3) se nalaze na vrhu propelera i učestvuju u pričvršćavanju PON1 za HDL. Najveća varijabilnost u aminokiselinskoj sekvenci PON među sisarima nalazi se baš u okviru H1-H3. N-terminalna sekvencija (H1) je zaslužna za ćelijsku

distribuciju, translokaciju i izlučivanje PON a ostala dva (H2 i H3) su zaslužna za protein-lipid i protein-protein interakciju. Aktivno mesto proteina PON1 je okrenuto ka površini HDL partikula. (Harel i sar., 2004). Promene u veličini i obliku HDL partikula mogu da naruše afinitet vezivanja PON1 i njegovu stabilnost, a rezultat je smanjen antioksidativni kapacitet (Durrington i sar., 2001).

1.4.1.2. PON1-gen i polimorfizmi

Ranih devedesetih godina prošlog veka PON1 čoveka je izolovana, a njen gen kloniran i sekvenciran (Furlong i sar., 1991; Hasett i sar., 1991). Ubrzo potom su i polimorfizmi ovog enzima okarakterisani (Humbert i sar., 1993; Adkins i sar., 1993).

Dva polimorfizma su prisutna u kodirajućem regionu pon1: zamena glutamina argininom-Gln(Q)/Arg(R)-na poziciji 192 (Q192R), i zamena leucina metioninom-Leu(L)/Met(M)-na poziciji 55 (L55M) (Humbert i sar., 1993; Adkins i sar., 1993). Identifikovani su i mnogi drugi polimorfizmi u pon1 uglavnom u njegovom regulatornom regionu (Brophy i sar., 2001; Suehiro i sar., 2000; Jarvik i sar., 2003): -107C/T ili -108 C/T, -126 G/C, -162G/A, -832G/A i -909G/C i smatra se da, sem -107 C/T, nemaju značajnog udela na koncentraciju i funkciju PON1. Oko 200 drugih SNP je nađeno u kodirajućem regionu, intronima i regulatorskim delovima gena, a većina njih nije okarakterisana (Jarvik i sar., 2003).



Slika 8. Pozicija najčešće ispitivanih polimorfizama u pon1 (Mohamed Ali i Chia, 2008).

Polimorfizam na poziciji 192 (Q192R) je znatno više proučavan. Kod ovog polimorfizma zamena CAA u CGA u egzonu 6 pon1 gena određuje izoforme proteina

koje se razlikuju po afinitetima i katalitičkim aktivnostima (Harel i sar., 2004; Hassett i sar., 1991; Draganov i La Du, 2004; Davies i sar., 1996). Studije su pokazale da R192 alozim hidrolizuje paraokson 6 puta brže nego Q192 (Humbert i sar., 1993; Adkins i sar., 1993), dok Q192 brže razgrađuje diazokson, sarin i soman in vitro u odnosu na R192 (Davies i sar., 1996). Za neke supstance (fenilacetat) nema razlike u brzini hidrolize (Davies i sar., 1996; Billecke i sar., 2000). Razlike u aktivnosti enzima izazvane zamenom jedne aminokiseline objašnjavaju se strukturom enzima i njegovim afinitetom za vezivanje za HDL partikule. U zidu aktivnog mesta PON1 kod ljudi uobičajeno se nalazi Arginin (R), a zamena Glutaminom (Q) dovodi do promena u aktivnosti i supstratnoj specifičnosti. Takođe, pozicija 192 se nalazi u okviru H2 koji se vezuje za HDL. Što se tiče antioksidativne aktivnosti enzima, rezultati studija su oprečni: neke studije govore o tome da je Q192 bolji antioksidans u odnosu na R192 alozim (Mackness i sar., 1998), dok druge govore u prilog R192 alozimu kao boljem antioksidansu (Gaidukov i sar., 2006).

Polimorfizam L/M na poziciji 55 (zamena TTG u ATG u egzonu 3) je povezan sa nivoom enzima u krvi i njegovom stabilnošću. L55 je stabilnija izoforma otpornija na proteolizu čime se može objasniti njegova asocijacija sa povećanim nivoom enzima u serumu (Leviev i sar., 2001). L55M ima ulogu u pakovanju centralnog tunela propelera enzima (Harel i sar., 2004) i nalazi se na N-terminusu proteina, koji je zaslužan za vezivanje PON1 za HDL (Leviev i sar., 2001).

Polimorfizam C/T na poziciji 107 u regulatornom delu gena (C(-107)T) ima najznačajniji efekat na nivo PON1 u krvi. Ovaj polimorfizam sa 24,7% utiče na nivo ekspresije PON1 (100). Alel -107C je asociiran sa dva puta većim nivoom enzima u odnosu na alel -107T (Brophy i sar., 2001). Ovo polimorfno mesto se nalazi u okviru konsenzus sekvence GGCGGG vezujućeg mesta za transkripcioni faktor Sp1 i vezivanje Sp1 je slabije u prisustvu T alela (Deakin i sar., 2003), što objašnjava slabu ekspresiju enzima kod TT genotipa.

Postoje velike razlike u distribuciji polimorfizama pon1 gena među različitim populacijama ljudi. U evropskim populacijama, i u populacijama sa bliskog istoka učestaliji su aleli Q192 i L55 u odnosu na R192 i M55 alele. Isti obrazac zastupljenosti pokazuju i analizirane populacije u Indiji i narodi srednje i južne Amerike, dok većina

azijskih populacija pokazuju visoku zastupljenost R192 alela i veoma nisku zastupljenost M55 alela (Mohamed Ali i Chia, 2008). U slučaju polimorfizma u Sp1 vezujućem regionu pon1 gena ima manje podataka nego za polimorfizme u kodirajućem regionu. U populacijama evropskog porekla distribucija C i T alela je podjednaka, sem u slučaju Španaca i Evro-Amerikanaca gde je učestalost alela T duplo veća (0.380 za C alel i 0.620 za T alel). Na teritoriji Sjedinjenih Američkih Država, učestalost C i T alela je 0.5, ali u Afro-Američkoj populaciji učestalost je 0.850 za C alel. Na srednjeameričkom kontinentu i Aziji distribucija ovih alela se razlikuje u zavisnosti od porekla populacije (Leviev i James, 2000; Cataño i sar., 2006; Grdić i sar., 2008; Christiansen i sar., 2004).

1.4.1.3. Uloga PON1 u metabolizmu lipida

Pokazano je da PON1 ima ulogu u aterogenezi: štiti LDL, HDL i makrofage od oksidativnog stresa, na šta ukazuje umanjen unos ox-LDL u makrofage, inhibicija sinteze holesterola u makrofagima, i stimulacija HDL-om posredovanim efluksom holesterola iz makrofaga. Ove funkcije su u vezi sa laktonaznom aktivnošću ovog enzima (Mackness i sar., 1993; Aviram i sar., 1998; Aviram i Rosenblat, 2005). PON1 hidrolizuje lipidne perokside i sprečava njihovu akumulaciju u LDL i HDL partikulama i *in vitro* i *in vivo* (Aviram i sar., 2000). Takođe, PON1 čuva celovitost HDL i zaslužan je za njihov antioksidativni i antiinflamatorni efekat. Osobe sa visokim nivoom HDL-a ali niskim PON1 su podložnije pojavi ateroskleroze i koronarne bolesti srca nego osobe sa niskim HDL-om i visokim PON1 (Navab i sar., 1997). Studije su pokazale da je Q192 alozim efikasniji u redukovanju ukupnih lipidnih peroksida u odnosu na R192 alozim (Aviram i sar., 2000). Sa progresijom ateroskleroze, povećava se koncentracija PON1 u plakama (Mackness i sar., 1997), a verovatno je da PON1 ima ulogu u sprečavanju interakcije između monocita i endotela tokom rane faze aterogeneze. Arilesterazna i laktonazna aktivnost ne zavise od faktora rizika kao što su hipertenzija, starost i pol, što je bitno za antioksidativnu ulogu PON1 (Rosenblat i sar., 2008). Statini (inhibitori HMG-coA reduktaze) poboljšavaju aktivnost ovog enzima, pa pon1 polimorfizmi mogu odrediti efikasnost terapije (Aviram i sar., 2000).

1.4.1.4. Uloga PON1 u oksidativnom stresu i aterogenezi

PON1 degraduje vodonik peroksid (Aviram i sar., 1998), a u krvi hidrolizuje i homocistein tiolaktone, metabolite homocisteina koji imaju dokazanu ulogu u aterogenezi jer vode oštećenju i disfunkciji endotela (Jakubowski, 2000).

Tokom LDL oksidacije, PON1 je delimično inaktiviran jonima bakra, koji zamenjuju jone kalcijuma, što onemogućava arilesteraznu/paraoksonanu aktivnost enzima, ali enzim vrši svoju antioksidativnu ulogu putem laktonazne aktivnosti. Posle reakcije PON1 se reverzibilno inaktivira. Kada se nađe u serumu siromašnim lipoproteinima, dolazi do konformacione promene u aktivnom mestu i PON1 gubi svoju laktonaznu funkciju, ali hidrolizuje organo-fosfatna jedinjenja (OF) (Aviram, 1999).

1.5. Oksidativni stres i detoksifikacija-Glutation S-transferaze

Biotransformacija predstavlja seriju hemijskih promena jedinjenja u telu koje je posredovano enzimima. U pitanju su elektrofilni, ksenobiotici ili jedinjenja endogenog porekla koje je potrebno neutralisati i eliminisati iz organizma.

Reakcije biotransformacije su podeljene u tri faze: faza I obuhvata enzimске sisteme koji katalizuju reakcije oksidacije, redukcije i hidrolize. Hidrofobna, nepolarna jedinjenja se prevode u hidrofilnije oblike uvođenjem -OH, -NH₂, -SH, ili -COOH funkcionalnih grupa. Reakcije ove faze se odigravaju u endoplazmatičnom retikulumu, pri čemu 90% enzima čine citohromi P450, a preostali enzimi su flavin monooksigenaze (FMO) i epoksid hidrolaze (EH). U ovoj fazi može doći do bioaktivacije do tada neaktivnih jedinjenja u hemijski reaktivne primarne ili sekundarne molekule koji mogu modifikovati ćelijske makromolekule, narušiti ćelijsku homeostazu i rezultirati u smrti ćelije ili dovesti do maligne transformacije. Reakcije faze II prevode intermedijerna reaktivna jedinjenja u još hidrofilnije oblike konjugacijom sa endogenim ligandima. U ovoj fazi dolazi do eliminacije jedinjenja putem urina ili fecesa. Reakcije ove faze odvijaju se u citoplazmi a uključuju procese glukuronizacije, sulfacije, acetilacije, metilacije, konjugacije sa glutationom. I u ovoj fazi često dolazi do stvaranja genotoksičnih metabolita. U ove procese su uključeni enzimi UDP-glukuronoziltransferaze (UGTP), sulfotransferaze (ST, SULT), N-acetiltransferaze (NAT), katehol O-metiltransferaze (COMT), glutation S-transferaze (GST) i NAD(P)H:kvinon okidoreduktaze (NQO). Procesi faze III predstavljaju transport hidrofilnih produkata formiranih u fazama I i II kroz biološke membrane, u urin, žuč ili krv, putem različitih nosača, npr P-glikoproteina (Costa i Eaton, 2006).

1.5.1. Glutation S-transferaze

Još u 19. veku znalo se da je formiranje merkapturata jedan od mehanizama metabolisanja i ekskrecije ksenobiotika, ali do 1961. godine nije se znalo da je prvi korak u konjugaciji jedinjenja sa glutationom proces koji je enzimski posredovan. Godine 1969. je identifikovan protein u jetri pacova koji vezuje elektrofilne kancerogene materije i nazvan je „ligandin“, a 1973. je izolovana frakcija proteina od 50kDa koja posreduje u konjugaciji glutaciona sa nizom elektrofilnih jedinjenja i koja je nazvana glutacion transferaze. Ligandin i glutacion transferaze su imali preklapajuće aktivnosti, što je sugerisalo da se možda radi o istim proteinima. Dogovorom među istraživačkim grupama, ligandin je postao „inducibilni intraćelijski vezujući protein koji reguliše efluks organskih anjona između plazme i ćelije“. Kada je frakcija jetrinih proteina razdvojena 1975. godine, 'pojavi' se superfamilija glutacion S-transferaza. Geni za GST-aze su klonirani sredinom '80 i uvidelo se da su GST-aze kod sisara produkti genske superfamilije. Struktura pojedinih GST-aza je opisana ranih '90 (Listowsky i Arias, 2007).

Glutacion S-transferaze predstavljaju superfamiliju detoksikujućih enzima. Njihovi supstrati su endogeni produkti oksidativnog stresa i elektrofilni ksenobiotici. Reakcija koja najbolje karakteriše ove enzime je posredovanje u reakciji konjugacije elektrofilnih jedinjenja sa glutationom (GSH) u fazi II biotransformacije. Na ovaj način se dobija tioetar, inaktivirano jedinjenje koji je u najvećem broju slučajeva krajnji produkt reakcije. U nekim slučajevima, supstrati se prevode u reaktivnija jedinjenja. GST-aze katalizuju i reakciju konjugacije GSH sa endogenim produktima oksidativnog oštećenja lipida, DNK, kateholamina. Takođe, ovi enzimi učestvuju u biosintezi leukotriena, prostaglandina, testosterona i progesterona, ali i u degradaciji tirozina (Hayes i sar., 2005). GST-aze ispoljavaju peroksidaznu i izomeraznu ulogu, mogu inhibirati c-Jun N-terminalnu kinazu (JNK) i kao ligandi se nekatalitički mogu vezati za veliki broj molekula. Zbog svega navedenog, ovi enzimi mogu modulisati ćelijski odgovor na endogene ili egzogene elektrofile, inflamaciju, oksidativni stres, odgovor na veliki broj lekova, ali i kontrolisati ćelijski ciklus. Osnovna biološka uloga ovih enzima još nije najjasnija (Holley i sar., 2007)

1.5.1.1. Citosolne glutation S-transferaze

Postoje dve evolutivno različite superfamilije gena GST-aza: citosolne/solubilne GST-aze i mikrozomalne ili MAPEG (membranski proteini u metabolizmu eikosonoida i glutationa) (Strange i sar., 2001)

Citosolne sisarske GST-aze su svrstane u klase na osnovu sličnosti u aminokiselinskoj sekvenci: enzimi koji se nalaze unutar iste klase imaju više od 40% identičnosti, dok oni u različitim klasama dele manje od 25%. Takođe, unutar klase struktura gena je konzervirana. Kod sisara postoje sledeće klase solubilnih GST-aza: Alfa (GSTA), Mu (GSTM), Pi (GSTP), Sigma (GSTS), Teta (GSTT), Zeta (GSTZ), Omega (GSTO) i Kappa (GSTK) klasa koju predstavljaju mitohondrijalne GST-aze. GST-aze su grupisane u podfamilije (podklase) na osnovu homologije u sekvenci koje su verovatno nastale duplikacijom ili konverzijom 'osnovnog' gena (Lai i sar., 1988; Hayes i Strange, 2000).

1.5.1.2. Citosolne glutation S-transferaze-struktura

Pre nego što je otkrivena struktura GST-aza, prepostavilo se da je evolutivni predak ovih enzima nastao fuzijom GSH-vezujućeg modula i drugih strukturnih komponenti koje će kasnije dati specifične enzimatske karakteristike proteinima iz ove superfamilije. Kod solubilnih GST-aza, GSH-vezujući modul je N-terminalni domen koji se sastoji iz četiri β -lanca koji se nalaze u sendviču između dva α -heliksa sa unutrašnje strane i jednog α -heliksa sa spoljašnje strane molekula. Pravo mesto vezivanja GSH molekula, vezujući džep, naziva se G-mesto. Drugi modul, koji nosi hidrofobno, tzv. H-mesto, vezuje supstrat, elektrofil i omogućava njegovo postavljanje u odgovarajuću poziciju kako bi reakcija sa neutrofilnim GSH bila omogućena (Ivarsson i Mannervik, 2007)

Sve do sada opisane GST-aze su dimeri (~22kDa-27kDa za svaku subjedinicu) koji nastaju kombinovanjem identičnih (homodimeri) ili različitih (heterodimeri) subjedinica iz iste klase. U fiziološkim uslovima, slobodni monomeri nisu uočeni a katalitička

aktivnost je prisutna samo u vidu dimera. Subjedinice GST-aza ispoljavaju nezavisnu katalitičku aktivnost (Willson et al., 2000).

Glutation S-transferaze se vezuju i za druge ćelijske proteine i molekule. Neki od ovih "alternativnih partnera" su stresom aktivirane protein kinase koje interaguju sa nuklearnim aktivatorima transkripcionih faktora (Ivarsson i Mannervik, 2007), azo-boje, bilirubin, policiklični aromatični ugljovodonici, steroidi i tireoidni hormoni (Hayes i sar., 2005; Eaton i Bammler, 1999). Pokazano je da su GST-aze (klase A-M-P) intraćelijski nosači za kratkoživeći azot-oksidi: kompleks NO, GSH, gvožđe i GST-aza produžava poluživot NO na nekoliko časova (De Maria et al., 2003).

1.5.1.3. Geni i genski polimorfizmi glutation S-transferaza

Najmanje 18 gena je identifikovano u superfamiliji gena solubilnih GST-aza kod ljudi: GSTA1-GSTA5, GSTK1, GSTM1-GSTM5, GSTO1-GSTO2, GSTP1, GSTT1-GSTT2, GSTS1, GSTZ1. Pregled polimorfizama, lokusa, ekspresije i funkcije dat je u Tabeli 2.

Genetički polimorfizmi u regulatorskom i kodirajućem regionu opisani su u svim GST-azama kod ljudi (Hayes i sar., 2005). Pošto GST-aze imaju brojne uloge u detoksifikaciji, metabolizmu lekova, regulaciji i antioksidativnoj zaštiti, promene u nivou ekspresije ili katalitičkim osobinama utiču na zdravlje ljudi. Većina ovih polimorfizama ispitivana je u vezi osetljivosti na tumorigenezu i odgovor na hemioterapiju. Najviše analizirani geni za GST-aze kod ljudi jesu GSTM1, GSTT1 i GSTP1.

GSTM1

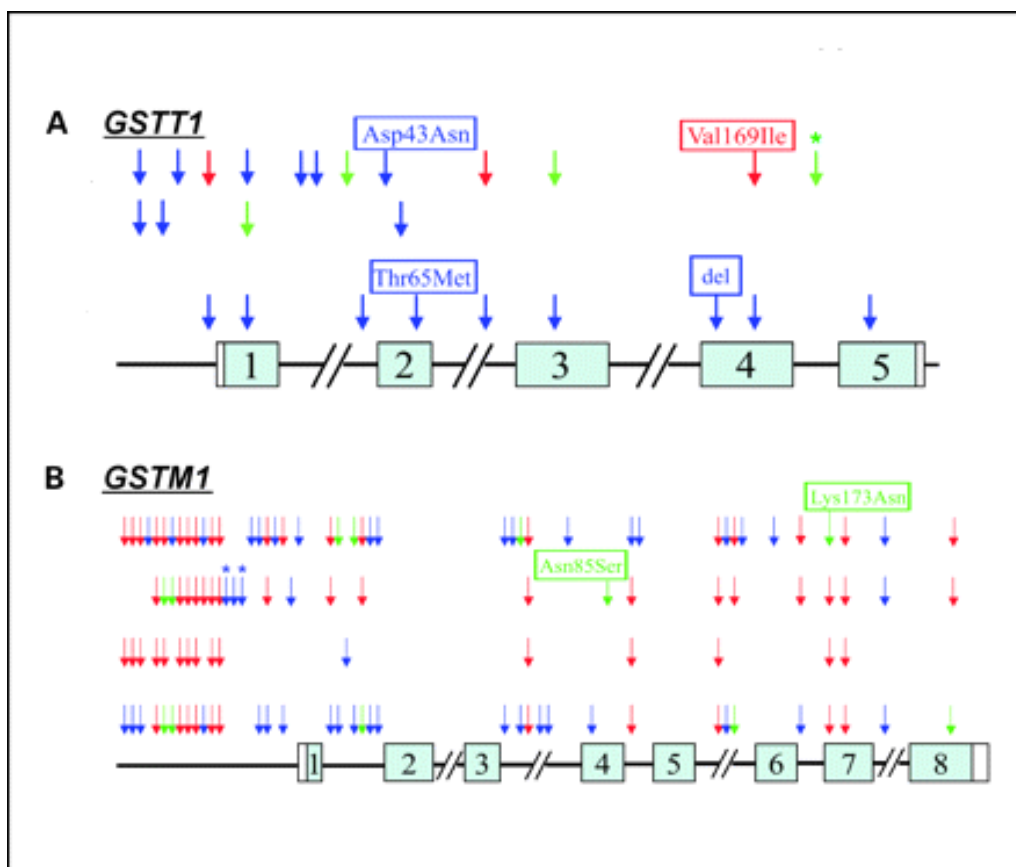
Gen za GSTM1 se nalazi na 1p13 i kao i drugi geni za GST-aze iz ove klase, ima 8 egzona. Najviše izučavani polimorfizam je nulti ili delecioni polimorfizam (GSTM1*0 ili -/-) koji predstavlja kompletnu deleciju GSTM1 gena. Ova varijanta GSTM1 gena može dati ili funkcionalni protein (homozigoti za nedeletirani alel ili heterozigoti) ili dovesti do potpunog odsustva enzima (homozigoti za deletirani alel ili tzv nulti genotip) (Eaton i bammler, 1999). Nulti genotip je veoma čest. Čak oko 50%

populacija evropskog porekla ima deleciju GSTM1 gena u homozigotnom obliku (Strange i sar., 2001; Eaton i Bammler, 1999).

Duplikacija gena se takođe javlja u ovoj klasi proteina (GSTM1*Ax2 alel) i osobe koje nose ovakvu duplikaciju imaju prekomernu ekspresiju GSTM1 (McLellan i sar., 1997). Do sada nije utvrđeno da li i drugi polimorfizmi M1-M5 gena (Tabela 2) ispoljavaju značajan efekat na strukturu i funkciju enzima.

GSTT1

Ova klasa enzima razlikuje se od M i P po sekvenci, katalitičkoj aktivnosti i strukturi. Gen za GSTT1 se nalazi na 22q11 i poseduje 5 egzona. Postoje dva člana familije teta: T1 i T2. Dele 55% identičnosti i na nukleoidnom i na aminokislinskom nivou. Kao i kod GSTM1 gena, najčešće izučavani polimorfizam je delecioni polimorfizam GSTT1*0 (-/-). Učestalost GST1 nulti polimorfizma varira sa etničkom pripadnošću i kod kavkaskih populacija iznosi 15-25% a kod nekih azijskih populacija učestalost je veća od 60% (Strange i sar., 2001; Eaton i Bammler, 1999). Ostali polimorfizmi ovog gena su slabo izučavani (Tabela 2).

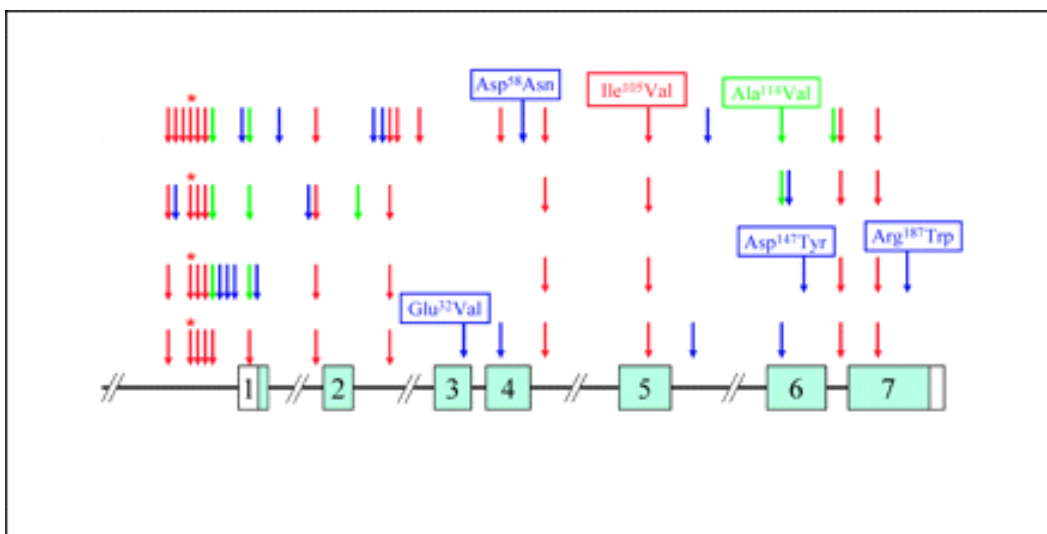


Slika 9. Polimorfizmi u GSTT1 i GSTM1 kod ljudi: plavi pravougaonici-egzoni; nebojeni pravougaonici-netranslatirajući regioni. Strelice ukazuju na poziciju polimorfizma, a boja na njihovu učestalost: plave <1%, zelene 1-10%, crvene >10%, zvezdica-indel polimorfizmi (Moyer i sar, 2008).

GSTP1

Gen za GSTP1 se nalazi na 11q13 i ima 7 egzona i sadrži veliki broj polimorfizama: 24 u intronima, 14 u kodirajućem regionu, 4 u 5' i 3' netranslatornim regionima. Najčešće izučavani polimorfizmi kod ljudi predstavljaju bazne zamene A313G u egzonu 5 koja rezultuje u zameni aminokiseline izoleucina valinom u kodonu 105 (Ile105Val) i C341T u egzonu 6 koja dovodi do zamene aminokiselina alanina valinom u kodonu 114 (Ala114Val). Ile105Val polimorfno mesto se nalazi blizu mesta vezivanja elektrofilnih substrata i utiče na katalitičku aktivnost i substratnu specifičnost.

Učestalost GSTP1 Val105, koji je zaslužan za manju aktivnost i manju sposobnost detoksifikacije, je 11-34% među zdravim kontrolama (Costa i Eaton, 2006).



Slika 10. Polimorfizmi u GSTP1 kod ljudi: plavi pravougaonici-egzoni; nebojeni pravougaonici-netranslatirajući regioni. Strelice ukazuju na poziciju polimorfizma, a boja na njihovu učestalost: plave <math><1\%</math>, zelene 1-10%, crvene >10%, zvezdica-indel polimorfizmi (Moyer i sar, 2007).

1.5.2. Uloga GST-aza u oksidativnom stresu i aterogenezi

GST-aze ispolavaju dejstvo prema nekim sporednim produktima oksidativnog stresa kao što su lipidni i DNK hidroperoksidi i 4-hidroksinonenal. Detoksifikacija ovakvih jedinjenja je bitna jer se tako sprečava povećavanje nivoa slobodnih radikala i lančanih reakcija koje vode njihovom eksponencijalnom uvećavanju. U fiziološkim koncentracijama u ćeliji, GST-aze regulišu nivo reaktivnih vrsta kiseonika (Hayes i McLellan, 1999), sprečavaju njihovu akumulaciju i sprečavaju smrt ćelija u uslovima povišenog oksidativnog stresa (Yin i sar., 2000). Uočeno je da u uslovima oksidativnog stresa GSTT1 i GSTP1 prelaze u jedro, verovatno kao transporteri prostaglandina ili u funkciji modulatora protein kinaza. GSTP1 je povezan sa detoksifikacijom produkata

oksidacije nukleinskih kiselina, a GSTM1 sa detoksifikacijom lipidnih peroksida (Sherrat i sar., 1998; Adler i sar., 1999, 128).

Studije sprovedene među različitim populacijama ljudi i na različitim veličinama uzoraka dale su protivrečne rezultate po pitanju uloge polimorfizama u GST genima na osetljivost na oksidativni stres i pojavu ateroskleroze i njenih kliničkih manifestacija (Tamer i sar., 2004; Wilson i sar., 2000; Palmer i sar., 2003; Bid i sar., 2010; Amer i sar., 2012; Gönül i sar., 2012; Kariž i sar., 2012; Ramprasath i sar., 2011; Santl letonja i sar., 2012; Suvakov i sar., 2012).



Slika 11. Struktura glutation S-transferaze: GSTP1 (Ivarsson i Mannervik, 2007)

Tabela 2. Polimorfizmi, lokacija, ekspresija i funkcija glutation S-transferaza (Holley i sar., 2007)

Klasa (Hromozom)	Geni	Aleli	Nukleotidna promena	Aminokiselinska promena	Ekspresija u tkivima	Funkcija
Alfa, α , (6p12)	A1-A5	A1*A	-69C	Promotorski region	Jetra, testisi, bubrezi, pankreas, pluća, nadbubrežne žlezde	Smanjena ekspresija
		A1*B	-69T	Promotorski region		
		A2*A	332C, 335C, 589G, 629A	Pro110, Ser112, Lys196, Glu210	Jetra, testisi, bubrezi,	
		A2*B	332C, 335C, 589G, 629C	Pro110, Ser112, Lys196, Ala210	Nadbubrežne žlezde, pankreas, pluća, mozak	Bez promena
		A2*C	332C, 335G, 589G, 629A	Pro110, Thr112, Lys196, Glu210		Bez promena
		A2*E	332T, 335C, 589G, 629A	Ser110, Ser112, Lys196, Glu210		Smanjena aktivnost
		A3			Placenta, testisi, jajnici, nadbubrežne žlezde	
		A4			Tanko crevo, slezina, jetra, bubrezi, mozak, debelo crevo,	
		A5			jetra	
Mu, μ , (1p13.3)	M1-M5	M1*A	519G	Lys173	Jetra, testisi, bubrezi,	
		M1*B	519C	Asn173	Nadbubrežna žlezda, pluća, mozak	Bez promena
		M*0	Delecija gena	Bez proteina		nema aktivnosti
		M1*Ax2	Duplikacija	prekomerna ekspresija		Povećana aktivnost

Klasa (Hromozom)	Geni	Aleli	Nukleotidna promena	Aminokiselinska promena	Ekspresija u tkivima	Funkcija
		M2			Mozak, skeletni mišići, testisi, srce, bubrezi	
		M3*A	AAG	Intron 6	Mozak, testisi, skeletni mišići	Izmenje YY1 motiv
		M3*B	AAG delecija	Intron 6		
		M4*A	2517T	Intron 6	Mozak, skeletni mišići, srce	Bez promena
		M3*B	2517C	Intron 6		
		M5			Mozak, skeletni mišići, srce, pluća	
Pi, π, (11q13)	P1	P1*A	313 A, 341 C, 555 C	Ile105, Ala114, Ser185	Pluća, mozak, jetra, bubrezi, testisi Pankreas, skeletni mišići, srce	
		P1*B	313G, 341 C, 555 T	Val105, Ala114, Ser185		Substrat-zavisno
		P1*C	313 G, 341 T, 555 T	Val105, val114, Ser185		Substrat-zavisno
		P1*D	313 A, 341 T	Ile105, Val114		Substrat-zavisno
Teta, θ, (22q11)	T1-T2	T1*A	310A	Thr104	Jetra, bubrezi, mozak, prostata	
		T1*B	310C	Pro104		Smanjena aktivnost
		T1*0	Delecija gena	Nema proteina		Nema aktivnosti
		T2*A	481G	Met139	jetra	
		T2*B	481A	Ole139		?

Klasa (Hromozom)	Geni	Aleli	Nukleotidna promena	Aminokiselinska promena	Ekspresija u tkivima	Funkcija
Sigma, σ , (4q21-22)	S1				Jetra fetusa, kosta srž	
Zeta, ζ (14q23-25)	Z1	Z1*A	94 A, 124 A, 245 C	Lys32, Arg42, Thr82	Jetra fetusa, skeletni mišići	
		Z1*B	94 A, 124 G, 245 C	Lys32, Gly42, Thr82		Smanjena aktivnos
		Z1*C	94 G, 124 G, 245 C	Glu32, Gly42, Thr82		Smanjena aktivnos
		Z1*D	94 G, 124 G, 245 T	Glu32, Gly42, Met82		Smanjena aktivnos
Omega, ω , (10q23-25)	O1-O2	O1*A	419 C, 464+1 AAG	Ala140, Glu155	Jetra, makrofagi, mozak	
		O1*B	419 C, 464+1 del	Ala140, del		Povećana aktivnost
		O1*C	419 A, 464+1 AAG	Asp140, Glu155		Smanjena aktivnost
		O1*D	419 A, 464+1 del	Asp140, del		?
		O1*E	650C	Thr217		
		O1*F	60A	Asn217		Sanjena aktivnost
		O2*A	424A	Asn142	Testisi, jetra, srce, prostata, skeletni mišići, bubrezi	
		O2*B	424G	Asp142		?
Kappa, κ , ?	K1				Jetra (mitohondrije)	

2. CILJEVI RADA

Cilj ove doktorske disertacije je pronalaženje potencijalnih genetičkih markera za povećanu osjetljivost na oksidativni stres analizom polimorfizama gena čiji produkti ispoljavaju antioksidativna svojstva i imaju ulogu u metabolizmu lipida. Za analizu u ovoj studiji asocijacije odabrani su geni čiji produkti imaju antioksidativnu ulogu i ulogu u metabolizmu lipida u plazmi i ćeliji (pon1), antioksidativnu ulogu i ulogu u metabolizmu lipida u plazmi (apoE) i antioksidativnu i detoksifikujuću ulogu u ćeliji (GSTM1, GSTT1, GSTP1). Ovaj osnovni cilj ostvaren je kroz više zadataka:

- Određivanje učestalosti polimorfizama Q192R, L55M i C(-107)T u genu za paraoksonazu 1 (pon1) kod dve grupe bolesnika (sa manifestnim dijabetesom tipa 2 i aterosklerozom i sa manifestnom aterosklerozom) i zdravih osoba;
- Određivanje učestalosti polimorfizama delecionog tipa u genu za glutation S-transferazu M1 (GSTM1) kod dve grupe bolesnika (sa manifestnim dijabetesom tipa 2 i aterosklerozom i sa manifestnom aterosklerozom) i zdravih osoba;
- Određivanje učestalosti polimorfizama delecionog tipa u genu za glutation S-transferazu T1 (GSTT1) kod dve grupe bolesnika (sa manifestnim dijabetesom tipa 2 i aterosklerozom i sa manifestnom aterosklerozom) i zdravih osoba;
- Određivanje učestalosti polimorfizma Ile105Val u genu za glutation S-transferazu P1 (GST1) kod dve grupe bolesnika (sa manifestnim dijabetesom tipa 2 i aterosklerozom i sa manifestnom aterosklerozom) i zdravih osoba;

- Određivanje učestalosti polimorfizma 112/158 u genu za apolipoprotein E (apoE) kod dve grupe bolesnika (sa manifestnim dijabetesom tipa 2 i aterosklerozom i sa manifestnom aterosklerozom) i zdravih osoba;
- Poređenje distribucije učestalosti alela i genotipova kod bolesnika sa manifestnim dijabetesom tipa 2 i aterosklerozom, kod bolesnika sa nekom od kliničkih manifestacija ateroskleroze i kod kontrola, utvrđivanje statističke značajnosti razlike u dobijenim učestalostima i utvrđivanje rizika za pojavu bolesti kod nosilaca određenih kombinacija genotipova.

3. ISPITANICI, MATERIJAL I METODE

3.1. Ispitanici

Istraživanjem je obuhvaćena sredovečna i starija populacija iz svih regiona Srbije (40-70 godina starosti) koja je podeljena u tri grupe ispitanika:

bolesnici sa diabetes mellitus tip 2 i nekom od kliničkih manifestacija ateroskleroze (140 ispitanika) lečeni na Institutu za kardiovaskularne bolesti 'Dedinje' i u Kliničko-bolničkom centra 'Zvezdara' koji nisu u srodstvu, 86 muškaraca i 54 žene, od 40 do 70 godina starosti.

bolesnici sa nekom od kliničkih manifestacija ateroskleroze (60 ispitanika) lečeni na Institutu za kardiovaskularne bolesti 'Dedinje' i u Kliničko-bolničkom centra 'Zvezdara' koji nisu u srodstvu, 37 muškaraca i 23 žene, od 40 do 70 godina starosti.

kontrolna grupa čine je 100 klinički zdravih dobrovoljnih davaoca krvi Službe za transfuziologiju Kliničko-bolničkog centra 'Zvezdara' i zdravih starijih ispitanika (≥ 65 godina) koji po polu i godinama odgovaraju prvoj i drugoj grupi.

Kriterijumi za odabir ispitanika bili su da su u bilo kojoj fazi bolesti diabetes mellitus tip 2 i da imaju bar jednu od kliničkih manifestacija ateroskleroze. Kombinovanim pristupom za dijagnozu dijabetesa ili na osnovu pojedinačnih vrednosti glikemije (2 glikemije u 2 različita dana) gde je za dijabetes glikemija našte $\geq 7,0$ mmol/L (126 mg/dL) ili glikemija u bilo kom slučajnom uzorku krvi (bez obzira na obroke) $\geq 11,1$ mmol/L (200 mg/dL) uz prisustvo tipičnih dijabetesnih simptoma (poliurija, polidipsija, gubitak u težini) ili na osnovu vrednosti glikemije dobijene oralnim testom opterećenja glukozom (engl *Oral Glucose Tolerance Test*, OGTT) gde je za dijabetes glikemija u toku OGTT-a u 120. minutu $\geq 11,1$ mmol/L (200 mg/dL) (Institut za javno zdravlje Srbije, 2011) našim ispitanicima je dijagnostikovano ili isključeno oboljenje. Prisustvo ateroskleroze je utvrđeno kod obe grupe ispitanika

primenom različitih dijagnostičkih testova, najčešće kombinacijom analize krvi i nekom od neinvazivnih ili invazivnih testova: ultrazvuka (dopler) arterija, pedobrahijalnog indeksa, elektrokardiograma, testa opterećenja srca (ergometrija), angiografije srca i krvnih sudova, skenera (\geq kompjuterizovane tomografije) ili na osnovu anamnestičkih podataka o postojanju koronarne bolesti srca (angina pectoris-AP, infarkt miokarda-IM), cerebrovaskularne bolesti-CVB (prolazni ishemični napadi, šlog), perifernoj vaskularnoj bolesti-PVB (operaciji arterija donjih ekstremiteta, operaciji karotidnih arterija).

Takođe, uzeli smo u obzir i podatke o postojanju hipertenzije, hiperlipidemije i pozitivne porodične istorije kardiovaskularnih oboljenja (KVB). Odabir kontrola je vršen tako da niko od ispitanika iz ove grupe nema DM2, ni jednu od kliničkih manifestacija ateroskleroze, nemaju hiperlipidemiju, hipertenziju niti pozitivnu porodičnu istoriju KVB.

Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Kliničko-bolničkog centra „Zvezdara“.

3.2. Metode

Molekularnogenetičko ispitivanje podrazumevalo je izolaciju genomske DNK iz limfocita periferne krvi i iz bukalne sluzokože i analizu polimorfizama gena primenom PCR-RFLP tehnike (eng. polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) i real-time PCR metodom. Dobijeni rezultati su obrađeni primenom Hi kvadrat (χ^2) testa radi utvrđivanja u distribuciji različitih alela i genotipova među grupama ispitanika, testova senzitivnosti i specifičnosti kao i logističkom regresionom analizom za utvrđivanje rizika od oboljevanja.

3.2.1. Izolacija genomske DNK

3.2.1.1. Izolacija genomske DNK iz limfocita periferne krvi

Izolacija genomske DNK iz limfocita periferne krvi rađena je metodom 'isoljavanja' (eng. *salting out*) koju je opisao Miller (Miller i sar., 1988). Periferna krv je uzeta u vakutajnerima obloženim sa EDTA i čuvana na -20°C do izolacije. Metoda se zasniva na osobini proteina da se talože u rastvorima sa visokom koncentracijom soli. Liziranje eritrocita se vrši u hipotoničnom rastvoru (eng. *erythrocyte leasing buffer-ELB*), a razdvajanje eritrocita i leukocita se vrši centrifugiranjem pri čemu leukociti ostaju u vidu taloga na dnu tubica. Potom se liziraju leukociti i degradiraju proteini asocirani sa DNK (SDS i Proteinaza K), a dodavanjem visokokoncentrovanog rastvora soli dolazi do taloženja svih nečistoća. Genomska DNK precipitira dodavanjem hladnog apsolutnog etanola. Etanol se upari a DNK se resuspenduje u vodenom rastvoru.

Potrebni rastvori:

- 5M NaCl (292,2g NaCl u 1000mL dH₂O)
- 1M NaCl (58,44g NaCl u 1000mL dH₂O)
- 0.5M Na₂ EDTA pH=8 (186,12 g Na₂ EDTA u 1000mL dH₂O)
- 1M Tris-HCl, pH=7,5 (12,11g Tris-a u 100mL dH₂O, konc HCl-om se podešava pH)
- 1M MgCl₂ (20, 33g MgCl₂x6 H₂O u 100mL dH₂O)
- 1M Tris-HCl, pH=8,0 (12,11g Tris-a u 100mL dH₂O, konc HCl-om se podešava pH)
- Pufer za liziranje eritrocita (erythrocyte leasing buffer) ELB (10, 95g saharoze, 1mL 1M Tris-HCl pH=7,5, 1mL TritonX-100, 0.5mL 1M MgCl₂ u 100mL dH₂O)
- Pufer za liziranje leukocita (leukocyte leasing buffer) LLB (1mL 1M Tris-HCl, pH=8,0, 40mL 1M NaCl, 0.4mL 0.5M Na₂ EDTA pH=8 u 100mL vodenog rastvora)
- Rastvor proteinaze K konc=10mg/mL
- 10% rastvor SDS-a

Postupak:

1. U tubicu od 1,5mL staviti 300 μ L krvi
2. Dodati 700 μ L ELB-a i resuspendovati laganim ispiranjem u nastavak pipete
3. Centrifugirati na 14000rpm/30s
4. Odliti supernatant i osušiti tubicu sa uzorkom
5. Isprati sediment sa 1mL ELB-a i kompletno resuspendovati
6. Centrifugirati na 14000rpm/30s
7. Odliti supernatant i osušiti tubicu sa uzorkom
8. U slučaju da pelet sadrži oko 50% eritrocita ponoviti korake 5-7
9. Resuspendovati pelet u 300 μ L LLB-a i dodati 20 μ L SDS-a
10. Dodati 20 μ L proteinaze K (10mg/ml) i homogenizovati na vorteks aparatu 20s
11. Inkubirati se na 56°C oko 30min
12. Dodati 120 μ L 5M NaCl i homogenizovati na vorteks aparatu 30s
13. Centrifugirati na 14000rpm/3min
14. Pažljivo prelići supernatant koji sadrži solubilnu DNK u nove tubice od 1,5mL
15. Supernatant naliti sa 1mL hladnog apsolutnog etanola i 30-ak puta promućkati
16. Centrifugirati na 14000rpm/2min
17. Odliti supernatant pazeći na DNK u talogu i osušiti tubicu sa uzorkom
18. Dodati 1 mL 70% etanola i 30-ak puta promućkati
19. Centrifugirati na 14000rpm/2min
20. Odliti supernatant pazeći na DNK talog
21. Beli pelet se ostavlja oko 10 min na 37°C kako bi etanol ispario
22. Resuspendovati DNK u talogu u 100 μ L dH₂O

3.2.1.2. Izolacija genomske DNK iz bukalne sluzokože

Izolacija genomske DNK iz bukalne sluzokože rađena je komercijalnim kitom za izolaciju DNK (PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen) a po uputstvu proizvođača. Uzorci su uzimani sterilnim štapićima za uzimanje uzorka brisa i čuvani na -20°C do izolacije.

Postupak:

1. podesiti vodeno kupatilo ili šejker na 55°C.
2. Vrh brisa iseći makazama i staviti ga u sterilnu mikrotubu od 2mL. Dodati 400 µL fosfatnog pufera (PBS-phosphate buffered saline)-a u uzorak i par puta izvorteksovati
3. U drugu mikrotubu od 2mL dodati 20 µl Proteinaze K
4. Prebaciti 200-600 µL lizata brisa u mikrotubu sa proteinazom K. Resuspendovati.
5. Dodati istu količinu PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer u lizat (500:500) i kratko izvorteksovati
6. Inkubirati uzorak na 55°C 10 minuta
7. Kratko iscentrifugirati uzorak
8. Dodati 200 µL 96–100% etanola u tubicu sa uzorkom. Dobro izmešati sadržaj kratkim vorteksovanjem da bi se dobio homogeni rastvor
9. Uzeti PureLink™ Spin Column u kolekcionalnoj tubici dobijenoj uz kit
10. Prebaciti lizat ćelija (~640 µL) u kolonu
11. Centrifugirati kolonu na 8000rpm 1 minut na sobnoj temperaturi
12. Odbaciti kolekcionalnu tubicu i spin kolonu prebaciti u novu PureLink™ kolekcionalnu tubicu dobijenu uz kit
13. Dodati 500 µL Wash Buffer 1 pripremljenog sa etanolom u kolonicu sa uzorkom
14. Centrifugirati kolonicu na sobnoj temperaturi na 8000rpm 1 minut
15. Odbaciti kolekcionalnu tubicu i kolonu prebaciti u novu kolekcionalnu tubicu dobijenu uz kit
16. Dodati 500 µL Wash Buffer 2 pripremljenog sa etanolom u kolonu

17. Centrifugirati na maksimalnoj brzini 3 minuta na sobnoj temperaturi.
Odbaciti kolekcionu tubicu
18. Prebaciti kolonicu u sterilnu 1.5 mL mirotubu
19. Dodati 25-200 μ L PureLink™ Genomic Elution Buffer u kolonicu sa uzorkom.
20. Inkubirati uzorak na sobnoj temperaturi 1 minut.
21. Centrifugirati kolonicu na maksimalnoj brzini 1 minut na sobnoj temperaturi.

Mikrotuba od 1.5mL sadrži DNK. Uzorak izolovane DNK čuvati na -20°C do upotrebe.

Koncentracija i čistoća genomske DNK, na osnovu kojih se određuje količina uzorka DNK koji se stavlja u PCR reakciju, određeni su direktnim očitavanjem sa spektrofotometra (BioPhotometer, Eppendorf), a kvalitet izolovane DNK je proveren puštanjem uzoraka (5 μ L izolovane DNK + 1 μ L boje) na 1,5% agaroznom gelu. Uzorci koji nisu pokazali jasno definisanu traku na gelu, već razmaz, nisu uzeti u rad jer je taj uzorak fragmentisan i dao je trake različite dužine.

3.2.1. Lančana reakcija polimeraze (PCR)

Lančana reakcija polimeraze je in vitro amplifikacija željene DNK sekvence i predstavlja imitaciju DNK replikacije (DNK udvajanja).

Ponavljanje cikličnih promena temperature, koji se sastoje iz denaturacije DNK, hibridizacije prajmera (aniling) i ekstenzije hibridizovanih prajmera DNK polimerazom, stvara amplifikate željene sekvence čiji se broj eksponencijalno uvećava. Krajevi amplifikovanog fragmenta su definisani 5' krajevima prajmera, a njihova veličina je određena rastojanjem između sekvenci sa kojima su prajmeri komplementarni. Reakcija je lančana i eksponencijalna, jer novosintetisani lanci DNK postaju matrice za sintezu DNK u narednim ciklusima. Tako se željeni fragment DNK za nekoliko sati može umnožiti u 10^6 - 10^9 kopija.

PCR reakciona smeša sadrži komponente neophodne za in vitro DNK sintezu:

- DNK uzorak-matrica, koja se umnožava, mora biti jednolančana, denaturisani dupleks DNK. Jedan od uslova uspešne PCR reakcije jeste i čistoća i optimalna koncentracija matrice, jer u suprotnom može doći do smanjene efikasnosti reakcije;
- Graničnike, prajmere (eng. primers)-sintetičke jednolančane oligonukleotide komplementarne krajevima sekvence koja se umnožava, a koji su neophodni za započinjanje sinteze DNK od strane polimeraze. Oni moraju zadovoljavati neke uslove:

-dužina 14-40 nukleotida, čime se može očekivati da se sekvenca komplementarna prajmeru nalazi na jednom mestu u 3×10^9 nukleotida,

-G/C sadržaj 40-60%.

-balansirana distribucija G/C i A/T regiona

-temperatura topljenja 42° - 65° C

-biraju se prajmeri sličnih tački topljenja (razlika najviše 5° C)

-da ne sadrže 3' kraj komplementaran 3' kraju drugog prajmera u PCR-u, kako bi se izbeglo stvaranje primer-dimer-a.

-da ne sadrže palindromske sekvence, kako bi se izbeglo stvaranje struktura ukosnica i izbeglo smanjenje efikasnosti hibridizacije prajmera sa DNK matricom

-ako se koriste degenerisani prajmeri, najmanje 3 konzervirana nukleotida se moraju nalaziti na 3'-kraju

-dobro procenjena temperatura topljenja i temperatura anilinga (T_a) prajmera: ako je prajmer kraći od 25 nukleotida, približna temperatura topljenja (T_m) se računaju po sledećoj formuli

$$T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$$

G, C, A, T-broj navedenog nukleotida u prajmeru

Ta bi trebalo da je približno 5°C niža od od T_m . Ako je prajmer duži od 25 nuklotida T_m bi trebalo preračunati pomoću specijalizovanog kompjuterskog programa.

- Dezoksi-nukleotide (dNTP)-gradivne elemente DNK, u ekvimolarnim koncentracijama. Koncentracija svakog dNTP-a u reakcionoj smeši je obično 200 μ M. Veoma je važno imati jednake koncentracije svakog dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) jer razlika u koncentraciji samo jednog dNTP-a dramatično povećava nivo pogrešne ugradnje.
- Taq DNK polimerazu-termostabilnu DNK polimerazu koja katalizuje ugradnju dNTP-ova po principu komplementarnosti sa DNK matricom, 5'-3' DNK zavisna DNK polimeraza, bez 3'-5' egzonukleazne aktivnosti. Optimalna temperatura za rad ovog enzima je 72°C, na kojoj ugrađuje 150 nukleotida u sekundi. Obično se koristi 1-1.5 U Taq DNA polimeraze za reakcionu smešu zapremine 50 μ L. Povećana koncentracija ovog enzima može dovesti do sinteze nespecifičnih produkata. Ali, ako su u reakcionoj smeši prisutni inhibitori reakcije (nečista DNK...) potrebno je dodati veću koncentraciju Taq DNA Polimeraze (2-3U) kako bi se obezbedio bolji prinos amplifikata.
- Mg²⁺jone-Taq polimeraza za svoj rad zahteva ove jone a oni dodatno stabilizuju dNTP-ove, prajmere i matricu. Malo Mg²⁺ jona smanjuje prinos PCR produkata, a previše povećava prinos nespecifičnih produkata i povećava šansu za ugradnju pogrešnog nukleotida. Preporučeni opseg koncentracije MgCl₂ je 1-4mM, u zavisnosti od uslova reakcije. Ako DNK uzorak sadrži EDTA ili neke druge helatore koncentraciju MgCl₂ treba proporcionalno povećati u reakcionoj smeši
- Pufer-obebeđuje optimalnu aktivnost DNK polimeraze.
- Vodu

PCR reakcija se odvija u mikrotubi zapremine 0,2-0,5 μ L i zasniva se na cikličnim temperaturnim promenama. Jedan ciklus se sastoji iz tri koraka:

-denaturacije DNK-raskidanje vodoničnih veza između komplementarnih lanaca na temperaturi 94°C-95°C kako bi nastali jednolancani molekuli DNK koji služe kao matrice;

-hibridizacije prajmera sa matricom (aniling prajmera)-vezivanje graničnika za komplementarnu sekvencu lanca matrice na optimalnoj temperaturi u rasponu 42°C-65°C;

-elongacije prajmera-ugradnja nukleotida na 3' krajevima prajmera katalizovana DNK zavisnom DNK polimerazom u prisustvu Mg^{2+} na optimalnoj temperaturi (72°C).

Ponavljanje ovih ciklusa 25-40 puta rezultira u eksponencijalnom umnožavanju željenog segmenta DNK. Veoma često se pre temperaturnih ciklusa u reakciju uvodi i inicijalna denaturacija, 5-10min na 94°-95°C radi kompletne denaturacije DNK matrice, a po završetku temperaturnih ciklusa i finalna elongacija na 72°C u trajanju 5-15 minutapri čemu dolazi do kompletiranja parcijalno sintetisanih PCR produkata.

3.2.3. Agarozna gel elektroforeza

Agarozna gel elektroforeza je korišćena za proveru uspešnosti amplifikacije fragmenata dobijenih PCR metodom i za određivanja genotipa na osnovu rasporeda traka posle restrikcije amplifikata restrikcionim enzimima.

Agarozna je inertni prirodni polisaharid. Kada se vodeni rastvor agaroze zagreje do ključanja agarozna se u potpunosti rastvori i tokom hlađenja dolazi do umrežavanja polimera na takav način da se formira matriks-gel, sa ravnomernim porama, čija veličina zavisi od koncentracije rastvora agaroze. Kada se tako formirani agarozni gel potopi u odgovarajući pufer i primeni električno polje, dolazi do kretanja molekula kroz matriks, a u pravcu električnog polja. DNK kao negativno naelektrisan molekula na neutralnom pH kreće se u smeru anode. Brzina kretanja naelektrisanih molekula u električnom polju je funkcija njihove veličine (mase ili dužine), naelektrisanja ili konformacije, kao i veličine pora gela i jačine primenjenog električnog polja. Poređenjem brzine kretanja molekula DNK koji ispituje, sa brzinom kretanja DNK

poznate veličine (DNK markerom, eng Ladder), elektroforezom se može proceniti veličina ispitivanog DNK fragmenta. Mogućnost razdvajanja molekula DNK različitih dužina zavisi od gustine gela. Kvalitet genomske DNK se stoga proverava na 1%, dok se proverava PCR amplifikata vrši, konkretno u ovom radu na 3% agaroznom gelu. Za vizuelizaciju molekula DNK u gelu koristi se etidijum-bromid, interkalirajući agens koji fluorescira pod dejstvom UV svetla. Intenzitet fluorescencije proporcionalan je količini DNK molekula u datoj traci na gelu

Potrebno:

- 10XTBE pufer (60,50g Tris-a, (AppliChem) 30,85g Borne kiseline (AppliChem), 3,72g EDTA (etilen diamin tetra acetic acid) (AppliChem) u 1000mL ddH₂O);
- Agaroz (TopVision™ LM GQ Agarose, Fermentas)
- Etidijum bromid (1% vodeni rastvor, 10mg/mL,AppliChem);
- Boja za elektroforezu (6X DNA Loading Dye: 10mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03% bromophenol blue, 0.03% xylene cyanol FF, 60% glicerol, 60 mM EDTA, Fermentas)
- DNK marker (O'RangeRuler™ 100bp DNA Ladder, ready-to-use (100-1500 bp),Fermentas; BenchTop Markers 50-1000bp, Promega)

Postupak:

-U stakleni erlenmajer sipa se agaroz i 1XTBE pufer u zavisnosti od potrebne koncentracije gela i veličine kadice za elektroforezu, a po uputstvu proizvođača;

-Erlenmajer se poklopi aluminijumskom folijom i zagreva na magnetnoj mešalici do ključanja,

-Nakon ključanja, rastvor je bistar i hladi se do približno 50°C-60°C, kada se u njega stavlja 5-10μL etidijum-bromida,

- Formirati kadicu (kalup za gel) i u nju staviti češljeve i postaviti je u aparat (BlueMarine 200, Serva Electrophoresis GmbH) ili na ravnu površinu,

-Naliti agarozni rastvor u kalup i ostaviti da polimeriše oko 30 minuta,

-Potom se odstrane češljevi, čime su formirani bunarići u koje se naliva uzorak i graničnici na kalupu. Ovakav gel u kadici se stavlja u aparat i prelijeva 1XTBE puferom do predviđenog nivoa.

-Uzorci se nalivaju u bunariće: 10 μ L uzorka + 2 μ L boje,

-Voltaža i struja se podešavaju na osnovu uputstva proizvođača, a elektroforeza teče dok donja boja ne iscuri sa gela,

-Analiza gela se vrši u UVsolo, Whatman Biometra sistemu (UV Transilluminator + mračna komora + kamera + thermal video printer)

3.2.4. Poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE)

PAGE je korišćena za određivanja genotipa na osnovu rasporeda traka posle restrikcije amplifikata restrikcionim enzimima ali samo u slučaju da trake nisu bile jasno vidljive na agaroznom gelu.

Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu je vertikalna elektroforeza. Poliakrilamidni gel je baziran na ko-polimerizaciji akrilamida i bis-akrilamida. Polimerizacijom monomera akrilamida nastaju dugački lanci polimera a bis-akrilamid umrežava lance polimera (tzv „kros-linker“) i to u prisustvu inicijatora i katalizatora reakcije amonijumpersulfata (APS) i N, N, N', N'-tetrametilendiamina (TEMED). Za razdvajanje fragmenata DNK koristi se nednaturišući poliakrilamidni gel, a PAGE je jedna od najboljih metoda za razdvajanje nukleinskih kiselina jer ima mnogo veću rezoluciju u odnosu na agarozni gel. U ovoj studiji koristili smo 8% ili 10% separacioni poliakrilamidni gel.

Potrebno:

- ddH₂O

- 10XTBE pufer (60,50g Tris-a, (AppliChem) 30,85g Borne kiseline (AppliChem), 3,72g EDTA (etilen diamin tetra acetic acid) (AppliChem) u 1000mL ddH₂O);
- Akrilamid (AppliChem)
- Bisakrilamid (AppliChem)
- Amonium persulfat-APS (10% rastvor, AppliChem);
- N, N', N'-tetrametilendiamina -TEMED (AppliChem)
- Etidijum bromid (1% vodeni rastvor, 10mg/mL,AppliChem);
- Boja za elektroforezu (6X DNA Loading Dye: 10mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03% bromophenol blue, 0.03% xylene cyanol FF, 60% glicerol, 60 mM EDTA, Fermentas)
- DNK marker (O'RangeRuler™ 100bp DNA Ladder, ready-to-use (100-1500 bp),Fermentas; BenchTop Markers 50-1000bp, Promega)

Postupak:

-U staklenu graduisanu epruvetu dodavati komponente gela, s tim što se APS i TEMED dodaju na kraju, lagano promešati.

-gel naliti u već formirane staklene 'sendviče';

-postaviti češljice i ostaviti gel da polimerizuje (45min-1h);

-naliti 1XTBE u unutrašnju i spoljašnju kadnicu elektroforeze;

-kada gel polimerizuje, postaviti 'sendviče' u aparat za elektroforezu (BlueVertical 102, Serva Electrophoresis GmbH);

-odstraniti češljeve, i naliti uzorke u formirane bunariće (10 µL uzorka + 2 µL boje);

-voltaža i struja se podešavaju na osnovu uputstva proizvođača, a elektroforeza teče dok donja boja ne iscure sa gela;

-gel potopiti u rastvor EtBr 10min

-analiza gela se vrši u UVsolo, Whatman Biometra sistemu (UV Transilluminator + mračna komora + kamera + thermal video printer)

Tabela 3. Poliakrilamidni gelovi

Gel	ddH₂O	5XTBE	Akrilamid/Bis akrilamid	APS	TEMED
%	mL	mL	30% (29:1)	(10%) μL	μL
8	6,4	2,4	3,2	200	10
10	5,6	2,4	4,0	200	10
12	4,8	2,4	4.8	200	10

3.2.5. Restrikciona digestija PCR produkata i analiza dužine restrikcioni fragmenata

Restrikcioni enzimi su prečišćeni iz bakterija i spadaju u grupu nukleaza-
endonukleaze koje imaju sposobnost da prepoznaju specifične sekvence na dsDNK
dužine 4-6 baznih parova, tzv mesta prepoznavanja ili restrikciona mesta i da iseku
DNK molekul u okviru ili veoma blizu tih specifičnih sekvenci.

Restrikciona mesta se nasleđuju po Mendelovim pravilima i spadaju u normalne
polimorfizme poznate kao polimorfizmi dužine restrikcioni fragmenata (eng. *Restriction
Fragment Length Polymorphism* - RFLP). Ovi polimorfizmi se javljaju zbog razlika među
individuama u broju restrikcioni mesta u okviru ispitivanog DNK fragmenta i ovakva
analiza se primenjuje u slučajevima kada se mutacijom stvara ili ukida određeno
restrikciono mesto. DNK se posle restrikcije nanosi na poliakrilamidni ili agarozni gel
kroz koji protiče jednosmerna struja, a restrikcioni fragmenti se međusobno mogu

razdvojiti na osnovu dužine: fragmenti različite dužine će zauzimati različite položaje na gelu u odnosu na elektrodu ka kojoj se kreću.

3.2.5.1. Ispitivanje genskih polimorfizama PCR-RFLP metodom

Za sve ispitivane polimorfizme koristili smo 2X PCR Master Mix (Taq DNA polimeraza, reakcioni pufer, $MgCl_2$, i dNTP, Fermentas) uz dodatak $0.5\mu M$ za svaki prajmer i $0.2\mu g$ DNK uzorka u PCR reakcionoj smeši finalne zapremine $20\mu L$. PCR je rađen u TGradient Termocycler aparatu (Whatman, Biometra).

Digestija restrikcionim enzimima rađena je po uputstvu proizvođača (Fermentas Life Science).

Za proveru amplifikacije i genotipizaciju posle digestije restrikcionim enzimima, koristili smo 3% agarozni gel ili 8%-10% poliakrilamidni gel.

Polimorfizmi u genu za paraoksonazu 1-L55M, Q192R i C(-107)T

Za amplifikaciju polimorfizama PON1 u kodirajućem regionu L55M (egzon 6) i Q192R (egzon 3) upotrebljeni su prajmeri koje je opisao Humbert (Humbert i sar., 1993), a za amplifikaciju polimorfizma u promotorskom regionu C(-107)T prajmeri po Flekaču (Flekač i sar., 2008), (Tabela 4)

PCR reakciona smeša za sva tri polimorfizma:

1. Voda- $4\mu L$
2. Master Mix- $10\mu L$
3. Prajmer 1- $1\mu L$
4. Prajmer 2- $1\mu L$
5. DNK uzorak- $4\mu L$

U reakcionu smešu za promotorski polimorfizam dodato je i $1\mu L$ 10% DMSO.

PCR je rađen za svaki polimorfizam posebno po sledećim programima:

za L55M i Q192R:

1. inicijalna denaturacija 95°C/5'
2. denaturacije 95°C/30",
3. anilinga 60°C/40",
4. ekstenzije 72°C/1',
5. finalna ekstenzija na 72°C, 5'.

30 ciklusa, od koraka 2 do 4.

PCR reakcija je atenuirana snižavanjem temperature na 4°C u trajanju od 10 minuta.

za C(-107)T:

1. inicijalna denaturacija 94°C/5',
2. denaturacije 95°C/30",
3. anilinga 61°C/45",
4. ekstenzije 72°C/45",
5. finalna ekstenzija na 72°C/5'

35 ciklusa, od koraka 2 do 4.

PCR reakcija je atenuirana snižavanjem temperature na 4°C u trajanju od 10 minuta.

Digestija restrikcionim enzimima:

Restrikciona smeša za Q192R

PCR produkt-10 μ L

Enzim BspPI -0,5 μ L

10x Buffer B-1 μ L

Voda-16 μ L

Inkubacija restrikcione smeše trajala je 4 sata na 37°C.

Restrikciona smeša za L55M:

PCR produkt-10 μ L

Enzim Hin1II (FastDigest)-0,5 μ L

10x Buffer G-1 μ L

Voda-16 μ L

Inkubacija restrikcione smeše trajala je 4 sata na 37°C.

Restrikciona smeša za C(-107)T:

PCR produkt-10 μ L

Enzim BsrBI (FastDigest)-0,5 μ L

10x Buffer -1 μ L

Voda-16 μ L

Inkubacija restrikcione smeše trajala je 20 minuta na 37°C.

Produkti restrikcije su pušteni na agarozni gel i na osnovu rasporeda fragmenata očitani su genotipovi (Tabela 4).

Polimorfizam u genu za Glutation S-transferazu P1 (GSTP1)

Za amplifikaciju polimorfizma Ile105Val u egzonu 5 gena za GSTP1 upotrebljeni su prajmeri koje je opisao Harries (Harries i sar., 1997) (Tabela 4).

PCR reakciona smeša:

1. Voda-4 μ L
2. Master Mix-10 μ L
3. Prajmer 1-1 μ L
4. Prajmer 2-1 μ L
5. DNK uzorak-4 μ L

PCR program:

1. inicijalna denaturacija 94°C/5'
2. denaturacije 94°C/30",
3. anilinga 69°C/30",
4. ekstenzije 72°C/30",
5. finalna ekstenzija na 72°C/5'.

30 ciklusa, od koraka 2 do 4.

PCR reakcija je atenuirana snižavanjem temperature na 4°C u trajanju od 10 minuta.

Digestija restrikcijom endonukleazom:

PCR produkt-10 μ L

Enzim Alw26I (FastDigest)-0,5 μ L

10x Buffer -1 μ L

Voda-16 μ L

Inkubacija restrikcione smeše trajala je 20 minuta na 37°C.

Polimorfizam 112/158 u genu za apolipoprotein E (apoE)

Za amplifikaciju polimorfizma 112/158 u egzonu 4 gena za ApoE upotrebljeni su prajmeri koje je opisao Tsukamoto (Tsukamoto i sar., 1993) (Tabela 4)

PCR reakciona smeša:

1. Voda-4 μ L
2. Master Mix-10 μ L
3. Prajmer 1-1 μ L
4. Prajmer 2-1 μ L
5. DNK uzorak-4 μ L
6. 10% DMSO-1 μ L

PCR program:

1. inicijalna denaturacija 94°C/5',
2. denaturacije 95°C/30",
3. anilinga 61°C/45",
4. ekstenzije 72°C/45",
5. finalna ekstenzija na 72°C/5'.

35 ciklusa, od koraka 2 do 4.

PCR reakcija je atenuirana snižavanjem temperature na 4°C u trajanju od 10minuta.

Digestija restrikcionom endonukleazom:

PCR produkt-10 μ L

Enzim HhaI (FastDigest)-0,5 μ L

10x Buffer -1 μ L

Voda-16 μ L

Inkubacija restrikcione smeše trajala je 20 minuta na 37°C.

3.2.6. Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (Real-time PCR)

Real time PCR metoda kombinuje konvencionalnu PCR amplifikaciju i fluorimetriju. Kod ove metode, detekcija PCR amplifikacije dešava se tokom rane faze reakcije, za razliku od konvencionalnog PCR-a, gde se detekcija produkata vrši na gelu, u poslednjoj fazi. Kod ove metode mogu se razlikovati 3 faze:

- Eksponencijalna faza-tokom ove faze količina DNK se uvećava. Amplifikacija je najbrža, a reakcija je visoko specifična i precizna, detekcija amplifikacije se dešava u ovoj fazi.
- Linearna faza-tokom ove faze amplifikacija se usporava;
- Plato-tokom ove faze reakcija se zaustavlja, nema amplifikacije, a degradacija produkata je sve veća.

Detekcija amplifikata se vrši detekcijom fluorescence koju emituje fluorescentna proba. 'Treshold' je vrednost koja se zadaje aparatu kao nivo fluorescencije koju treba da detektuje. Ct vrednost predstavlja broj ciklusa reakcije koji je potreban da bi se dostigla

zadata vrednost tj treshold. Sto je više DNK u uzorku, to će trebati kraće vreme da se treshold dostigne, tj Ct vrednost je manja.

Za real time kvantifikaciju koriste se dva pristupa:

1. boje koje se specifično vezuju za dvolančanu DNK i
2. specifične, fluorescentnim bojama obeležene probe

Boje koje se specifično vezuju za dvolančanu DNK (najčešće SYBR Green) se dodaju u reakcionu mikrotubu, zajedno sa ostalim komponentama reakcije. Vezivanjem za dvolančanu DNK emituje se fluorescenca, dok u fazi kada je molekul denaturisan, signala nema. Na početku reakcije se očitava bazalna fluorescenca-fluorescenca poreklom od boje koja se nalazi u rastvoru ali se nije vezala za ds DNK. Nivo fluorescence se očitava posle svakog ciklusa, a praćenje tih vrednosti vrši se na monitoru računara, odnosno u realnom vremenu. Usled povećavanja dvolančanih produkata tokom reakcije, nagomilana fluorescenca u jednom trenutku dostiže kritični nivo i fluorescenca počinje eksponencijalno da raste. Ove boje se vezuju i za nespecifične produkte kao što su dimeri prajmera. Da bi se isključili nespecifični produkti analiziraju se krive topljenja produkata reakcije. Svaki gen ima karakterističnu temperaturu topljenja koja se definiše kao temperatura na kojoj je denaturisalo 50% molekula. Oblik i pozicija krive topljenja su određeni veličinom DNK fragmenta i brojem GC odnosno AT baznih parova.

Kod relativne kvantifikacije, tzv komparativnog Ct metoda, naš uzorak se poredi sa nekim drugim uzorkom, pa se na ovaj način ne meri tačna koncentracija DNK. Ovakav vid kvantifikacije podrazumeva postojanje endogene kontrole i kalibratora. Endogena kontrola je normalizator količine DNK u uzorku i to je uvek neki gen koji se eksprimira u svim ćelijam (npr β -globinski gen, aktinski gen...). Kalibrator je uzorak sa kojim se vrši poređenje i to je kontrola. Kod relativne kvantifikacije prvo se poredi Ct vrednosti target gena sa endogenom kontrolom (normalizacija ciljnog gena).

$$\Delta Ct = Ct \text{ target gena} - Ct \text{ endogene kontrole.}$$

Posle toga poredi se ΔCt uzorka sa ΔCt kalibratora:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ uzorka} - \Delta Ct \text{ kalibratora.}$$

Sva ova poređenja radi softver dobijen uz aparat.

3.2.6.1. Ispitivanje genskih polimorfizama PCR/Real Time PCR metodom

Za određivanje polimorfizama delecionog tipa kod GSTM1 i GSTT1 koristili smo dva pristupa: PCR i real time PCR metode. Real time PCR metodu smo koristili kada nije bilo moguće amplifikovati željene regione kod ovih gena konvencionalnim PCR-om. Za amplifikaciju radili smo multipleks reakcije a koristili smo prajmere za GSTM1 i GSTT1 koje je opisala Voso (Voso i sar., 2002), a kao kontrolu uspešnosti PCR reakcije koristili smo prajmere za β -globin gen (Saiki i sar., 1988). (Tabela 4). Prisustvo/odsustvo gena utvrđena je preko različitih temperatura topljenja produkata amplifikacije na real-time PCR aparatu

PCR reakciona smeša za multipleks reakciju:

1. Voda-5 μ L
2. Multiplex PCR Master Mix (2x)*-12,5 μ L
3. Prajmer Mix (2 μ M svakog prajmera, Tabela 3)-2,5 μ L
5. DNK uzorak-5 μ L

PCR program za multipleks (M1/T1/ β -globin) reakciju

1. inicijalna denaturacija 94°C/5'
2. denaturacije 94°C/30",
3. anilinga 69°C/30",

4. ekstenzije 72°C/30",
5. finalna ekstenzija na 72°C/5'.

30 ciklusa, od koraka 2 do 4.

PCR reakcija je atenuirana snižavanjem temperature na 4°C u trajanju od 10 minuta.

*2x Qiagen Multiplex PCR MasterMix sadrži HotStarTaq DNA polimerazu, 6 mM MgCl₂ i dNTP mix]

Real time PCR reakciona smeša za multipleks reakciju:

1. Voda-5μL
2. Real time PCR Master Mix (2x)**-1,5μL
3. Prajmer Mix (2μM svakog prajmera, Tabela 3)-2,5μL
5. DNK uzorak-5μL

Real time PCR program za multipleks (M1/T1/β-globin) reakciju

1. inicijalna denaturacija 94°C/5'
2. denaturacije 94°C/2'
3. anilinga 59°C/1',
4. ekstenzije 72°C/1',
5. finalna ekstenzija na 72°C/3'.

35 ciklusa, od koraka 2 do 4.

** 2x Maxim SYBR Green/ROX qPCR Master Mix

3.2.7. Statistička analiza

Statistička obrada podataka urađena je uz pomoć nekoliko testova: Hi (χ^2) kvadrat test za utvrđivanje razlika u distribuciji različitih alela i genotipova u grupama obolelih od diabetes mellitus tip 2 i ateroskleroze i obolelih od ateroskleroze i kontrolnoj grupi, testova senzitivnosti i specifičnosti kao i logističkom regresionom analizom za utvrđivanje rizika od oboljevanja. U slučajevima kada je bilo potrebno analizirati grupe sa 0 ili manje od 5 ispitanika koristili smo Fišerov (Fischer) test tačne verovatnoće. U radu je korišćen statistički program SPSS verzija 17.

Tabela 4. Sekvence prajmera i restrikcioni enzimi upotrebljeni u ovom radu

Polimorfizam	Prajmeri	PCR fragment (bp)	Restrikciona Endonukleaza	RFLP fragmenti (bp)	Referenca
Q192R (PON1)	5'-TATTGTTGCTGTGGGACCTGAG-3' 5'-CACGCTAAACCCAAATACATCTC-3'	99	BspPI	Q alel: 99, R alela: 63,36	Humbert i sar., 1993
L55M (PON1)	5'-GAAGAGTGATGTTATAGCCCCAG- 3' 5'-ACTCACAGAGCTAATGAAAGCCA-3'	169	Hin1II	L alel: 169 M alel: 127,42	Humbert i sar., 1993
C(-107)T (PON1)	5'-GGGGCTCGTGGAGCTGGCAG-3' 5'-CAATGTGAGGCCAAAGAAGC-3'	300	BsrBI	T alel: 300 C alel: 235,65	Flekač i sar., 2008
Ile105Val (GSTP1)	5'-ACCCCAGGGCTCTATGGG AA-3' 5'-TGAGGGCACAAGAAGCCCCT-3'	176	Alw26I	Ile (a) alel: 176 Val (b) alel: 91+85	Harries i sar., 1997
112/158 (apoE)	5'-GCACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGC-3' 5'-GGCGCTCGCGGATGGCGCTGAG-3'	270	HhaI	ε4alel: 72,48,38,35; ε3alel: 91,48,38,35; ε2alel: 91,83,38	Tsukamoto i sar., 1993
GSTT1	5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCT-3' 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'	480	-	-	Voso i sar., 2002
GSTM1	5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3' 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3'	215	-	-	Voso i sar., 2002
β-globin	5'-ACACAACCTGTGTTCAACTAGC-3' 5'-CAACTTCATCCACGTTACC-3'	110	-	-	Saiki i sar., 1988

4. REZULTATI

4.1. Analiza rezultata iz anamneze

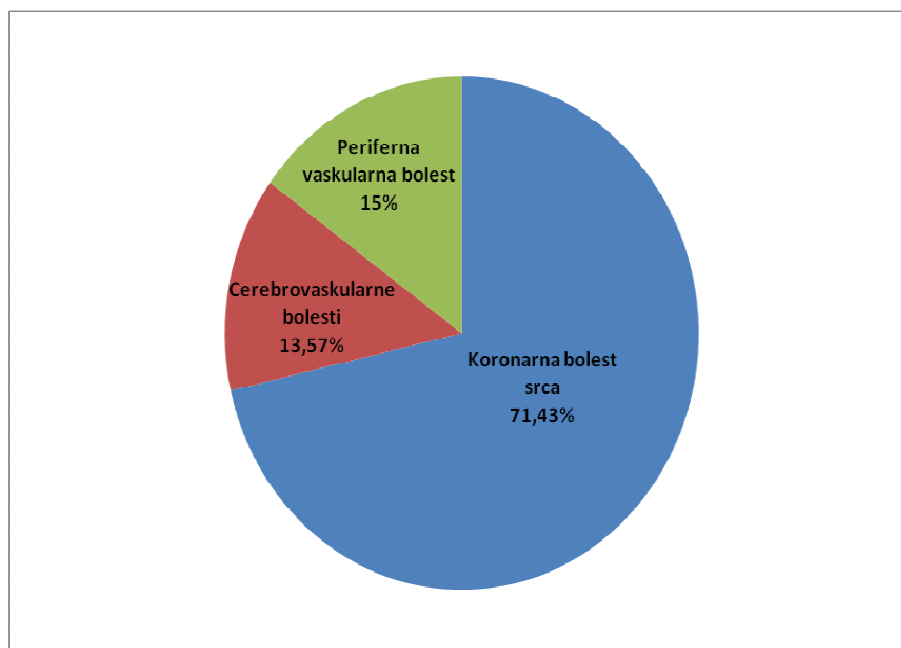
Genetičko ispitivanje je obuhvatilo ukupno 300 ispitanika podjeljenih u tri grupe:

DM+A-grupa bolesnika sa diabetes mellitus tip 2 i nekom od kliničkih manifestacija ateroskleroze-140 ispitanika; **A-grupa** bolesnika sa nekom od kliničkih manifestacija ateroskleroze-60 ispitanika; **K-kontrolna grupa**-100 ispitanika.

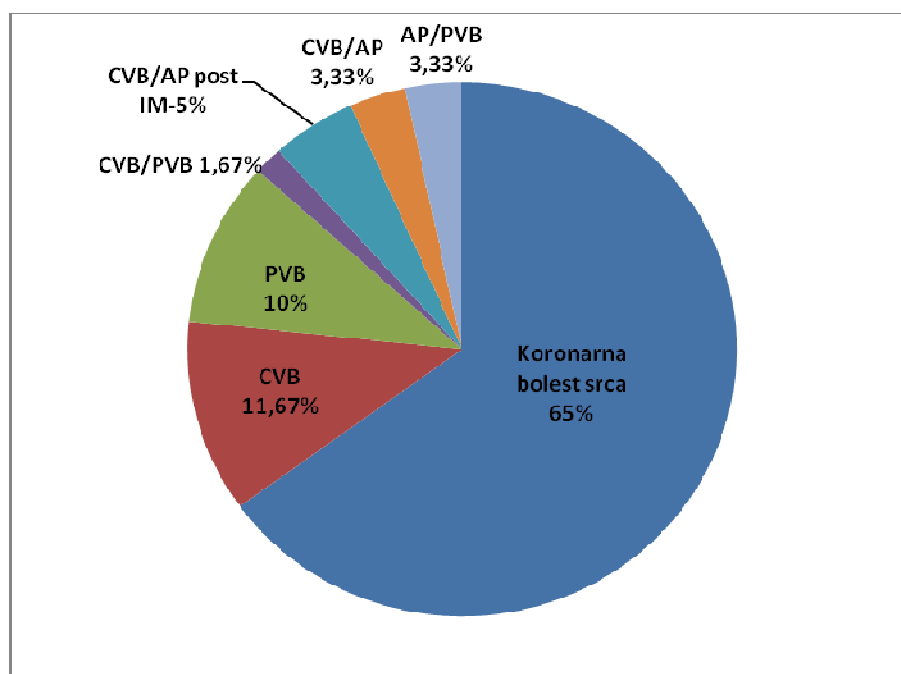
Kod svih ispitanika uspešno je obavljeno PCR umnožavanje regiona od interesa u ispitivanim genima. Genotipovi su uspešno očitani ili sa agaroznog gela i PAGE posle digestije odgovarajućim restrikcionim enzimima ili putem analize krive topljena metodom real-time PCR-a.

Prema anamnestičkim podacima iz grupe DM+A koronarnu bolest srca ima 71,43% obolelih, cerebrovaskularnu bolest (CVB) ima 13,57% ispitanika, dok perifernu vaskularnu bolest (PVB) ima 15% ispitanika iz ove grupe (Slika 12).

U grupi u kojoj su pacijenti sa nekom od kliničkih manifestacija ateroskleroze (A), koronarnu bolest srca ima 65%, CVB ima 11,67% a PVB ima 10% ispitanika. Jedan ispitanik (1,67%) ima CVB u kombinaciji sa PVB, tri ispitanika (5%) imaju kombinaciju CVB, anginu pectoris koja se javila posle infarkta miokarda (AP post IM), a 3,33% ispitanika ima kombinaciju CVB/AP i AP/PVB (Slika 13).



Slika 12. Učestalost kliničkih manifestacija ateroskleroze u grupi ispitanika sa diabetes mellitus tip 2 (DM+A)



Slika 13. Učestalost kliničkih manifestacija ateroskleroze u grupi ispitanika sa nekom od kliničkih manifestacija ateroskleroze (A)

Podaci iz anamneze ukazuju da 124–oro (88,57%) obolelih iz grupe DM+A imaju hipertenziju, hiperlipidemija se javlja kod 121 (86,4%), a pozitivnu porodičnu istoriju KVB ima 90 (64,29%) obolelih. Takođe, postoji statistički značana razlika u zastupljenosti anamnestičkih podataka između DM+A i K grupa (Tabela 5).

Tabela 5. Učestalost oboljenja iz anamneze kod ispitanika iz grupe DM+A i kontrolne grupe i logistička regresiona analiza podataka

Anamnestički podaci		DM+A N (%)	K N (%)	OR	95%CI	P
Hipertenzija	nema	16 (11,43)	100	infinity	NaN- infinity	<.0001
	ima	124 (88,57)	0			
Hiperlipidemija	nema	19 (13,57)	100	infinity	NaN- infinity	<.0001
	ima	121 (86,43)	0			
Porodična istorija KVB	nema	50 (35,71)	100	infinity	NaN- infinity	<.0001
	ima	90 (64,29)	0			

DM+A-diabetes mellitus tip 2 i ateroskleroza; K-kontrolna grupa, N-broj ispitanika; OR-količnik verovatnoće (odds ratio); 95%CI-interval poverenja (confidence interval); P-verovatnoća

Tabela 6. Učestalost oboljenja iz anamneze kod ispitanika iz grupe A i kontrolne grupe i logistička regresiona analiza podataka

Anamnestički podaci		A	K	OR	95%CI	P
		N (%)	N (%)			
Hipertenzija	nema	6 (10)	100	infinity	NaN- infinity	<.0001
	ima	54 (90)	0			
Hiperlipidemija	nema	12 (20)	100	infinity	NaN- infinity	<.0001
	ima	48 (80)	0			
Porodična istorija KVB	nema	31 (51,67)	100	infinity	NaN- infinity	<.0001
	ima	29 (48,33)	0			

A-ateroskleroza; K-kontrolna grupa, N-broj ispitanika; OR-količnik verovatnoće (odds ratio); 95%CI-interval poverenja (confidence interval); P-verovatnoća

Podaci iz anamneze za A grupu ispitanika ukazuju da 54–oro (90%) obolelih ima hipertenziju, hiperlipidemija se javlja kod 48 (80%), a pozitivnu porodičnu istoriju KVB ima 29 obolelih (48,33%). S obzirom na izbor kontrolne grupe, postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti anamnestičkih podataka između A i K grupa (Tabela 6).

U Tabeli 7 prikazani su rezultati dobijeni logističko regresionom analizom za anamnestičke podatke kod dve grupe obolelih (DM+A i A). Hipertenzija iskazuje neznatno veći rizik za pojavu ateroskleroze u odnosu dijabetes i ateroskleroze (OR=0,86, 95%CI=0,32-3,13). Hiperlipidemija nosi za 1,60 puta veći rizik za nastanak kardiovaskularnih komplikacija kod DM tip 2 u odnosu na obolele od ateroskleroze (OR=1,59, 95%CI=0,72-3,53). Ove vrednosti nisu statistički značajne. Pozitivna porodična istorija KVB kod obolelih od DM i A nosi 1,92 puta veći rizik za razvoj

oboljenja u odnosu na obolele od neke od kliničke manifestacije ateroskleroze (OR=1,92, 95%CI=1,04-3,55). Vrednost je statistički značajna.

Tabela 7. Učestalost oboljenja iz anamneze kod ispitanika iz grupe DM+A i A i logistička regresiona analiza podataka

Anamnestički podaci		DM+A	A	OR	95%CI	P
		N (%)	N (%)			
Hipertenzija	nema	16 (11,43)	6 (10)	0,86	0,32-3,13	0,76
	ima	124 (88,57)	54 (90)			
Hiperlipidemija	nema	19 (13,57)	12 (20)	1,59	0,72-3,53	0,25
	ima	121 (86,43)	48 (80)			
Porodična istorija KVB	nema	50 (35,71)	31 (51,67)	1,92	1,04-3,55	0,035
	ima	90 (64,29)	29 (48,33)			

DM+A-diabetes mellitus tip 2 i ateroskleroza; A-ateroskleroza; N-broj ispitanika; OR-količnik verovatnoće (odds ratio); 95%CI-interval poverenja (confidence interval); P-verovatnoća

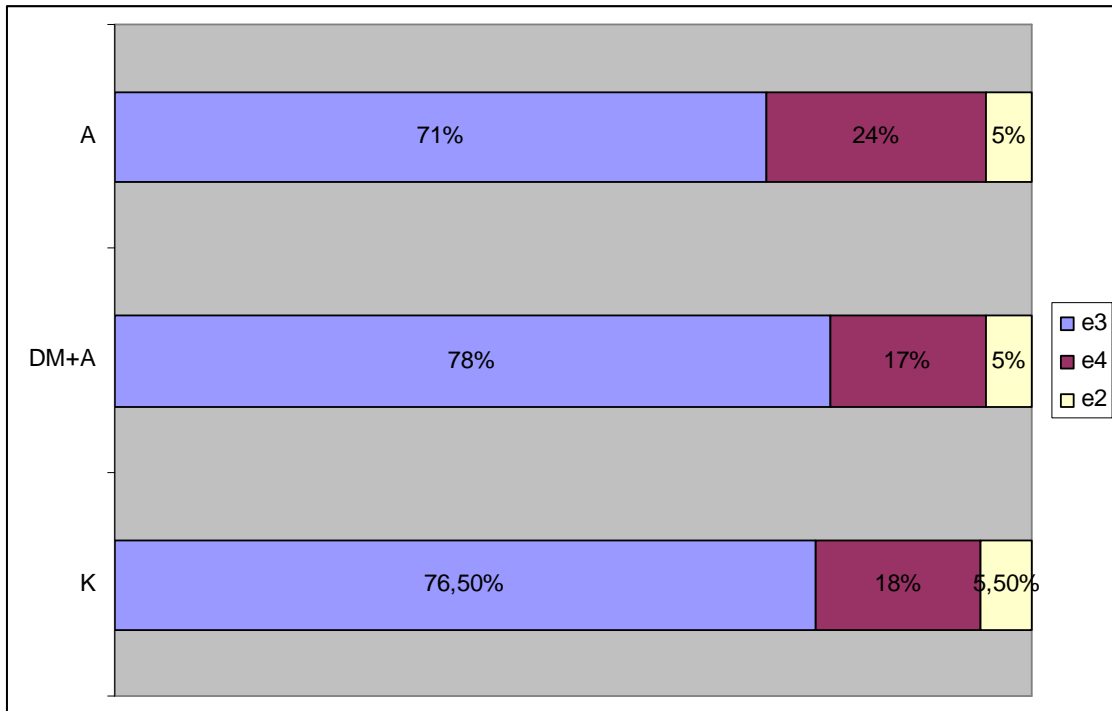
4.2. Analiza genetičkih rezultata

4.2.1. ApoE 112/158 polimorfizam

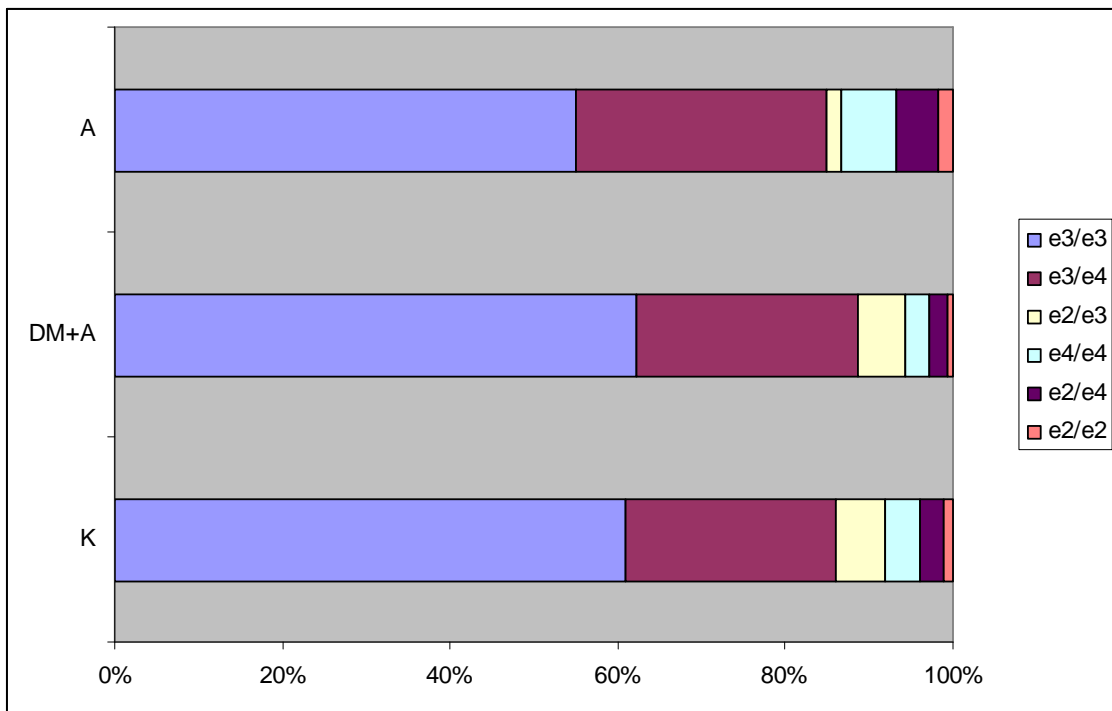
Nukleotidna supstitucija TGC→CTG u egzonu 4 apoE gena (112/158) određuje tri alela- ϵ 2, ϵ 3, i ϵ 4 a oni pak određuju postojanje 6 genotipova: ϵ 2/ ϵ 2, ϵ 2/ ϵ 3, ϵ 2/ ϵ 4, ϵ 3/ ϵ 3, ϵ 3/ ϵ 4, ϵ 4/ ϵ 4.

Raspodela genotipova po ispitivanim grupama je sledeća: u kontrolnoj grupi (K), od ukupno 100 ispitanika 61 ima genotip ϵ 3/ ϵ 3 (61%), 25 ima ϵ 3/ ϵ 4 (25%), 6 ima ϵ 2/ ϵ 3 genotip (6%), 4 ima ϵ 4/ ϵ 4 (4%), 3-oje ϵ 2/ ϵ 4 (3%) i jedan ispitanik ima genotip ϵ 2/ ϵ 2 (1%); u grupi DM+A od ukupno 140 ispitanika 87 ima ima ϵ 3/ ϵ 3 genotip (62,14%), 37 ima ϵ 3/ ϵ 4 (26,43%), 8 ima ϵ 2/ ϵ 3 (5,71%), 4 ima ϵ 4/ ϵ 4 (2,86%), 3-oje ϵ 2/ ϵ 4 (2,14%) i jedan ispitanik ima genotip ϵ 2/ ϵ 2 (0,72%); u grupi A, od ukupno 60 ispitanika 33 ima genotip ϵ 3/ ϵ 3 (55%), 18 ima ϵ 3/ ϵ 4 (30%), po 1 ispitanik iz ove grupe ima ϵ 2/ ϵ 3 (1,67%) i ϵ 2/ ϵ 2 (1,67%), 4 ima ϵ 4/ ϵ 4 (6,67%) i 3-oje ϵ 2/ ϵ 4 (5%) (Tabele 8 i 9, Slika 15).

Na osnovu učestalosti genotipova, izračunate su i učestalosti tri alela apoE gena u sve tri ispitivane grupe. Učestalost alela ϵ 3 u kontrolnoj grupi je 76,5%, u DM+A grupi je 78%, a u A grupi je 71%. Učestalost alela ϵ 4 je 18% u grupi K, 17% u grupi DM+A, i 24% u grupi A. Učestalost alela ϵ 2 je 5,5% u kontrolnoj grupi i 5% u DM+A i u A. (Tabele 8 i 9, Slika 14).



Slika 14. Učestalost 112/158 apoE alela u ispitivanim grupama



Slika 15. Učestalost 112/158 apoE genotipova u ispitivanim grupama.

Na osnovu rezultata iz Tabele 8, može se videti da alel ϵ_4 ne nosi rizik za razvoj ateroskleroze kod obolelih od DM tip 2 (OR=0,94, 95%CI=0,58-1,5) dok alel ϵ_2 nosi 1,2 puta manji rizik za nastanak oboljenja (OR=0,82, 95%CI=0,36-1,89). Genotipovi ϵ_4/ϵ_4 , ϵ_2/ϵ_4 i ϵ_2/ϵ_2 nose 1,4 puta manji rizik (OR=0,71) dok ostali genotipovi ne ispoljavaju rizike u poređenju sa kontrolnom grupom i referentnim genotipom ϵ_3/ϵ_3 .

Na osnovu rezultata predstavljenih u Tabeli 9, može se videti da alel ϵ_4 nosi za skoro 50% veći rizik za nastanak ateroskleroze u grupi ispitanika sa nekom od kliničkih manifestacija ateroskleroze (OR=1,45, 95%CI=0,83-2,53), dok alel ϵ_2 ne iskazuje rizik (OR=0,98, 95%CI=0,35-2,75). Genotipovi ϵ_4/ϵ_4 , ϵ_2/ϵ_4 i ϵ_2/ϵ_2 nose povećan rizik za 84%, dok je za genotip ϵ_3/ϵ_4 taj rizik niži u odnosu na prethodna tri i iznosi 33%. Genotip ϵ_2/ϵ_3 nosi za 3,2 puta manji rizik za nastanak oboljenja u odnosu na kontrolnu grupu (OR=0,31, 95%CI=0,03-2,71). Ni jedna vrednost nije statistički značajna (Tabela 9).

Tabela 8. Učestalost 112/158 apoE alela i genotipova kod ispitanika iz grupe DM+A i kontrolne grupe i logistička regresiona analiza podataka

apoE		DM+A	K	OR	95%CI	P
		N (%)	N (%)			
Učestalost alela	ε3	219 (78)	153 (76,5)	1,00	Standard	0,78
	ε4	48 (17)	36 (18)	0,94	0,58-1,5	
	ε2	13 (5)	11 (5,5)	0,82	0,36-1,89	
Učestalost genotipova	ε3/ε3	87 (62,14)	61 (61)	1,00	Standard	0,92
	ε3/ε4	37 (26,43)	25 (25)	1,04	0,57-1,9	
	ε2/ε3	8 (5,71)	6 (6)	0,95	0,31-2,87	
	ε4/ε4	4 (2,86)	4 (4)	0,71	0,17-2,96	
	ε2/ε4	3 (2,14)	3 (3)	0,71	0,14-3,65	
	ε2/ε2	1 (0,72)	1 (1)	0,71	0,04-11,42	

DM+A-diabetes mellitus tip 2 i ateroskleroza; K-kontrolna grupa; N-broj ispitanika; OR-količnik verovatnoće (odds ratio); 95%CI-interval poverenja (confidence interval); P-verovatnoća, *-Fišerov (Fischer) test tačne verovatnoće

Poređenjem rezultata dobijenih za DM+A i A (Tabela 10), može se videti da alel ε4 u DM+A nosi za 1,56 puta manji rizik za nastanak oboljenja u odnosu grupu A, a alel ε2 nosi za 1,20 puta manji rizik u odnosu na A. Genotip ε3/ε4 u grupi A nosi neznatan rizik u odnosu na grupu DM+A, dok ε2/ε3 u DM+A nosi 3 puta veći rizik za nastanak ateroskleroze. Genotipovi ε4/ε4 ε2/ε4 i ε2/ε2 nose za 2,63 puta veći rizik za nastanak ateroskleroze u grupi A u odnosu na grupu DM+A.

Tabela 9. Učestalost 112/158 apoE alela i genotipova kod ispitanika iz grupe A i kontrolne grupe i logistička regresiona analiza podataka

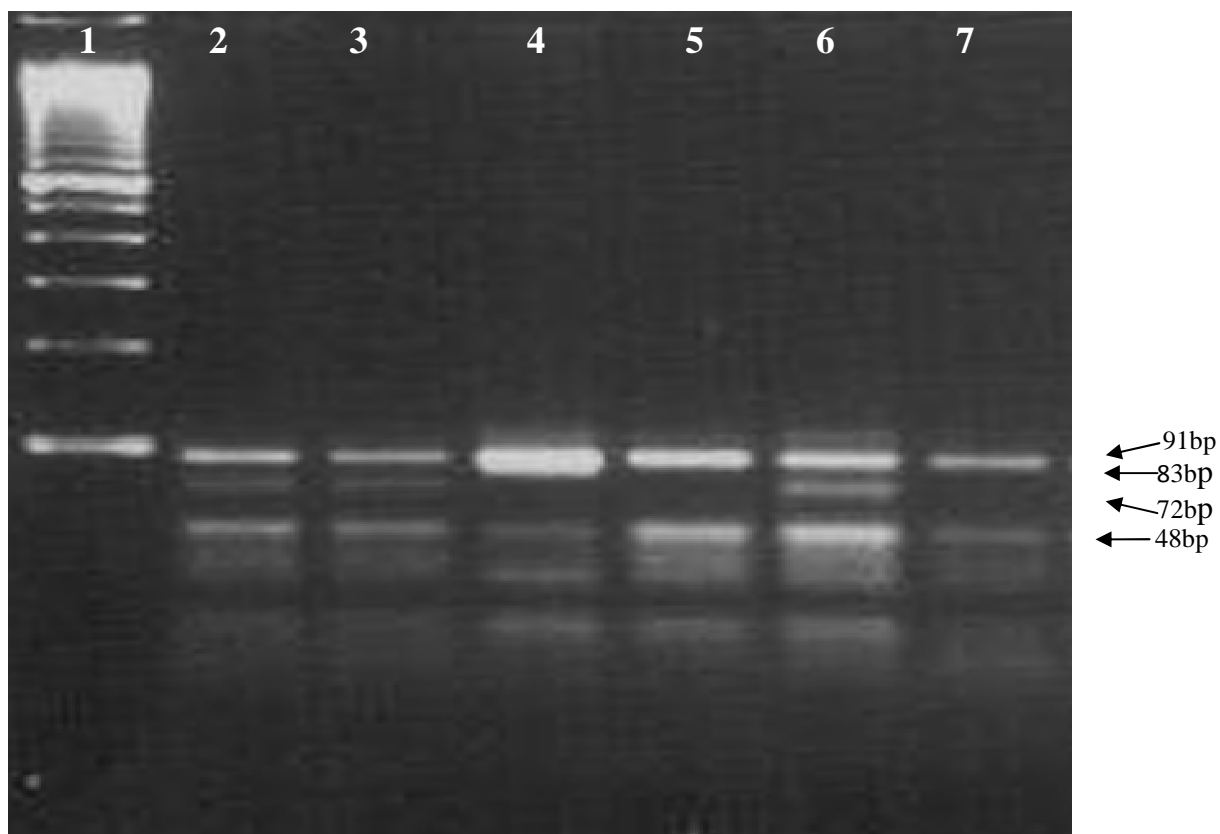
apoE		A	K	OR	95%CI	P
		N (%)	N (%)			
Učestalost alela	$\epsilon 3$	85 (71)	153 (76,5)	1,00	Standard	
	$\epsilon 4$	29 (24)	36 (18)	1,45	0,83-2,53	0,19
	$\epsilon 2$	6 (5)	11 (5,5)	0,98	0,35-2,75	1,00
Učestalost genotipova	$\epsilon 3/\epsilon 3$	33 (55)	61 (61)	1,00	Standard	
	$\epsilon 3/\epsilon 4$	18 (30)	25 (25)	1,33	0,63-2,78	0,45
	$\epsilon 2/\epsilon 3$	1 (1,67)	6 (6)	0,31	0,03-2,71	0,25*
	$\epsilon 4/\epsilon 4$	4 (6,67)	4 (4)	1,84	0,44-8,00	0,31*
	$\epsilon 2/\epsilon 4$	3 (5)	3 (3)	1,84	0,36-9,83	0,36*
	$\epsilon 2/\epsilon 2$	1 (1,67)	1 (1)	1,84	0,11-30,52	0,59*

A- ateroskleroza; K-kontrolna grupa; N-broj ispitanika; OR-količnik verovatnoće (odds ratio); 95%CI-interval poverenja (confidence interval); P-verovatnoća, *-Fišerov (Fischer) test tačne verovatnoće

Tabela10. Učestalost 112/158 apoE alela i genotipova kod ispitanika iz grupe DM+A i A i logistička regresiona analiza podataka

apoE		DM+A	A	OR	95%CI	P
		N (%)	N (%)			
Učestalost alela	ε3	219 (78)	85 (71)	1,00	Standard	
	ε4	48 (17)	29 (24)	0,64	0,38-1,09	0,09
	ε2	13 (5)	6 (5)	0,84	0,31-2,28	0,73
Učestalost genotipova	ε3/ε3	87 (62,14)	33 (55)	1,00	Standard	
	ε3/ε4	37 (26,43)	18 (30)	0,78	0,39-1,56	0,48
	ε2/ε3	8 (5,71)	1 (1,67)	3,00	0,36-25,2	0,28*
	ε4/ε4	4 (2,86)	4 (6,67)	0,38	0,09-1,6	0,17*
	ε2/ε4	3 (2,14)	3 (5)	0,38	0,07-1,97	0,23*
	ε2/ε2	1 (0,72)	1 (1,67)	0,38	0,02-6,24	0,48*

DM+A-diabetes mellitus tip 2 i ateroskleroza; A-ateroskleroza; N-broj ispitanika; OR-količnik verovatnoće (odds ratio); 95%CI-interval poverenja (confidence interval); P-verovatnoća, *-Fišerov (Fischer) test tačne verovatnoće



Slika 16. apoE genotipizacija na 3% agaroznom gelu: 1-DNK marker (100bp); 2,3,6- ϵ 3/ ϵ 4 genotip (91, 72, 48, 38, 35bp); 4- ϵ 2/ ϵ 3 genotip (91, 83, 48, 35bp); 5,7- ϵ 3/ ϵ 3 genotip (91, 48, 38, 35bp).

4.2.2. pon1 Q192R, L55M i C(-107)T polimorfizmi

Analizirana su dva polimorfizma u kodirajućem regionu pon1 gena: Q192R i L55M, i polimorfizam C(-107)T u promotorskom delu.

U Tabelama 11, 12, 14, 15, 17 i 18 i slikama 17 i 18 prikazane su učestalosti genotipova i alela tri ispitivana polimorfizma pon1 gena u tri grupe ispitanika (K, DM+A, A) kao i logistička regresiona analiza podataka.

Učestalost genotipa QQ je najmanja u DM+A grupi (24,3%), u grupama K i A je ta učestalost skoro jednaka (53% za K i 55% za A). Učestalost genotipa QR je najveća u grupi DM+A (60%), a u grupama K i A ta je učestalost skoro ekvivalentna (39% za K i oko 37% za A). U odnosu na sve tri grupe, učestalost RR genotipa je najveća u grupi DM+A (15,7%), dok u grupama K i A iznosi 8% i 8,33% (Tabele 11, 12, 13; Slika 18).

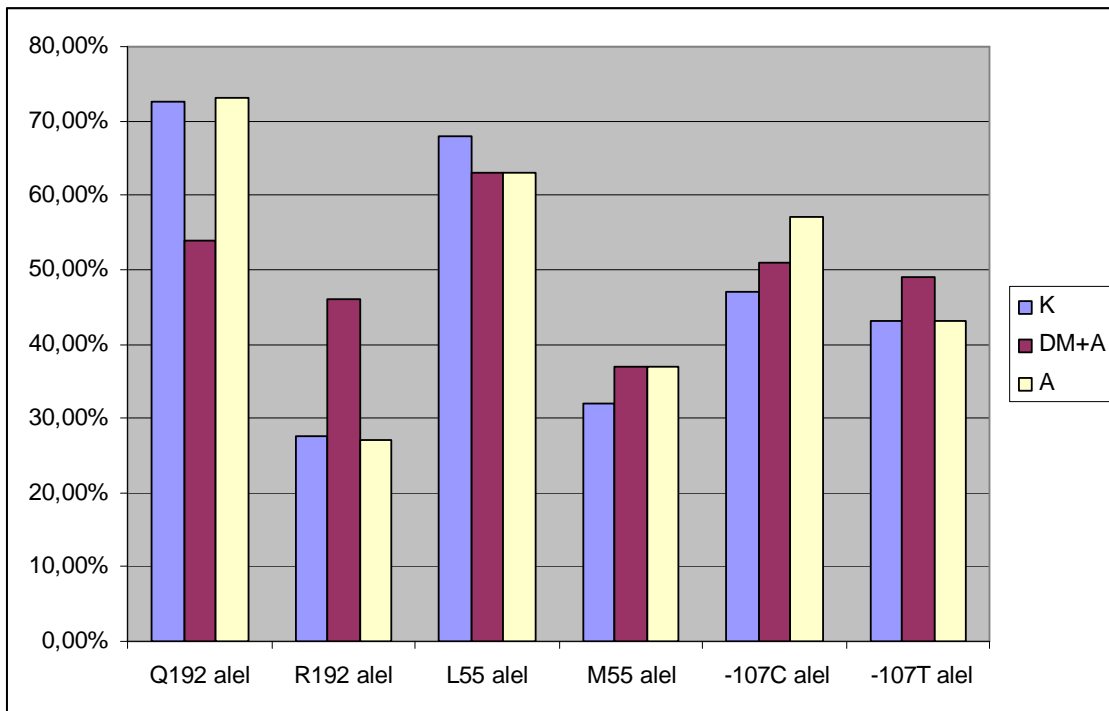
Učestalost alela Q je ista u grupama K i A (72,5%), dok je u grupi DM+A manja (54%). Učestalost alela R je najveća u grupi DM+A-46% za razliku od K i A gde su vrednosti 27,5% i 27% (Tabele 11, 12, 13; Slika 17)

Učestalost genotipa LL je najveća u kontrolnoj grupi (45%) u odnosu na DM+A (39,28%) i A (33,33%); učestalost genotipa LL je najveća u grupi A (60%), dok je u DM+A i K grupama ta učestalost gotovo jednaka (47,14 za DM+A i 46% za K); MM genotip je najzastupljeniji kod DM+A (13,58%), u grupi A je zastupljen sa 6,67%, a u kontrolnoj grupi sa 9% (Tabele 14, 15, 16; Slika 18).

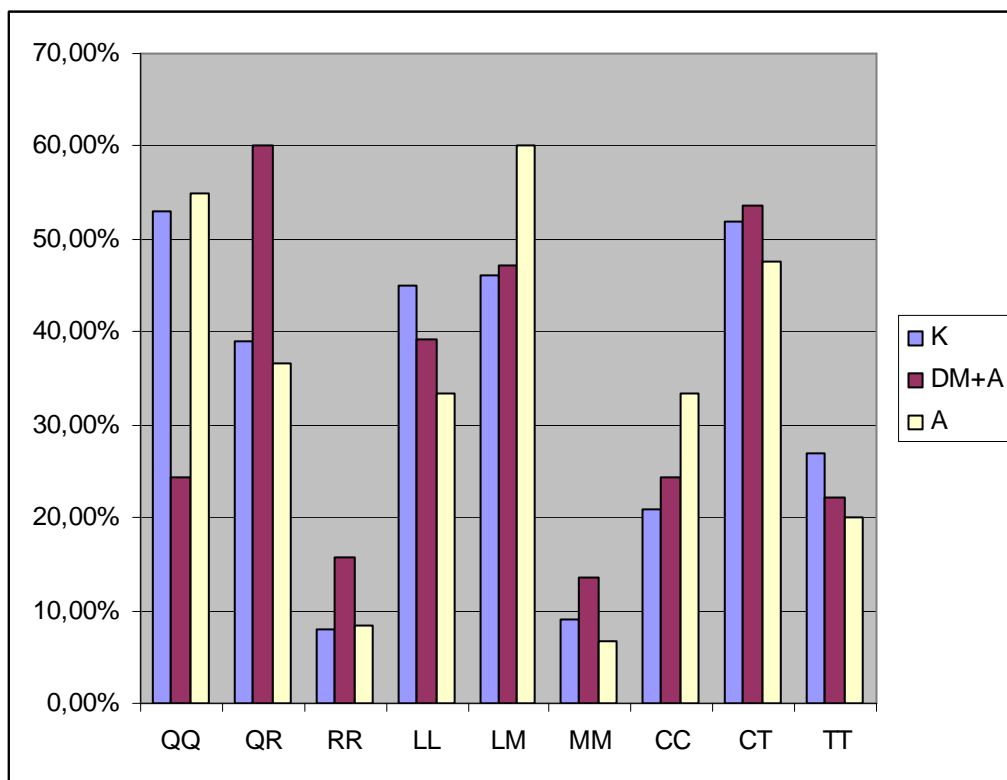
Učestalost alela L i M su podjednake za sve tri ispitivane grupe: za alel L: K-68%, a za DM+A i A po 63%; za alel M 32% za kontrolnu grupu i 37% za DM+A i A grupe ispitanika (Tabele 14, 15, 16; Slika 17).

Genotip CC je u grupi K zastupljen sa 21%, u DM+A sa 24,29% i u grupi A sa 33,33%, gde je i najzastupljeniji. Genotip CT je zastupljen sa 52% u K grupi, sa 53,57% u DM+A grupi i sa 47,67% u grupi A. TT genotip je najzastupljeniji u kontrolnoj grupi (27%), zatim u DM+A (22,14%) i sa 20% u A. (Tabele 17, 18, 19; Slika 18).

Zastupljenosti alela C i T promotorskog polimorfizma C(-107)T su: C -47% za grupu K, 51% za grupu DM+A i 57% za grupu A, dok je učestalost alela T 53% za grupu K, 49% za grupu DM+A i 43% za grupu A (Tabele 17, 17, 19; Slika 17).



Slika 17. Učestalost alela tri polimorfizma pon1 gena u ispitivanim grupama



Slika 18. Učestalost genotipova pon1 u ispitivanim grupama

Tabela 11. Učestalost Q192R alela i genotipova kod ispitanika iz grupe DM+A i kontrolne grupe i logistička regresiona analiza podataka

pon1	Q192R	DM+A N (%)	K N (%)	OR	95%CI	P
Učestalost alela	Q	152 (54)	145 (72,5)	1,00	Standard	
	R	128 (46)	55 (27,5)	2,22	1,5-3,28	<.0001
Učestalost genotipova	QQ	34 (24,3)	53 (53)	1,00	Standard	
	QR	84 (60)	39 (39)	3,36	1,89-5,96	<.0001
	RR	22 (15,7)	8 (8)	4,29	1,71-10,72	0,0012
	QQ+QR/RR	118/22	92/8	2,14	0,91-5,03	0,075
	QQ/QR+RR	34/106	53/47	3,51	2,03-6,1	<.0001

DM+A-diabetes mellitus tip 2 i ateroskleroza; K-kontrolna grupa; N-broj ispitanika; OR-količnik verovatnoće (odds ratio); 95%CI-interval poverenja (confidence interval); P-verovatnoća

Na osnovu rezultata iz Tabele 11 može se zaključiti da osobe koje imaju DM i nose alel R imaju za 2,22 puta statistički značajno povećan rizik za nastanak ateroskleroze u odnosu na osobe koje nose Q alel (OR=2,22, 95%CI=1,5-3,28, P<.0001). Takođe, osobe koje nose QR genotip imaju 3,36 puta povećan rizik (koji je statistički značajan, P<.0001) da obole od ateroskleroze u odnosu na nosioce QQ genotipa (OR=3,36, 95%CI=1,89-5,96), a RR homozigoti imaju 4,29 puta povećan rizik u odnosu na QQ homozigote (OR=4,29, 95%CI=1,71-10,72, P<.0012). Uzeti zajedno, QR i RR (QQ/QR+RR) ispoljavaju 3,51 puta povećan rizik koji je statistički značajan u

odnosu na QQ genotip (OR=3,57, 95%CI=2,03-6,1, P<.0001), dok udruživanje QQ+QR/RR iskazuje 2 puta povećan rizik koji nije statistički značajan kao prethodni, ali se približava statističkoj značajnosti (95%CI=0,2-1,1, P=0,075).

Tabela 12. Učestalost Q192R alela i genotipova kod ispitanika iz grupe A i kontrolne grupe i logistička regresiona analiza podataka

pon1	Q192R	A N (%)	K N (%)	OR	95%CI	P
Učestalost alela	Q	88 (73)	145 (72,5)	1,00	Standard	0,86
	R	32 (27)	55 (27,5)	0,96	0,57-1,6	
Učestalost genotipova	QQ	33 (55)	53 (53)	1,00	Standard	0,78
	QR	22 (36,67)	39 (39)	0,9	0,46-1,79	
	RR	5 (8,33)	8 (8)	1,00	0,3-3,3	
	QQ+QR/RR	55/5	92/8	1,04	0,3-3,4	
	QQ/QR+RR	33/27	53/47	0,92	0,48-1,75	

K-kontrolna grupa; A-ateroskleroza; N-broj ispitanika; OR-količnik verovatnoće (odds ratio); 95%CI-interval poverenja (confidence interval); P-verovatnoća

Rezultati iz Tabele 12 pokazuju da alel R kao i genotipovi QR i RR ne iskazuju rizike u grupi obolelih od neke od kliničkih manifestacija ateroskleroze (Tabela 12).

Tabela 13. Učestalost Q192R alela i genotipova kod ispitanika iz grupe DM+A i A i logistička regresiona analiza podataka

pon1	Q192R	DM+A N (%)	A N (%)	OR	95%CI	P
Učestalost alela	Q	152 (54)	88 (73)	1,00	Standard	
	R	128 (46)	32 (27)	2,28	1,38-3,75	0,001
Učestalost genotipova	QQ	34 (24,3)	33 (55)	1,00	Standard	
	QR	84 (60)	22 (36,67)	3,7	1,9-7,25	<.0001
	RR	22 (15,7)	5 (8,33)	4,27	1,45-12,6	0,006
	QQ+QR/RR	118/22	55/5	2,05	0,74-5,7	0,16
	QQ/QR+RR	34/106	33/27	3,8	2,01-7,22	<.0001

DM+A-diabetes mellitus tip 2 i ateroskleroza, A-ateroskleroza; N-broj ispitanika; OR-količnik verovatnoće (odds ratio); 95%CI-interval poverenja (confidence interval); P-verovatnoća

Rezultati iz Tabele 13 pokazuju da nosioci alela R u grupi ispitanika DM+A imaju 2,28 puta povećan rizik, koji je statistički značajan, da obole od ateroskleroze u odnosu na obolele od ateroskleroze bez dijabetesa tip 2 (OR=2,28, 95%CI=1,38-3,75, P<0.001). Nosioci genotipa QR u grupi DM+A imaju 3,7 puta povećan rizik, koji je statistički značajan, da obole od ateroskleroze u odnosu na obolele iz grupe A (OR=3,7, 95%CI=1,9-7,25, P<0.0001), dok RR homozigoti imaju 4,27 puta veći rizik, koji je statistički značajan (OR=4,27, 95%CI=1,45-12,6, P=0.006). Genotipovi grupisani QQ+QR vs RR, iako iskazuju povećan rizik u grupi DM+A u odnosu na A (OR=2,05, 95%CI=0,74-5,7) ne daju statistički značajne vrednosti (P>0,05), dok grupisani QQ vs

QR+RR imaju 3,8 puta veći rizik za nastanak ateroskleroze (OR=3,8 95%CI= 2,01-7,22). Rizik je statistički značajan (P<0,05) (Tabela 13).

Tabela 14. Učestalost L55M alela i genotipova kod ispitanika iz grupe DM+A i kontrolne grupe i logistička regresiona analiza podataka

pon1	L55M	DM+A N (%)	K N (%)	OR	95%CI	P
Učestalost alela	L	176 (63)	136 (68)	1,00	Standard	0,24
	M	104 (37)	64 (32)	1,26	0,86-1,84	
Učestalost genotipova	LL	55 (39,28)	45 (45)	1,00	Standard	0,22
	LM	66 (47,14)	46 (46)	1,17	0,68-2,02	
	MM	19 (13,58)	9 (9)	1,73	0,71-4,19	
	LL+LM/MM	121/19	91/9	1,58	0,69-3,67	
	LL/LM+MM	55/85	45/55	1,26	0,75-2,13	

DM+A-diabetes mellitus tip 2 i ateroskleroza; K-kontrolna grupa; N-broj ispitanika; OR-količnik verovatnoće (odds ratio); 95%CI-interval poverenja (confidence interval); P-verovatnoća

Na osnovu Tabele 14 može se zaključiti da je alel M povezan sa malo povećanim rizikom za nastanak ateroskleroze kod obolelih od dijabetes melitus tip 2 koji nije statistički značajan (OR=1,26, 95%CI=0,86-1,84). Nosioци genotipa LM u DM+A grupi imaju malo povećan rizik (OR=1,17, 95%CI=0,68-2,02) dok je taj rizik znatno veći kod nosilaca MM genotipa (OR=1,73, 95%CI=0,71-4,19). U kombinaciji

LL+LM vs MM rizik je veći u odnosu na LL vs LM+MM, ali nije statistički značajan. Nijedna dobijena vrednost nije statistički značajna (Tabela 14)

Tabela 15. Učestalost L55M alela i genotipova kod ispitanika iz grupe A i kontrolne grupe i logistička regresiona analiza podataka

pon1	L55M	A N (%)	K N (%)	OR	95%CI	P
Učestalost alela	L	76 (63)	136 (68)	1,00	Standard	0,39
	M	44 (37)	64 (32)	1,23	0,76-1,98	
Učestalost genotipova	LL	20 (33,33)	45 (45)	1,00	Standard	0,1
	LM	36 (60)	46 (46)	1,76	0,89-3,49	
	MM	4 (6,67)	9 (9)	1,00	0,27-3,63	
	LL+LM/MM	56/4	91/9	0,72	0,21-2,45	
	LL/LM+MM	20/40	54/55	1,64	0,84-3,18	

A-ateroskleroza; K-kontrolna grupa; N-broj ispitanika; OR-količnik verovatnoće (odds ratio); 95%CI-interval poverenja (confidence interval); P-verovatnoća

Na osnovu rezultata iz Tabele 15, može se videti da je alel M povezan sa povećanim rizikom za nastanak neke od kliničkih manifestacija ateroskleroze (OR=1,23, 95%CI=0,76-1,98) u odnosu na referentni alel L. Heterozigoti LM imaju povećan rizik za nastanak ateroskleroze (OR=1,76, 95%CI=0,89-3,49), dok kod MM homozigota za ovu grupu rizik ne postoji (OR=1,00 95%CI=0,27-3,63). Kombinacije genotipova i njihova analiza pokazuju da LL+LM vs MM nosi 1,39 puta manji rizik

(OR=0,72, 95%CI=0,21-2,45), ali da u kombinaciji sa LM (LL vs LM+MM) taj rizik je 64% veći (OR=1,64, 95%CI=0,84-3,18). Nijedna vrednost nije statistički značajna.

Tabela 16. Učestalost L55M alela i genotipova kod ispitanika iz grupe DM+A i A i logistička regresiona analiza podataka

pon1	L55M	DM+A	A	OR	95%CI	P
		N (%)	N (%)			
Učestalost alela	L	176 (63)	76 (63)	1,00	Standard	0,92
	M	104 (37)	44 (37)	1,02	0,65-1,59	
Učestalost genotipova	LL	55 (39,28)	20 (33,33)	1,00	Standard	0,22
	LM	66 (47,14)	36 (60)	0,67	0,34-1,28	
	MM	19 (13,58)	4 (6,67)	1,72	0,51-5,7	
	LL+LM/MM	121/19	56/4	2,19	0,71-6,76	
	LL/LM+MM	55/85	20/40	0,77	0,41-1,45	

DM+A-diabetes mellitus tip 2 i ateroskleroza, A-ateroskleroza; N-broj ispitanika; OR-količnik verovatnoće (odds ratio); 95%CI-interval poverenja (confidence interval); P-verovatnoća

Poređenjem DM+A i A grupa može se videti da alel M ne predstavlja rizik u odnosu na referentni L alel (OR=1,02, 95%CI=0,65-1,59). Heterozigoti LM u grupi DM+A imaju za 1,49 puta manji rizik za nastanak ateroskleroze u odnosu na grupu A (OR=0,67, 95%CI=0,34-1,28), dok MM homozigoti imaju povećan rizik za nastanak ateroskleroze (OR=1,72 95%CI=0,51-5,7). Nijedna vrednost nije statistički značajna (Tabela 16).

Tabela 17. Učestalost C(-107)T alela i genotipova kod ispitanika iz grupe DM+A i kontrolne grupe i logistička regresiona analiza podataka

pon1	C(-107)T	DM+A N (%)	K N (%)	OR	95%CI	P
Učestalost alela	C	143 (51)	94 (47)	1,00	Standard	0,38
	T	137 (49)	106 (53)	0,85	0,59-1,22	
Učestalost genotipova	CC	34 (24,29)	21 (21)	1,00	Standard	0,73
	CT	75 (53,57)	52 (52)	0,89	0,46-1,7	
	TT	31 (22,14)	27 (27)	0,71	0,33-1,5	
	CC+CT/TT	109/31	73/27	0,77	0,42-1,39	
	CC/CT+TT	34/106	21/79	0,83	,45-1,54	

DM+A-diabetes mellitus tip 2 i ateroskleroza; K-kontrolna grupa; N-broj ispitanika; OR-količnik verovatnoće (odds ratio); 95%CI-interval poverenja (confidence interval); P-verovatnoća

Podaci iz Tabele 17 ukazuju da alel T nosi nešto manji rizik za nastanak diabetes mellitus tip 2 i neke od kliničkih manifestacija ateroskleroze (OR=0,85, 95%CI=0,59-1,22). Heterozigoti CT imaju malo smanjen rizik (1,12 puta) za ovo kombinovano oboljenje (OR=0,89, 95%CI=0,59-1,22) dok TT homozigoti imaju 1,3 puta manji rizik za oboljevanje u odnosu na kontrolnu grupu (OR=0,71, 95%CI=0,33-1,5), ali nijedna vrednost nije statistički značajna (Tabela 17).

Tabela 18. Učestalost C(-107)T alela i genotipova kod ispitanika iz grupe A i kontrolne grupe i logistička regresiona analiza podataka

pon1	C(-107)T	A N (%)	K N (%)	OR	95%CI	P
Učestalost alela	C	68 (57)	94 (47)	1,00	Standard	0,09
	T	52 (43)	106 (53)	0,67	0,43-1,07	
Učestalost genotipova	CC	20 (33,33)	21 (21)	1,00	Standard	0,14
	CT	28 (47,67)	52 (52)	0,56	0,26-1,21	
	TT	12 (20)	27 (27)	0,46	0,18-1,10	
	CC+CT/TT	48/12	73/27	0,68	0,31-1,46	
	CC/CT+TT	20/40	21/79	0,53	0,26-1,09	

A-ateroskleroza; K-kontrolna grupa; N-broj ispitanika; OR-količnik verovatnoće (odds ratio); 95%CI-interval poverenja (confidence interval); P-verovatnoća

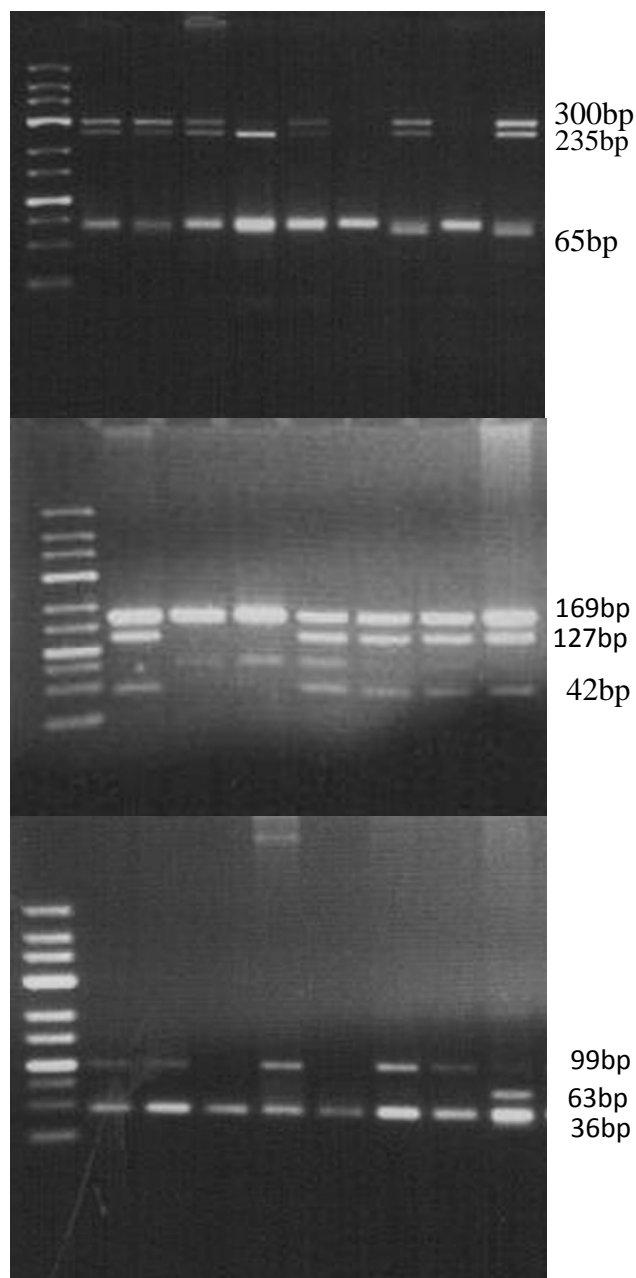
Na osnovu ove analize može se videti da osobe sa alelom T imaju 1,5 puta manji rizik da obole od ateroskleroze u odnosu na osobe sa C alelom (OR=0,67, 95%CI=0,43-1,07). Heterozigoti CT imaju 1,78 puta manji rizik (OR=0,56, 95%CI=0,26-1,21) dok TT homozigoti imaju 2,13 puta manji rizik za nastanak ateroskleroze (OR=0,46, 95%CI=0,18-1,10). Grupisanjem genotipova: TT vs CC+CT, TT iskazuje 1,47 puta manji rizik u odnosu na kontrolnu grupu, dok grupisanje CC vs CT+TT nosi 1,89 puta manji rizik. Ni jedna vrednost nije statistički značajna (Tabela 18).

Tabela 19. Učestalost C(-107)T alela i genotipova kod ispitanika iz grupe DM+A i A i logistička regresiona analiza podataka

pon1	C(-107)T	DM+A N (%)	A N (%)	OR	95%CI	P
Učestalost alela	C	143 (51)	68 (57)	1,00	Standard	0,3
	T	137 (49)	52 (43)	1,25	0,8-1,92	
Učestalost genotipova	CC	34 (24,29)	20 (33,33)	1,00	Standard	0,2 0,34 0,74 0,19
	CT	75 (53,57)	28 (47,67)	1,58	0,78-3,18	
	TT	31 (22,14)	12 (20)	1,52	0,64-3,6	
	CC+CT/TT	109/31	48/12	1,14	0,54-2,4	
	CC/CT+TT	34/106	20/40	1,56	0,8-3,02	

DM+A-diabetes mellitus tip 2 i ateroskleroza, A-ateroskleroza; N-broj ispitanika; OR-količnik verovatnoće (odds ratio); 95%CI-interval poverenja (confidence interval); P-verovatnoća

Poređenjem grupa DM+A i A (Tabela 19), vidimo da alel T u DM+A nosi za 1,25 puta veći rizik kod DM+A u odnosu na A grupu (OR=1,25, 95%CI=0,8-1,92), dok genotipovi CT i TT nose rizike 1,58 i 1,52 puta veće u odnosu na grupu sa aterosklerozom (OR=1,58, 95%CI=0,78-3,18 i OR=1,52, 95%CI=0,64-3,6). Grupisanjem genotipova CC+CT vs TT ispoljava se mali rizik (OR=1,14, 95%CI=0,54-2,4), dok grupisanjem CC vs CT+TT rizik je 1,56 puta veći (OR=1,56, 95%CI=0,8-3,02).



Slika 19. pon1 genotipizacija na 3% agaroznom gelu: A-C(-107)T, 1-DNK marker (25-150bp), 2,3,4,6,7,9-CT (300bp), 5-CC (235, 65 bp); B-L55M, 1-DNK marker (25-150bp), 2,5,6,7,8-LM (169, 127, 42bp), 3,4-LL (169bp); C-Q192R, 1-DNK marker (25-150bp), 2,3,5,7,8-QQ (99bp), 9-QR (99, 63, 36bp).

4.2.3 GST P1, M1, T1 polimorfizmi

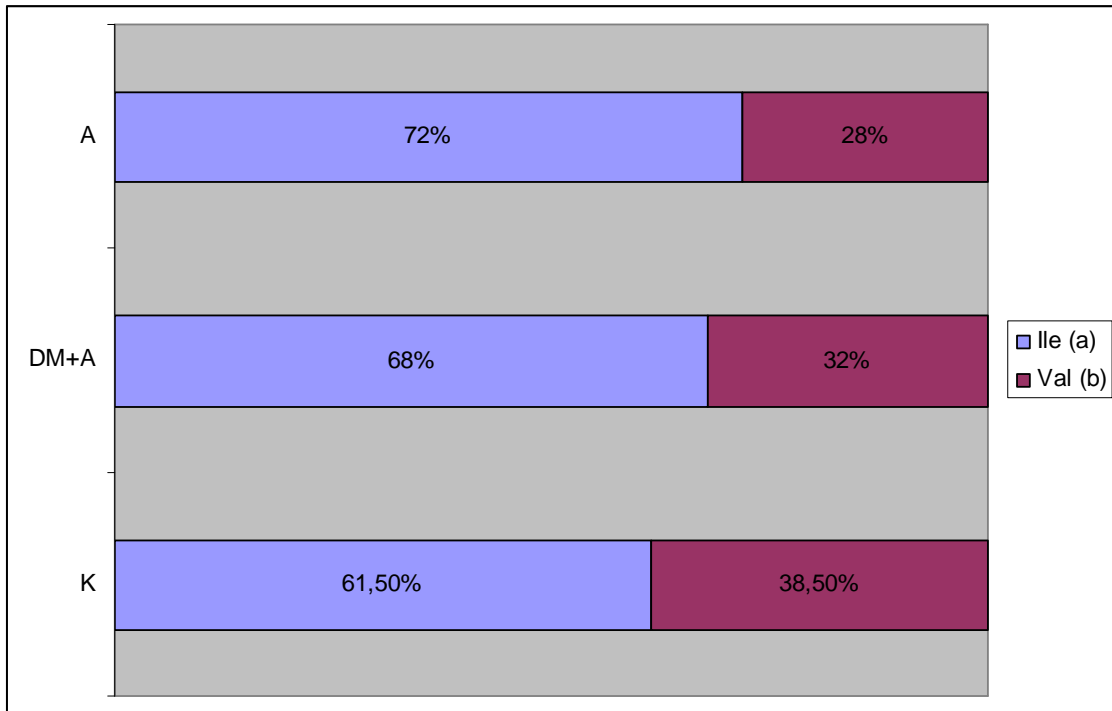
4.2.3.1. GSTP1 Ile105Val polimorfizam

U radu smo analizirali polimorfizam Ile105Val u GSTP1 genu koji predstavlja nukleotidnu zamenu aminokiseline izoleucina valinom u polipeptidu na poziciji 105, a posledica je bazne zamene A u G na poziciji 313 u egzonu 5.

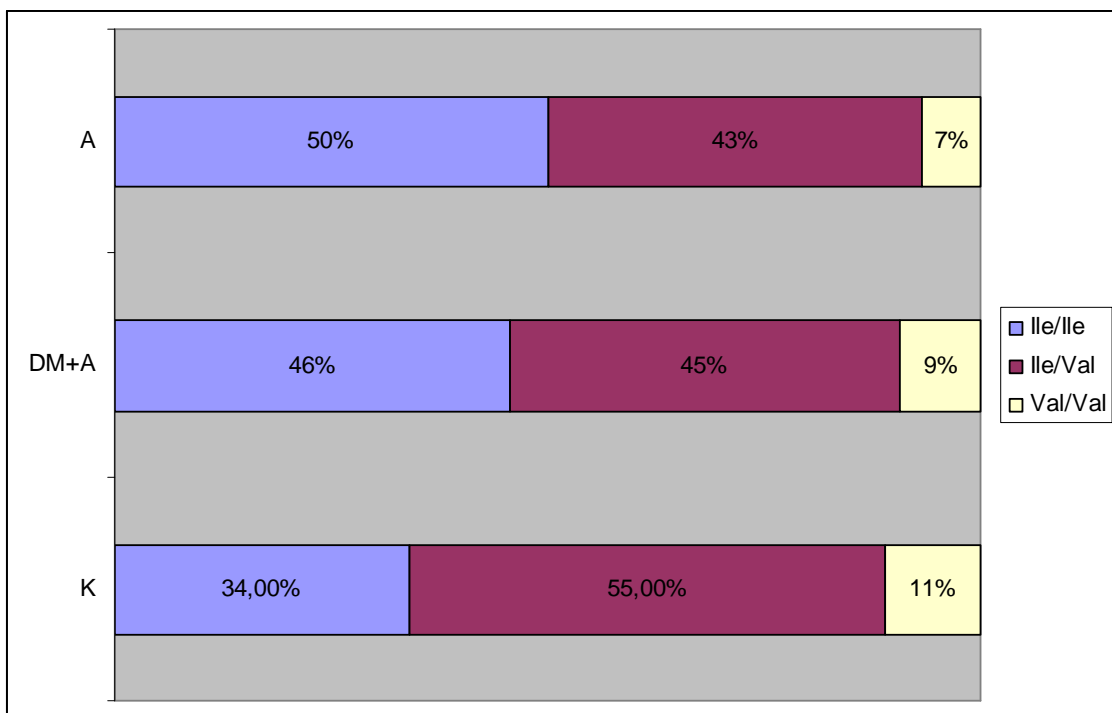
U Tabelama 20, 21 i 22 dat je prikaz učestalosti genotipova i alela ovog polimorfizma i logistička regresiona analiza dobijenih podataka za analizirane grupe.

Učestalost genotipa Ile/Ile je najveća u grupi A i iznosi 50%, u grupi DM+A iznosi 45,5% dok je učestalost ovog genotipa najmanja u kontrolnoj grupi i iznosi 34%. Učestalost genotipa Ile/Val je najveća u kontrolnoj grupi (55%), dok je u grupama DM+A i A gotovo jednaka i iznosi 45% za DM+A i 43,3% za A. Genotip Val/Val je najmanje zastupljen u grupi A (6,7%), dok njegova zastupljenost u grupi DM+A iznosi 9,3%, a u grupi K 11% (Tabele 20, 21, 22; Slika 21).

Učestalost alela Ile je 61,5%, 68% i 72% u grupama K, DM+A i A, dok je učestalost alela Val 38,5%, 32% i 28% (Tabele 20, 21, 22; Slika 20).



Slika 20. Učestalost alela Ile105Val u ispitivanim grupama



Slika 21. Učestalost genotipova Ile105Val u ispitivanim grupama

Tabela 20. Učestalost Ile105Val alela i genotipova kod ispitanika iz grupe DM+A i kontrolne grupe i logistička regresiona analiza podataka

GSTP1	Ile105Val	DM+A N (%)	K N (%)	OR	95%CI	P
Učestalost alela	Ile (a)	191 (68)	123 (61,5)	1,00	Standard	0,128
	Val (b)	89 (32)	77 (38,5)	0,7	0,5-1,8	
Učestalost genotipova	Ile/Ile	64 (45,7)	34 (34)	1,00	Standard	0,08
	Ile/Val	63 (45)	55 (55)	0,61	0,35-1,05	
	Val/Val	13 (9,3)	11 (11)	0,45	0,18-1,11	
	aa+ab/bb	127/13	89/11	0,83	0,35-1,93	
	aa/ab+bb	64/76	64/76	0,73	0,43-1,26	

DM+A-diabetes mellitus tip 2 i ateroskleroza; K-kontrolna grupa; N-broj ispitanika; OR-količnik verovatnoće (odds ratio); 95%CI-interval poverenja (confidence interval); P-verovatnoća

Alel Val nosi za 1,43 puta manji rizik za nastanak ateroskleroze kod obolelih od DM tip 2 u odnosu na alel Ile (OR=0,7, 95%CI=0,5-1,8, P>0,05). Heterozigoti Ile/Val nose za 1,64 puta manji rizik od nastanak oboljenja u ovoj grupi ispitanika (OR=0,61, 95%CI=0,35-1,05) a homozigoti Val/Val nose za 2,22 puta manji rizik za nastanak oboljenja (OR=0,45, 95%CI=0,18-1,11). Grupisanjem genotipova može se videti da kombinacija aa vs ab+bb nosi manji rizik za nastanak oboljenja (za 1,43 puta), dok kombinacija aa+ab vs bb nosi za 1,2 puta manji rizik. Ni jedna vrednost nije statistički značajna (Tabela 20).

Tabela 21. Učestalost Ile105Val alela i genotipova kod ispitanika iz grupe A i kontrolne grupe i logistička regresiona analiza podataka

GSTP1	Ile105Val	A N (%)	K N (%)	OR	95%CI	P
Učestalost alela	Ile (a)	86 (72)	123 (61,5)	1,00	Standard	0,06
	Val (b)	34 (28)	77 (38,5)	0,63	0,39-1,03	
Učestalost genotipova	Ile/Ile	30 (50)	34 (34)	1,00	Standard	0,07
	Ile/Val	26 (43,3)	55 (55)	0,53	0,27-1,05	
	Val/Val	4 (6,7)	11 (11)	0,41	0,12-1,43	
	aa+ab/bb	56/4	89/11	0,58	0,17-1,9	
	aa/ab+bb	30/30	64/76	0,84	0,46-1,54	

A-ateroskleroza; K-kontrolna grupa; N-broj ispitanika; OR-količnik verovatnoće (odds ratio); 95%CI-interval poverenja (confidence interval); P-verovatnoća

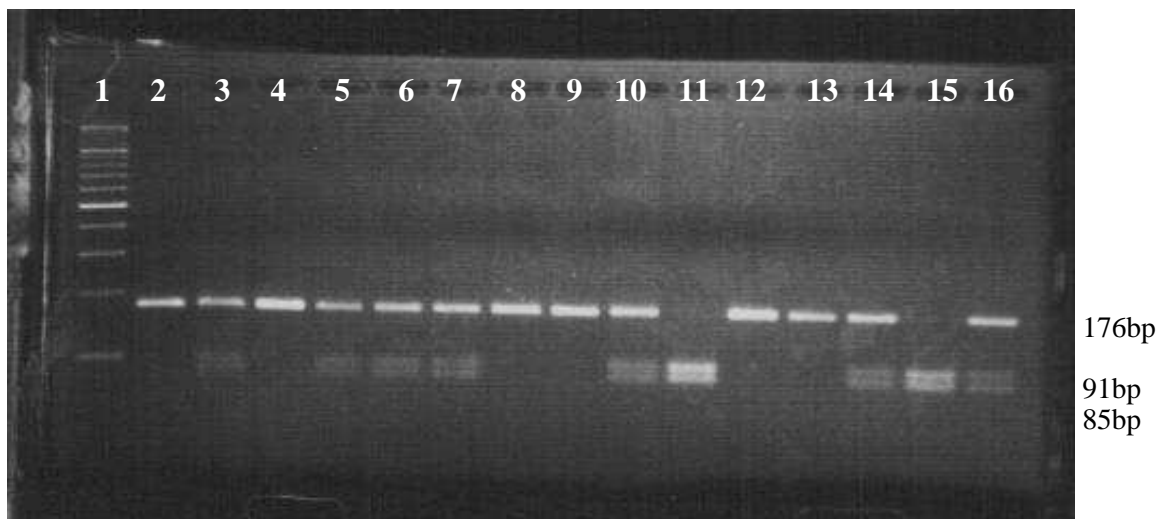
U grupi ispitanika sa nekom od kliničkih manifestacija ateroskleroze bez DM tip 2 alel Val nosi za 1,6 puta manji rizik za nastanak oboljenja u odnosu na alel Ile (OR=0,63, 95%CI=0,39-1,03). Heterozigoti Ile/Val nose za 1,9 puta manji rizik za razvoj ateroskleroze (OR=0,53, 95%CI=0,27-1,05), a homozigot Val/Val nosi 2,44 puta manji rizik (OR=0,41, 95%CI=0,12-1,43). Ni jedna vrednost nije statistički značajna. Kombinacija aa vs ab+bb ne nosi rizik za nastanak bolesti, dok sam bb nosi 1,72 puta manji rizik koji nije statistički značajan (Tabela 21).

Tabela 22. Učestalost Ile105Val alela i genotipova kod ispitanika iz grupa DM+A i A i logistička regresiona analiza podataka

GSTP1	Ile105Val	DM+A N (%)	A N (%)	OR	95%CI	P
Učestalost alela	Ile (a)	191 (68)	86 (72)	1,00	Standard	0,49
	Val (b)	89 (32)	34 (28)	1,18	0,74-1,88	
Učestalost genotipova	Ile/Ile	64 (45,7)	30 (50)	1,00	Standard	0,69
	Ile/Val	63 (45)	26 (43,3)	1,13	0,6-2,13	
	Val/Val	13 (9,3)	4 (6,7)	1,52	0,45-5,06	
	aa+ab/bb	127/13	56/4	1,43	0,45-4,59	
	aa/ab+bb	64/76	30/30	1,13	0,62-2,07	

DM+A-diabetes mellitus tip 2 i ateroskleroza, A-ateroskleroza; N-broj ispitanika; OR-količnik verovatnoće (odds ratio); 95%CI-interval poverenja (confidence interval); P-verovatnoća

Poređenjem grupa obolelih, iz Tabele 23 može se videti da je alel Val povezan sa povišenim rizikom za aterosklerozu i dijabetes u odnosu na obolele bez DM tip 2 (OR=1,18, 95%CI=0,74-1,88). Heterozigoti Ile/Val takođe imaju malo povišen rizik (OR=1,13, 95%CI=0,6-2,13), dok genotip Val/Val kod DM+A nosi rizik 1,52 što je slučaj i kod kombinovanja genotipova aa+ab vs bb gde je rizik 1,43 (Tabela 23). Nijedna vrednost nije statistiki značajna.

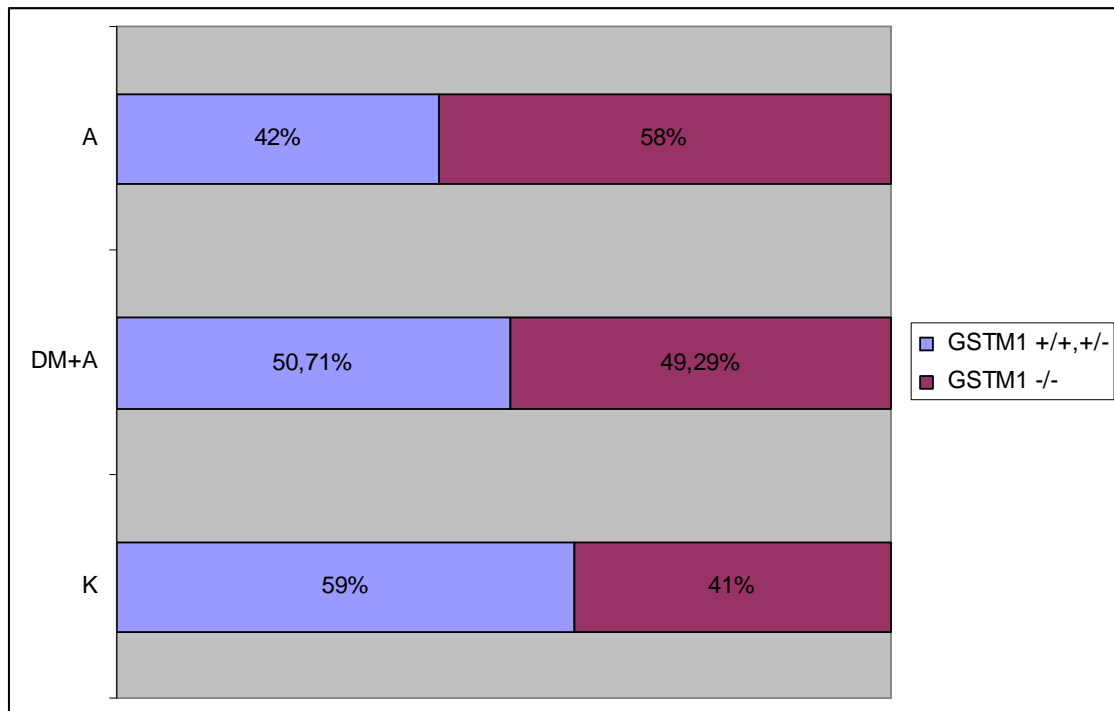


Slika 22. GSTP1 Val105Ile genotipizacija na 3% agaroznom gelu: 1-DNK marker (100bp); 2,4,8,9,12,13-Ile/Ile genotip (176bp); 3,5,6,7,10,14,16-Ile/Val genotip (176bp, 91bp, 85bp); 11, 15-Val/Val genotip (91bp, 85bp).

4.2.3.2. GSTM1

Polimorfizam u GSTM1 genu analiziran je primenom klasičnog i real-time PCR-a u multipleks reakciji zajedno sa graničnicima za GSTT1 i β -globinski gen koji je poslužio kao kontrola PCR reakcije (Slike 26 i 27). Nulti (delecioni) genotip (M1*0/M1*0 ili -/-) u GSTM1 se utvrđuje odsustvom PCR produkta dužine 215bp. Ukoliko postoji produkt govorimo ili o ++ (homozigot) ili o +/- (heterozigot) genotipovima, bez mogućnosti pravljenja razlike.

Učestalost -/- genotipa je najveća u grupi A sa 58,33%, a u K i DM+A grupama prisutan je sa 41% i 49,29% (Tabele 23, 24, 25; Slika 23).



Slika 23. Učestalost genotipova GSTM1u ispitivanim grupama

Tabela 23. Učestalost GSTM1 genotipova kod ispitanika iz grupe DM+A i kontrolne grupe i logistička regresiona analiza podataka

GSTM1		DM+A	K	OR	95%CI	P
		N (%)	N (%)			
Učestalost genotipova	+/+, +/-	71 (50,71)	59 (59)	1,0	Standard	0,2
	-/-	69 (49,29)	41 (41)	1,4	0,83-2,34	

DM+A-diabetes mellitus tip 2 i ateroskleroza; K-kontrolna grupa; N-broj ispitanika; OR-količnik verovatnoće (odds ratio); 95%CI-interval poverenja (confidence interval); P-verovatnoća

Genotip delecionog tipa GSTM1 gena nosi za 40% veći rizik za nastanak diabetes melitus tip 2 i ateroskleroze, ali ta vrednost nije statistički značajna (OR=1,4, 95%CI=0,83-2,34, P>0.05).

Tabela 24. Učestalost GSTM1 genotipova kod ispitanika iz grupe A i kontrolne grupe i logistička regresiona analiza podataka

GSTM1		A	K	OR	95%CI	P
		N (%)	N (%)			
Učestalost genotipova	+/+,+/-	25 (41,67)	59 (59)	1,0	Standard	0,03
	-/-	35 (58,33)	41 (41)	2,0	1,05-3,86	

A-ateroskleroza; K-kontrolna grupa; N-broj ispitanika; OR-količnik verovatnoće (odds ratio); 95%CI-interval poverenja (confidence interval); P-verovatnoća

U grupi ispitanika sa nekom od kliničkih manifestacija ateroskleroze, genotip delecionog tipa GSTM1 gena nosi 2 puta veći rizik za nastanak oboljenja i vrednost je statistički značajna (OR=2, 95%CI=1,05-3,86, P<0,05) (Tabela 24)

Tabela 25. Učestalost GSTM1 genotipova kod ispitanika iz grupa DM+A i A i logistička regresiona analiza podataka

GSTM1		DM+A	A	OR	95%CI	P
		N (%)	N (%)			
Učestalost genotipova	+/+,+/-	71 (50,71)	25 (41,67)	1,0	Standard	0,4
	-/-	69 (49,29)	35 (58,33)	0,69	0,38-1,28	

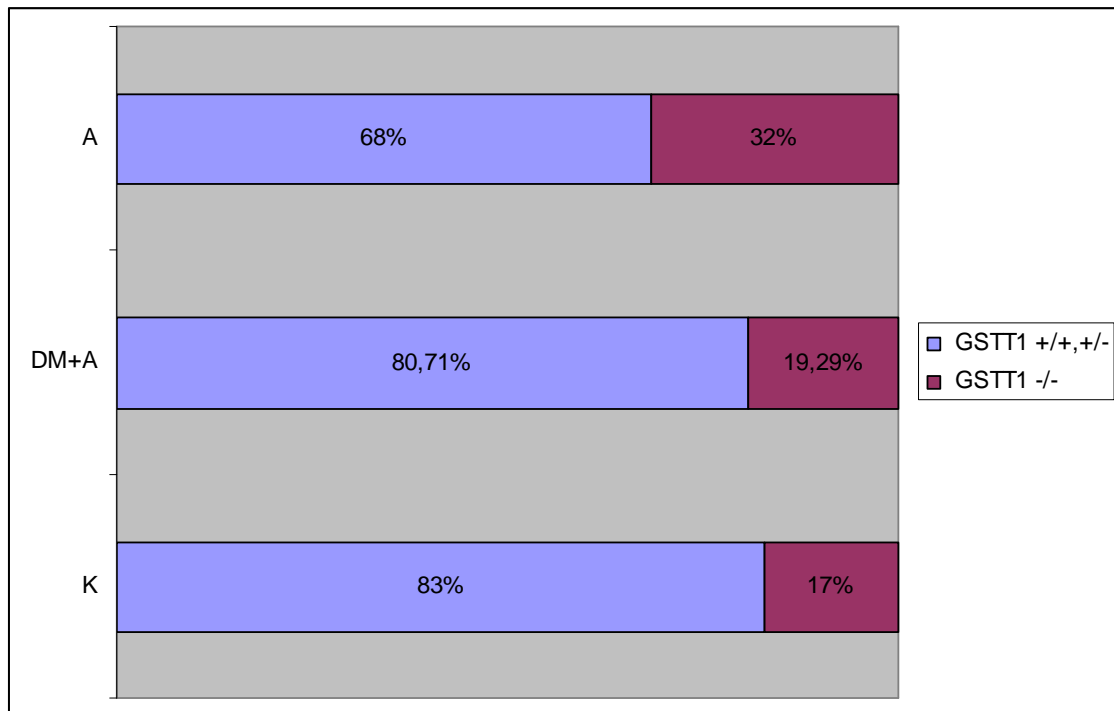
DM+A-diabetes mellitus tip 2 i ateroskleroza; A-ateroskleroza; N-broj ispitanika; OR-količnik verovatnoće (odds ratio); 95%CI-interval poverenja (confidence interval); P-verovatnoća

Poređenjem dve grupe sa bolesnicima, može se videti da nulti genotip (-/-) kod obolelih od dijabetesa i ateroskleroze nosi 1,5 puta manji rizik za nastanak oboljenja u odnosu na grupu A. Vrednost nije statistički značajna (Tabela 25).

4.2.3.3. GSTT1

Polimorfizam u GSTT1 genu analiziran je primenom klasičnog i real-ime PCR-a u multipleks reakciji (Slike 26 i 27). Nulti (delecioni) genotip (T1*0/T1*0 ili -/-) u GSTT1 se utvrđuje odsustvom PCR produkta dužine 480bp. Ukoliko postoji produkt govorimo ili o +/+ (homozigot) ili o +/- (heterozigot) genotipovima, bez mogućnosti pravljenja razlike.

Najmanja učestalost -/- genotipa u GSTT1 genu je u kontrolnoj grupi (17%), dok je najveća zabeležena u grupi A (31.67%). Učestalost nultog genotipa u DM+A je 19,29% (Tabele 26, 27, 28; Slika 24).



Slika 24. Učestalost genotipova GSTT1u ispitivanim grupama

Tabela 26. Učestalost GSTT1 genotipova kod ispitanika iz grupe DM+A i kontrolne grupe i logistička regresiona analiza podataka

GSTT1		DM+A N (%)	K N (%)	OR	95%CI	P
Učestalost genotipova	+/+, +/-	113 (80,71)	83 (83)	1.0	Standard	0,65
	-/-	27 (19,29)	17 (17)	1,17	0,59-2,28	

DM+A-diabetes mellitus tip 2 i ateroskleroza; K-kontrolna grupa; N-broj ispitanika; OR-količnik verovatnoće (odds ratio); 95%CI-interval poverenja (confidence interval); P-verovatnoća

Genotip delecionog tipa GSTT1 gena nosi malo povećan rizik za nastanak diabetes melitus tip 2 i ateroskleroze, ali ta vrednost nije statistički značajna (OR=1,17, 95%CI=0,59-2,28, P>0,05) (Tabela 26).

Tabela 27. Učestalost GSTT1 genotipova kod ispitanika iz grupe A i kontrolne grupe i logistička regresiona analiza podataka

GSTT1		A	K	OR	95%CI	P
		N (%)	N (%)			
Učestalost genotipova	+/+,+/-	41 (68,33)	83 (83)	1,00	Standard	0,03
	-/-	19 (31,67)	17 (17)	2,26	1,06-4,81	

A-ateroskleroza; K-kontrolna grupa; N-broj ispitanika; OR-količnik verovatnoće (odds ratio); 95%CI-interval poverenja (confidence interval); P-verovatnoća

U grupi ispitanika sa nekom od kliničkih manifestacija ateroskleroze, genotip delecionog tipa GSTT1 gena nosi više od 2 puta veći rizik za nastanak oboljenja i vrednost je statistički značajna (OR=2,26 95%CI=1,06-4,81, P<0,05) (Tabela 27).

Tabela 28. Učestalost GSTT1 genotipova kod ispitanika iz grupa DM+A i A i logistička regresiona analiza podataka

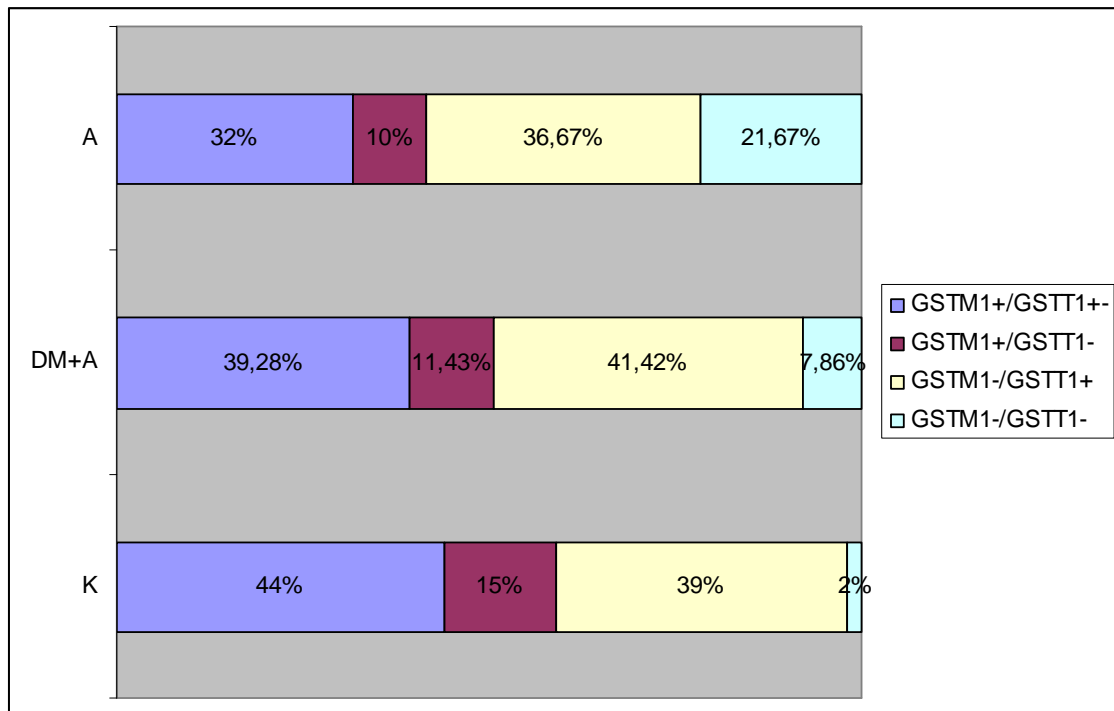
GSTT1		DM+A	A	OR	95%CI	P
		N (%)	N (%)			
Učestalost genotipova	+/+,+/-	113 (80,71)	41 (68,33)	1,00	Standard	0,056
	-/-	27 (19,29)	19 (31,67)	0,51	0,26-1,025	

DM+A-diabetes mellitus tip 2 i ateroskleroza; A-ateroskleroza; N-broj ispitanika; OR-količnik verovatnoće (odds ratio); 95%CI-interval poverenja (confidence interval); P-verovatnoća

Poređenjem dve grupe obolelih, regresiona logistička analiza nam je pokazala da genotip delecionog tipa GSTT1 gena u grupi sa „pojačanim“ oksidativnim stresom (DM+A) nosi za 1,96 puta manji rizik za nastanak oboljenja u odnosu na grupu sa aterosklerozom. Statistička značajnost je granične vrednosti (P=0,056) (Tabela 28).

4.2.3.4. Analiza kombinovanih genotipova delecionog tipa GSTM1 i GSTT1 gena

Nulti genotipovi GSTM1 i GSTT1 gena analizirani su primenom klasičnog i real-ime PCR-a u multipleks reakciji (Slike 26 i 27). Delecioni genotipovi (-/-) se utvrđuju odsustvom PCR produkata dužine 215bp za GSTM1 i 480bp za GSTT1. Ukoliko postoji produkt govorimo ili o ++ (homozigotima) ili o +/- (heterozigotima) genotipovima, bez mogućnosti pravljenja razlike.



Slika 25. Učestalost kombinovanih genotipova delecionog tipa GSTM1 i GSTT1 u ispitivanim grupama

Tabela 29. Učestalost kombinovanih genotipova delecionog tipa GSTM1 i GSTT1 kod ispitanika iz grupe DM+A i kontrolne grupe i logistička regresiona analiza podataka

GSTM1/GSTT1	DM+A	K	OR	95%CI	P
1	N (%)	N (%)			
+/+	55 (39,28)	44 (44)	1,00	standard	
+/-	16 (11,43)	15 (15)	0,85	0,38-1,9	0,69
-/+	58 (41,42)	39 (39)	1,19	0,67-2,09	0,54
-/-	11 (7,86)	2 (2)	4,4	0,93-20,9	0,045

DM+A-diabetes mellitus tip 2 i ateroskleroza; K-kontrolna grupa; N-broj ispitanika; OR-količnik verovatnoće (odds ratio); 95%CI-interval poverenja (confidence interval); P-verovatnoća

Logističkom regresionom analizom podataka za DM+A i K može se videti da prisustvo M1 a odsustvo T1 nosi blago smanjen rizik od 1,17 puta (OR=0,85, 95%CI=0,38-1,9) dok odsustvo M1 a prisustvo T1 gena nosi blago povećan rizik za razvoj ateroskleroze u ovoj grupi ispitanika (OR=1,19, 95%CI= 0,67-2,09). Odsustvo oba gena nosi za 4,4 puta povećan rizik od razvoja oboljenja i vrednost je statistički značajna (OR=4,4, 95%CI=0,93-20,9, P<0,05) (Tabela 29).

Tabela 30. Učestalost kombinovanih genotipova GSTM1 i GSTT1 kod ispitanika iz grupe A i kontrolne grupe i logistička regresiona analiza podataka

GSTM1/GSTT1	A	K	OR	95%CI	P
1	N (%)	N (%)			
+/+	19 (31,66)	44 (44)	1,00	standard	<.0001
+/-	6 (10)	15 (15)	0,92	0,31-2,75	
-/+	22 (36,67)	39 (39)	1,3	0,6-2,75	
-/-	13 (21,67)	2 (2)	15,05	3,09-73,3	

A-ateroskleroza; K-kontrolna grupa; N-broj ispitanika; OR-količnik verovatnoće (odds ratio); 95%CI-interval poverenja (confidence interval); P-verovatnoća

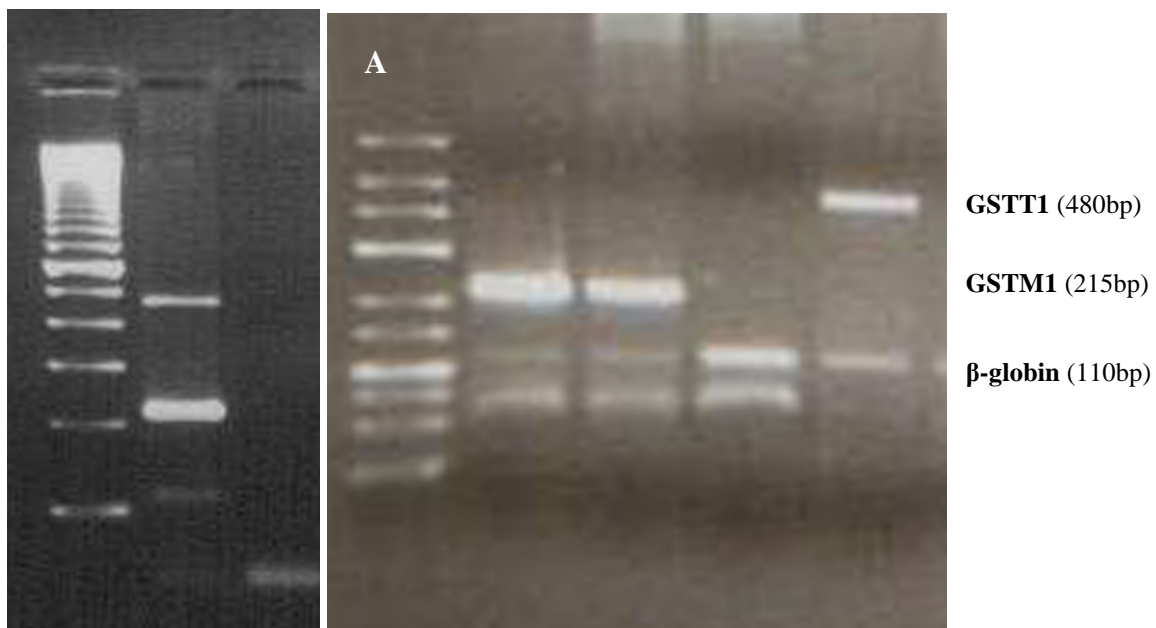
Analizom podataka K i A grupa može se videti da odsustvo T1 gena ne nosi rizik od razvoja ateroskleroze, dok odsustvo M1 gena nosi za 30% povećan rizik (OR=1,3, 95%CI=0,6-2,75) ali nema statističke značajnosti. Odsustvo oba gena nosi 15,05 puta povećan rizik (OR=15,05, 95%CI=3,09-73,3) i vrednost je statistički značajna (P<0,05) (Tabela 30)

Tabela 31. Učestalost kombinovanih genotipova delecionog tipa GSTM1 i GSTT1 kod ispitanika iz grupe A i kontrolne grupe i logistička regresiona analiza podataka

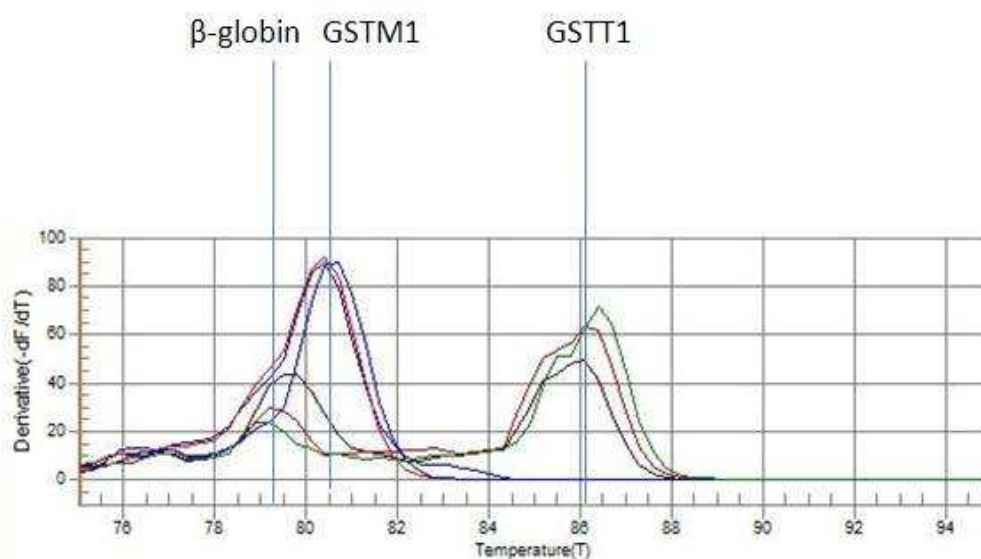
GSTM1/GSTT 1	DM+A N (%)	A N (%)	OR	95%CI	P
+/+	55 (39,28)	19 (31,66)	1,00	standard	0,89 0,79 0,001
+/-	16 (11,43)	6 (10)	0,92	0,31-2,69	
-/+	58 (41,42)	22 (36,67)	0,91	0,44-1,86	
-/-	11 (7,86)	13 (21,67)	0,29	0,11-0,76	

DM+A-diabetes mellitus tip 2 i ateroskleroza; A-ateroskleroza; N-broj ispitanika; OR-količnik verovatnoće (odds ratio); 95%CI-interval poverenja (confidence interval); P-verovatnoća

Logističkom regresionom analizom podataka dve grupe obolelih, može se videti da nedostatak ili M1 ili T1 gena nisu rizični za razvoj ateroskleroze kod obolelih od DM (OR~1,00), ali da nedostatak oba gena nosi za 3,45 puta manji rizik koji je statistički značajan u odnosu na grupu sa aterosklerozom (OR=0,29, 95%CI=0,11-0,76, P<0,05) (Tabela 31).



Slika 26. Genotipizacija GSTM1 i GSTT1 polimorfizama. **A**-1-DNK marker (100bp), 2- GSTT1 (480bp), GSTM1 (215bp) i β -globin (110bp); **B**-1-DNK marker (25-150bp), 2,3-GSTM1 (215bp) i β -globin (110bp); 4- β -globin (110bp); 5-GSTT1 (480bp) i β -globin (110bp).



Slika 27. Genotipizacija GSTM1 i GSTT1 polimorfizama primenom real-time PCR i analizom krive topljenja

5. DISKUSIJA

5.1. Uticaj faktora rizika iz anamneze na oksidativni stres

Ateroskleroza je multifaktorsko oboljenje i molekularna etiologija njenog nastanka obuhvata interakciju velikog broja gena i faktora sredine. Veruje se da hiperprodukcija reaktivnih vrsta kiseonika i/ili poremećen sistem antioksidativne zaštite igraju važnu ulogu u patogenezi ateroskleroze. Oksidativni stres je i jedan od mehanizam nastanka vaskularnih oboljenja koja se javljaju usled komplikacija diabetes mellitus-a. Pošto je osetljivost na oksidativni stres i genetički određena, veoma je važno proučiti genetičke polimorfizme koji utiču na rad i regulaciju antioksidativnog sistema.

Ideja ove studije bila je da se pronađu potencijalni genetički markeri osetljivosti na oksidativni stres poređenjem kontrolne grupe, grupe ispitanika koji imaju neku od kliničkih manifestacija ateroskleroze i grupe ispitanika koji imaju diabetes mellitus tip 2 i neku od kliničkih manifestacija ateroskleroze usled komplikacija dijabetesa. Ispitanici obuhvaćeni ovom studijom su iz svih regiona Srbije, pa možemo reći da naš uzorak pokazuje genetičku strukturu populacije koja živi na teritoriji naše zemlje.

Prema podacima iz analitičke studije zdravstvenog stanja stanovništva Srbije za period 1997-2007 godine, ukupno opterećenje bolešću u Srbiji bilo je najvećim delom uzrokovano ishemijskom bolesti srca tj. koronarnom bolesti srca, koje je bilo zastupljenije kod muškaraca i kod starije populacije (Institut za javno zdravlje Srbije, 2008). Naši rezultati pokazuju da je koronarna bolest srca najzastupljenija bolest među ispitanicima iz obe grupe obolelih (Slike 12 i 13), i govore u prilog ovoj studiji.

Prema istoj studiji, opterećenje cerebrovaskularnim bolestima u našoj zemlji je na drugom mestu na listi oboljenja. U našoj studiji CVB su zastupljene sa 13,57% kod DM+A, što ih svrstava na treće mesto u ovoj grupi i sa 11,67% kod A ispitanika, što ih svrstava na drugo mesto u ovoj grupi. Periferna vaskularna bolest je zastupljena sa 15% u grupi DM+A i sa 10% u grupi A (Slike 12 i 13). Među ispitanicima u grupi sa nekom

od kliničkih manifestacija ateroskleroze ukupno 13,33% bolesnika imalo je polivaskularnu arterijsku bolest (kombinaciju okluzivnog oboljenja većeg broja arterija u čijoj osnovi je aterosklerotski proces), što nije bio slučaj u grupi ispitanika sa aterosklerozom i dijabetesom.

Oksidativni stres je pojačan u prisustvu faktora rizika za nastanak kardiovaskularnih oboljenja kao što su hipertenzija, hiperlipidemija i DM. Poređenjem grupa obolelih i kontrolne grupe dobijeni rezultati pokazuju da postoji statistički značajna razlika u učestalostima pojave hipertenzije, hiperlipidemije i pozitivne porodične istorije KVB. Ovi rezultati ne iznenađuju jer je odabir kontrola bio takav da ispitanici iz ove grupe nemaju ni jedan od ovih faktora rizika. Poređenjem i analizom dve grupe obolelih vidimo da je hipertenzija nešto češća kod A grupe, a hiperlipidemija nosi 1,6 puta veći rizik za nastanak kardiovaskularnih komplikacija kod T2DM u odnosu na grupu A. Ove vrednosti nisu statistički značajne. Pozitivna porodična istorija KVB nosi 1,92 puta veći rizik za razvoj DM+A u odnosu na A, a vrednost je statistički značajna.

Arterijska hipertenzija predstavlja vodeći faktor rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti i u ispitivanim grupam zastupljena je sa 88,57% (DM+A) odnosno sa 90% (A). Kod pacijenata sa hipertenzijom, Ang II, glavni produkt renin-angiotenzin sistema, je povišen. Ang II se vezuje za receptore na površini glatkih mišićnih ćelija i aktivira fosfolipazu C što dovodi do povećane koncentracije unutarćelijskog kalcijuma i kontrakcije mišića u krvnim sudovima (Chobanian i Dzau, 1996), povećane sinteze proteina i hipertrofije glatkih mišićnih ćelija (Gibbons i sar., 1992), pojačane inflamacije i oksidacije LDL partikula usled pojačane produkcije reaktivnih vrsta kiseonika u plazmi (Lacy i sar., 1998; Swei i sar., 1997). Ovi procesi dovode do smanjenja azot-oksida (NO) u endotelu, i do jače vazokonstrukcije. Takođe, usled povišene koncentracije glukoze i masnih kiselina kod diabetesa, povećava se koncentracija unutarćelijskog kalcijuma aktivacijom protein kinaze C što vodi inhibiciji eNOS i smanjenoj koncentraciji NO. Hipertenzija i hiperlipidemija imaju isti uticaj na pojavu koronarne bolesti kod bolesnika sa DM, kao i kod bolesnika bez DM. Pa ipak, svaki pojedinačni faktor rizika ili njihova kombinacija izazivaju češće i veće promene na kardiovaskularnom sistemu kod dijabetičara nego kod bolesnika koji ne boluju od diabetesa.

Hiperlipidemija je zastupljenija u grupi obolelih sa diabetes mellitus tip 2 (86,43%) u odnosu na ispitanike bez diabetesa (80%) što je očekivano s obzirom da je hiperlipidemija sa povišenim nivoom triglicerida i smanjenim vrednostima HDL-a karakteristika dijabetesne dislipidemije. Oksidativni stres indukovani hiperglikemijom može nastati putem različitih mehanizama: glikozilacijom proteina i lipida, aktivacijom protein kinaze C, indukcijom lučenja citokina i propagacijom inflamatornih procesa. Ovi procesi utiču na disfunkciju i vaskularnih ćelija i endotela krvnih sudova dovodeći do nastanka dugotrajnih mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija kod dijabetičara, insulinske rezistencije i disfunkcije β -ćelija, a sve to je praćeno visokim koncentracijama reaktivnih vrsta kiseonika i smanjenom antioksidativnom zaštitom (Baynes i Thorpe, 1999; Kaneto i sar., 2010; Elliot i sar., 1992; Wellen i Hotamisligil, 2005).

Kod naših ispitanika pozitivna porodična anamneza na KVB je daleko zastupljenija kod obolelih od diabetesa i kardiovaskularnih oboljenja u čijoj osnovi je ateroskleroza (64,29%) nego kod bolesnika bez diabetesa (48,33%). U anamnezi nisu uzimani podaci o istoriji T2DM u porodicama obolelih. S obzirom da se u ovoj grupi ispitanika javlja veći broj osoba sa pozitivnom porodičnom istorijom za kardiovaskularne bolesti u odnosu na grupu A, a pošto je diabetes udružen sa povećanim oksidativnim stresom, možemo reći da naši ispitanici imaju povećanu osetljivost na oksidativni stres koja je možda nasledna.

Iako se faktori rizika za nastanak KVB mogu javiti u svim uzrastima, ova oboljenja su znatno češća nakon šezdesetih godina života. Polovina osoba sa T2DM, naročito starijih, nema postavljenu dijagnozu i ne zna za svoju bolest. Bolest se otkriva relativno kasno, kada su već prisutne brojne kardiovaskularne komplikacije (Institut za javno zdravlje Srbije, 2011). Pacijenti sa ranom (prevremenom) aterosklerozom (mlađi od 50 godina) najčešće imaju 4 ili 5 faktora rizika za razvoj ateroskleroze i ovo oboljenje je najčešće povezano sa pušenjem, hiperlipidemijom, porodičnom istorijom ateroskleroznih oboljenja i muškim polom (Radak i sar., 2012). Kod obolelih od bolesti koronarne arterije, DM je manje značajan faktor rizika kod prevremene ateroskleroze, dok je značajniji faktor rizika kod starijih sa KBS (Radak i sar., 2012). Kod žena, rizik

za razvoj KVB je progresivan posle menopauze što je verovatno posledica smanjenog lučenja estrogenih hormona.

5.2. Uticaj genetičkih faktora na oksidativni stres

5.2.1. ApoE 112/158 polimorfizam kao faktor rizika osetljivosti na oksidativni stres

Pokazano je da apoE može uticati na mnoge biološke procese zahvaljujući svojim antioksidativnim i antiinflamatornim osobinama. Iako je apoE gen jedan od najviše proučavanih, kontradiktorni rezultati nisu rasvetliti njegovu stvarnu ulogu u patogenzi mnogih bolesti.

Naši rezultati pokazuju da odnos učestalosti alela $\epsilon_3 > \epsilon_4 > \epsilon_2$, što je u skladu sa prosečnim svetskim i evropskim učestalostima (Singh i sar., 2006), kao i rezultatima studija sprovedenih u našoj populaciji (Stanković i sar., 2004; Topic i sar., 2007; Djan i sar., 2011). Učestalost alela ϵ_4 u kontrolnoj grupi u našoj studiji (18%) je mnogo veća u odnosu na dosadašnje rezultate sa ovih prostora (Stanković i sar., 2004; Topic i sar., 2007; Djan i sar., 2011). Populacije u kojima se javlja povišen nivo ukupnog i LDL holesterola u plazmi i koje imaju višu incidencu smrti od KBS, što je slučaj sa našom populacijom, imaju veću učestalost alela ϵ_4 (Schiele i sar., 2000).

Alel ϵ_4 je povezan sa povećanim rizikom od nastanka infarkt miokarda, hipertenzije, bolest koronarne arterije, ishemijske bolesti srca i mozga, dok je alelu ϵ_2 pripisana protektivna uloga (Eichner i sar., 2002; Anoop i sar., 2010; Stanković i sar., 2004). Naši rezultati pokazuju da je alel ϵ_4 najzastupljeniji u grupi A, dok su učestalosti u kontrolnoj i DM+A grupi podjednake. Učestalost ϵ_4 u grupi A se podudara sa učestalošću ovog alela u grupi mladih bolesnika sa koronarnom bolešću srca u srpskoj populaciji (Djan i sar., 2011). Iako ne postoji statistički značajna razlika u učestalostima

alela i genotipova apoE 112/158 polimorfizma među ispitivanim grupama u našoj studiji, ipak se može videti da alel ϵ_4 ne nosi rizik za razvoj kliničkih manifestacija ateroskleroze kod obolelih od T2DM, ali nosi za oko 50% veći rizik za razvoj ateroskleroze kod osoba bez T2DM. Poređenjem grupa obolelih, vidi se da ovaj alel povećava rizik za pojavu A. Nosioci alela ϵ_2 imaju neznatno manji rizik od DM+A u poređenju sa kontrolnom grupom i grupom A.

Stanković i saradnici (2004) su analizirali ulogu apoE polimorfizama u nastanku ishemijske bolesti mozga kod 65 obolelih i 330 kontrolnih subjekata i došli do zaključka da su polimorfizmi apoE povezani sa nastankom ovog oboljenja i da alel ϵ_4 nosi rizik od bolesti, a da alel ϵ_2 ima protektivan efekat. Djan i saradnici (2011) su analizirali obolele od koronarne bolesti srca mlađe od 45 godina i dobili da postoji statistički značajna razlika u učestalosti alela ϵ_4 i genotipa ϵ_3/ϵ_4 između obolelih i kontrola.

U našoj studiji, sve tri ispitivane grupe imaju najveću zastupljenost genotipa ϵ_3/ϵ_3 , a najmanju zastupljenost genotipa ϵ_2/ϵ_2 , što odgovara prosečnim svetskim i evropskim učestalostima (Singh i sar., 2006).

U studiji sa pacijentima obolelim od DM tip 2 pokazano je da ϵ_4 nosi povećan rizik za aterosklerozu karotida u ranim fazama dijabetesa (Johansson i sar., 1988) dok je još jedna studija pokazala da 112/158 polimorfizam apoE ne utiče na razvoj ateroskleroze kod dijabetičara, ali da utiče na lipidni profil pacijenata (Camsari i sar., 2005). Güz i saradnici (2000) su pokazali da iako apoE polimorfizmi utiču na nivo ukupnog holesterola i LDL-holesterola u krvi ispitanika, nisu asocirani sa nastankom ateroskleroze. Vaisi-Raygani i saradnici su, analizom pacijenata sa bolešću koronarne arterije sa i bez dijabetesa, utvrdili da ϵ_2 i ϵ_4 povećavaju rizik za nastanak ovog oboljenja, naročito kod oboelih od DM tip 2, ali da je jača asocijacija ϵ_4 alela (Vaisi-Raygani i sar., 2007), a studija Al-Majed i saradnika (2011) pokazuje da bi ϵ_4 mogao biti povezan sa ishemijskom bolesti srca kod osoba sa i bez dijabetesa tip 2.

Molekularni mehanizam antioksidativnog kapaciteta apoE nije razjašnjen. Peptid odgovoran za inhibiciju oksidacije LDL partikula je bogat pozitivno naelektrisanim amino kiselinama i verovatno svojim naelektrisanjem neutrališe slobodne radikale (Pham i sar., 2005). Apolipoprotein E ima 10% arginina u svom molekulu i može biti efikasan u neutralizaciji oksidativnog stresa. Međutim, apoE4 izoforme se bolje vezuju za lipoproteine bogate trigliceridima i bolje se vezuju za LDL-R, pa je njihov unos u

ćelije veći. U jednom trenutku dolazi do nishodne regulacije receptora i koncentracija LDL partikula se povećava u cirkulaciji i postaju podložni hemijskoj modifikaciji (Davignon i sar., 1988; Mahley i sar., 2009). To može biti razlog što ε4 iskazuje povećan rizik za razvoj kliničkih manifestacija ateroskleroze. ApoE se može vezati i za 4-hidroksinonenal (4-HNE), koji je produkt oksidativnog oštećenja lipida, i na taj način vršiti detoksikaciju. Ista grupa je utvrdila i da je antioksidativna/detoks efikasnost opadajuća idući od E2 ka E4 apoE2>apoE3>apoE4 (Pedersen i sar., 2000). Studija je ukazala je da je potreban dodatan izvor oksidativnog stresa da bi se iskazao uticaj apoE genotipova na oksidativni status (Talmud i sar., 2005).

5.2.2. Pon1 polimorfizmi kao faktori rizika osetljivosti na oksidativni stres

Pokazano je da PON1 poseduje antioksidativne osobine i da može sprečiti nastanak i razvoj ateroskleroze tako što štiti LDL i HDL partikule (Aviram i sar., 1998) i makrofage (Aviram i Rosenblat, 2004) od oksidativne modifikacije i umanjuje aterogenezu u aterosklerotičnim lezijama (Aviram i sar., 2000). Kao laktonaza, PON1 hidrolizuje lipidne perokside i sprečava njihovu akumulaciju u LDL i HDL partikulama in vivo i in vitro (Aviram i sar., 2000). Takođe, PON1 održava integritet HDL partikula i odgovoran je za njihove antioksidativne i antiinflamatorne efekte. Osobe sa povišenom koncentracijom HDL-a i nižom koncentracijom PON1 u serumu su podložnije aterosklerozi i bolesti srčane arterije u odnosu na osobe koje imaju niži nivo HDL ali viši nivo PON1 u serumu (Navab i sar., 1997). Molekularna osnova aktivnosti enzima leži u tri polimorfizma ispitivana u ovoj studiji.

U našoj populaciji najzastupljeniji su aleli Q192, L55 i C(-107), što je u saglasnosti sa učestalostima u najvećem delu evropskih populacija i populacija evropskog porekla (Aynacioglu i sar., 1999; Leus i sar., 2001; Clarimon i sar., 2004; O'Leary i sar., 2005; Sardo i sar., 2005; Parra i sar., 2007; Grdić i sar., 2008).

Rezultati pokazuju da postoji statistički značajna razlika u distribuciji alela i genotipova Q192R polimorfizma između DM+A i K i DM+A i A grupa, dok statistička

značajnost ne postoji kada su u pitanju druga dva polimorfizma. Rezultati nekih studija potkrepljuju (Wang i sar., 2012; Ergun i sar., 2011; Flekac i sar., 2008; Hofer i sar., 2006; Murata i sar., 2004; Deakin i sar., 2002), dok rezultati drugih studija (Gupta i sar., 2012; Bayrak i sar., 2001; Antikainen i sar., 1996; Li i sar., 2005; Zhang i sar., 2003) ne idu u prilog vezi između ova tri polimorfizma i aterogeneze i kod obolelih od T2DM i kod onih bez.

Možemo reći da su alel R, kao i genotipovi QR i RR faktori rizika za razvoj kardiovaskularnih komplikacija kod dijabetičara sa T2DM što je u saglasnosti sa rezultatima sličnih studija (Altuner i sar., 2011; Murata i sar., 2004). Takođe, rezultati ove studije pokazuju da Q192R polimorfizam nije faktor rizika za razvoj kliničkih manifestacija ateroskleroze, što je u saglasnosti sa studijama Bayraka (Bayrak i sar., 2001) i Antikainen (Antikainen i sar., 1996).

Pozicija 192 u enzimu, pored toga što se nalazi u sklopu aktivnog mesta, uključena je i u vezivanje za HDL partikule (nalazi se u sklopu H2 heliksa). Iako je ranije R izoforma enzima dovođena u vezu sa povećanim rizikom od oksidativnog stresa i razvoja kliničkih manifestacija ateroskleroze (posebno koronarne bolesti srca), (Mackness i sar., 1993; Aviram i sar., 1998; Aviram i sar., 2000), neki smatraju da Q alozim ima manji afinitet za vezivanje u odnosu na R alozim i nestabilnija je forma sa manjom lipolaktonaznom aktivnošću (Gaidukov i sar., 2006; Bhattacharyya i sar., 2008), pa samim tim i smanjenim antiaterogenim kapacitetom. Međutim, postoji mogućnost da je R alozim manje efikasan u prevenciji akumulacije lipidnih peroksida u LDL partikulama. Jedni autori su ukazali na mogućnost da PON1 R i Q alozimi mogu imati afinitete prema različitim substratima, tj produktima oksidacije tokom OS (Aviram i sar., 1998). Kotur-Stevuljević i saradnici (2008) su pokazali da je QQ fenotip u grupi obolelih sa koronarnom bolesti srca bez DM u našoj populaciji povezan sa niskim nivoom oksidativnog stresa i da ima bolju antioksidativnu zaštitu za razliku od RR fenotipa.

L55M polimorfizam, koji je lociran na N-terminusu PON1 ima ulogu u vezivanju enzima za HDL, pa različite izoforme imaju različite afinitete vezivanja za HDL (Gaidukov i sar., 2006; Leviev i sar., 2001). Alel L i genotip LL su asocirani sa povišenim nivoom enzima, pa na taj način se mogu dovesti u vezu sa boljom

antioksidativnom zaštitom (Gaidukov i sar., 2006; Flekac i sar., 2008), dok je M izofoma enzima (MM genotip) nestabilnija forma i podložnija proteolizi (Leviev i sar., 2001). U našoj studiji, učestalost alela L je najzastupljenija u kontrolnoj grupi, dok je alel M učestaliji u grupama obolelih, iako bez statističke značajnosti.

Đurić i saradnici su analizirali učestalosti polimorfizma L55M kod obolelih od Parkinsonove bolesti, još jedne u nizu bolesti koja se dovodi u vezu sa OS, u srpskoj populaciji i dobijeni rezultati idu u prilog tome da je MM genotip faktor rizik za razvoj ovog oboljenja (Đurić i sar., 2007). U nekim studijama pokazana je asocijacija ovog genotipa sa DM i aterosklerozom (Wang i sar., 2012; Ergun i sar., 2011; Flekač i sar., 2008), a što se tiče naše populacije, evidentno je da je alel M učestaliji kod obolelih u odnosu na kontrole u obe studije, ali u našoj studiji rezultati nisu statistički značajni.

Polimorfizam C(-107)T u regulatorskom delu utiče na ekspresiju gena pa samim tim i na nivo proteina. Alel C je učestaliji u odnosu na alel T u obe grupe obolelih, naročito u grupa A, u odnosu na kontrolnu grupu. Učestalost alela T je veća u kontrolnoj grupi u odnosu na DM+A i A. Sa učestalošću od 53% u kontrolnoj grupi, učestalost alela T se podudara sa učestalošću ovog alela u Španskoj populaciji (Parra i sar., 2007), koja ima najveću učestalost alela T (54%) u dosadašnjim ispitivanjima na evropskom kontinentu.

Iako nema statistički značajne razlike u učestalostima alela i genotipova ovog polimorfizma među grupama, logističkom regresionom analizom je utvrđeno da alel T i genotipovi CT i TT nose smanjene rizike od nastanka ispitivanih oboljenja (Tabele 17, 18 i 19). Protektivni efekat T alela u grupi A se posebno vidi poređenjem dve grupe obolelih gde ispitanici iz grupe DM+A ispoljavaju povećan rizik za razvoj oboljenja (Tabela 19). Ovi rezultati su kontradiktorni u odnosu na funkciju alela T: -107T varijanta je povezana sa smanjenom ekspresijom enzima jer je narušeno mesto vezivanja Sp1 u promotorskom regionu (Deakin i sar., 2003; Roset i sar., 2007), a samim tim je smanjen učinak enzima. U našoj populaciji, genotip TT, koji smanjuje ekspresiju gena, nije faktor rizika za nastanak ova dva oboljenja u čijoj osnovi je OS, za razliku od rezultata James-a (James i sar., 2000) koji su analizirali C(-107)T kod obolelih od dijabetesa tip 2 sa i bez ishemijskom bolesti srca i dobili da je TT faktor rizika za nastanak vaskularnih komplikacija kod DM (James i sar., 2000) i Leviev-a

(Leviev i sar., 2001) koji su analizirali ovaj polimorfizam kod obolelih od bolesti koronarne arterije i dobili iste rezultate (Leviev i sar., 2001).

U in vitro studijama pokazano je da se PON1 lako inaktivira endogenim i egzogenim oksidantima (Costa i sar., 2010). Aktivnost PON1 je smanjena kod dijabetičara i smanjuje se sa trajanjem DM, nezavisno od genotipa (Boemi i sar., 2001; Letellier i sar., 2002; Juretic i sar., 2006). Ovo je verovatno povezano sa činjenicom da u stanju OS značajna količina PON1 je disocirana sa HDL i slobodni PON1 nemaju mogućnost da zaštite od lipidne peroksidacije. Do disocijacije sa HDL verovatno dolazi usled hemijske modifikacije –oksidacije i/ili glikacije ovih partikula u uslovima hiperglikemije. Glukoza inaktivira i PON1 i glikovani protein ima smanjenu aktivnost (Mastorikou i sar., 2008). Takav HDL kod obolelih od dijabetesa tip 2 je disfunkcionalan u metabolisanju produkata LDL-oksidacije što vodi povećanoj koncentraciji ox-LDL u cirkulaciji i disfunkciji endotela (Mastorikou i sar., 2008).

Aktivnost PON1, za koju se smatra da je bolji pokazatelj rizika za razvoj KVB nego sam genotip, je primer interakcije genotipa i sredine. Među ljudima postoji varijacija u aktivnosti enzima koja je i 40-ostruka a udeo polimorfizama u ovoj varijaciji je veći od 60% za većinu ispitanih populacija (Costa i sar., 2010).

5.2.3. GSTP1 Ile105Val, GSTM1*0 i GSTT1*0 polimorfizmi kao faktori rizika osetljivosti na oksidativni stres

Poznato je da genetički faktori mogu imati važnu ulogu u patogenezi dijabetesa i da će osobe koje su genetički podložnije verovatno razviti bolest kada su izložene endogenim i egzogenim faktorim rizika, između ostalog i oksidativnom stresu. GST-aze, kao antioksidativni enzimi, predstavljaju drugu „liniju odbrane“ koja neutralizuje produkte lipidne peroksidacije (Sharma i sar., 2007). U uslovima T2DM, OS je povišen a antioksidativna odbrana je narušena i podaci govore u prilog tome da je ovakvo stanje izraženije kada su prisutne komplikacije bolesti (Bhatia i sar., 2003). Odsustvo gena ili polimorfizmi koji dovode do smanjene aktivnosti i substratne specifičnosti GST-aza

verovatno mogu uticati na rizik od razvoja kardiovaskularnih oboljenja. Podaci iz literature su kontradiktorni po pitanju uloge polimorfizama ispitivanih u ovom radu na osetljivost na oksidativni stres i pojavu ateroskleroze i njenih kliničkih manifestacija (Tamer i sar., 2004; Wilson i sar., 2000; Palmer i sar., 2003; Bid i sar., 2010; Amer i sar., 2012; Gönül i sar., 2012; Kariž i sar., 2012; Ramprasath i sar., 2011; Santl Letonja i sar., 2012; Suvakov i sar., 2012).

Zbog svojih enzimatskih i neenzimatskih višestrukih uloga varijacije, u ekspresiji i aktivnosti GSTP1 su povezivane sa velikim brojem bolesti koje se javljaju kod ljudi. Prema rezultatima dobijenim u našoj studiji, nema statistički značajne razlike u distribuciji alela i genotipova između DM+A i K i između A i K. Logistička regresiona analiza podataka je pokazala da alel Val i genotipovi Ile/Val i Val/Val nose smanjene rizike za oboljevanje od kliničkih manifestacija ateroskleroze u obe grupe obolelih u odnosu na kontrolnu grupu. Iako nema statističke značajnosti, dobijene vrednosti su joj se približile. Slične rezultate zapažamo u studijama na obolelima od reumatoidnog artritisa (Mattey i sar., 1999) i astme (Fryer i sar., 2000).

Učestalost alela i genotipova Ile105Val u GSTP1 mahom odgovara učestalostima ovih alela u kavkaskim populacijama (Watson i sar., 1998; Costa i Eaton, 2000) mada je alel Val malo učestaliji u našoj studiji (38,5% u odnosu na 11-34%). Takođe, naši rezultati mahom potvrđuju rezultate ranijih studija u srpskoj populaciji da Ile105Val polimorfizam nije faktor rizika za razvoj T2DM kod pankreasnih bolesti niti kod pacijenata na hemodijalizi među kojima se nalaze i oni sa diabetesnom nefropatijom (Nikolić i sar., 2011; Suvakov i sar., 2012)

Pored svoje enzimske uloge u fazi II detoksifikacije, GSTP1 učestvuje u regulaciji signalnog puta stresa i štiti ćelije od apoptoze zahvaljujući svojoj nekatalitičkoj, ligand-vezujućoj aktivnosti (Holley i sar., 2007). Pri niskim nivoima reaktivnih vrsta kiseonika, GSTP1 je aktivan i ima ulogu inhibitora JNK (Adler i sar., 1999). U uslovima oksidativnog stresa, GSTP1 disocira iz GSTP1-JNK kompleksa i inaktivira se, ali se zato aktivira JNK i signalni put stresa, povećava proliferacija i redukuje apoptoza (Ruscoe i sar., 2001). Takođe, OS dovodi do aktivacije transkripcionih faktora koji indukuju ekspresiju gena među kojima je i *GSTP1* (Xia i sar., 1996), pa se nivo proteina povećava u uslovima OS. *In vitro* studija ekspresije

cDNK je ukazala da je 105Val varijanta varijanta sa smanjenom enzimskom aktivnošću (Ali-Osman i sar., 1997), ali se čini da je aktivnost enzima supstratno i tkivno uslovljena (Holley i sar., 2007). Takođe, identifikovano je više od 35 SNP-ova u GSTP1 sekvenci a većina njih nije još okarakterisana (Moyer i sar., 2008). Moguće da neke druge promene u genu utiču na njegovu aktivnost i ekspresiju, pa je u budućnosti potrebno ispitati i njihovu povezanost sa oboljenjima

Učestalost nultih genotipova GSTM1 i GSTT1 gena u našem radu je u saglasnosti sa rezultatima za kavkaske populacije (opseg 30-50% za GSTM1 i 15-30% za GSTT1) (Bell i sar., 1993; Pemble i sar., 1994), mada je učestalost GSTM1 58%, a GSTT1 32% u grupi A. U našoj populaciji učestalost M1*0 je oko 48%, a učestalost T1*0 je oko 28% za zdravu populaciju (Ćorić i sar., 2010; Đorđević i sar., 2010; Suvakov i sar., 2012), dok je u našoj studiji učestalost M1*0 41%, a T1*0 17% za kontrolnu grupu. Učestalost M1*0 i T1*0 kod obolelih od karcinoma bubrežnog parenhima u našoj populaciji je 60,5% i 27,6% (Ćorić i sar., 2010) i M1*0 jeste faktor rizika za razvoj ovog oboljenja. Kod muškaraca kod kojih je utvrđen sterilitet učestalost od 56% je za M1*0 i 38% za T1*0, a kombinovana delecija ova dva gena predstavlja povećan rizik za oboljenje, mada bez statističke značajnosti (Đorđević i sar., 2010). Kod pacijenata na hemodijalizi među kojima se nalaze i oni sa diabetesnom nefropatijom (Suvakov i sar., 2012) učestalost M1*0 je 59,8%, a T1*0 33,7%, i pokazano je da je M1*0 faktor rizika za povećani OS kod obolelih analiziranih u ovoj studiji. Učestalost M1*0 u DM+A grupi je 58%, a T1*0 je 32%, što odgovara učestalostima kod obolelih u prethodno navedenim studijama. Međutim, učestalost M1*0 u grupi A je 49%, a T1*0 je 19% što je mnogo manje u odnosu na rezultate ranijih studija. U našoj studiji nedostatak M1 i T1 gena predstavlja faktor rizika za nastanak ateroskleroze koja nije komplikacija DM-a. Kombinovana delecija oba gena jeste faktor rizika za obe grupe obolelih.

U analizi rezultata za GSTM1*0 i GSTT1*0 pokazalo se da su intervali poverenja (95%CI) oko procenjenog količnika verovatnoća (OR) široki za kombinovanu deleciju oba gena u obe grupe ispitanika pa je potrebno sprovesti studiju sa većim brojem obolelih.

Nekoliko studija je pokazalo da je kombinovana delecija oba gena faktor rizika za dijabetes (Hori i sar., 2007; Amer i sar., 2011; Ramprasath i sar., 2011). Neke studije su pokazale da M1*0 može ukazati na podložnost dijabetesu (Yalin i sar., 2007; Bid i sar., 2010), a neke da T1*0 predstavlja faktor rizika (Wang i sar., 2006). Pokazana je jasna povezanost između M1*0 genotipa i komplikacija dijabetesa poput ateroskleroze (Santl Letonja i sar., 2012) i nefropatije (Datta i sar., 2010), a Doney i kolege su pokazale da je T1 nulti genotip asociiran sa preranim morbiditetom i mortalitetom kod osoba sa T2DM (Doney i sar., 2005). Analizom aterogenog plaka u tunica media aorte kod obolelih od ateroskleroze nađen je veliki broj različitih promena na nivou molekula DNK koje su slične lezijama koje nastaju kao posledica delovanja mutagena, a pokazano je i da polimorfizmi gena koji učestvuju u metabolizmu ksenobiotika utiču na nivo ovih lezija (De Flora i sar., 1996).

Nivo ekspresije GST-aza je bitan faktor u određivanju osetljivosti ćelija na široki spektar toksičnih hemikalija. GST-aze su visoko ekspimirani enzimi sa složenom transkripcionom i posttranslacionom regulacijom čiji su induktori strukturno veoma različiti. Ovi enzimi imaju više vezujućih mesta za ksenobiotike ali mogu vezati i druge molekule-ligande. Ligandi se mogu vezati i u udubljenjima između dve subjedinice enzima ili za H-mesto ili za G-mesto, mada, nije retko da se produkti reakcije konjugacije vežu istovremeno za oba mesta i inaktiviraju enzim. Obično enzim nije aktivan kada veže ligand. Ovo vezivanje je ireverzibilno i poznato je pod nazivom „samoubilački“ protektivni mehanizam. Često su konjugati poreklom od nus proizvoda oksidativne modifikacije lipida, DNK i proteina kojih u velikim količinama ima u stanjima visokog oksidativnog stresa.

Verovatno je mehanizam delovanja ispitivanih polimorfizama različit među našim ispitivanim grupama. Takođe, pri obradi rezultata, uzeli smo u obzir sve kliničke manifestacije ateroskleroze, nismo radili analize među pojedinačnim grupama (npr za IM, za CVD), što možda utiče na dobijene rezultate. Na osnovu podataka iz literature, vidi se postojanje etničke ili populaciono-specifične osetljivosti na razvoj ateroskleroze kada su u pitanju ispitivani polimorfizmi P1, T1 i M1 gena, ali evidentna je i razlika u dobijenim rezultatima usled različitih veličina grupa ispitivanih pacijenata. Primena kontrola baziranih na porodicama (npr. test neravnoteže transmisije, eng *Transmission*

Disequilibrium Test-TDT) i/ili korišćenje metode koja je usmerena na pronalaženje zajedničkih alela kod aficiranih osoba, tj regiona genoma koji su „identični po poreklu“ (eng. *Identical By Descent-IBD*) kod aficiranih parova braće i sestara bi mogli pokazati da li određeni alel na neki način učestvuje u nastanku bolesti.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata, izvedeni su sledeći zaključci:

- Koronarna bolest srca je najzastupljenija klinička manifestacija ateroskleroze i kod obolelih od T2DM i kod obolelih bez T2DM
- Hipertenzija, hiperlipidemija i pozitivna porodična istorija za kardiovaskularne bolesti su faktori rizika za razvoj kardiovaskularnih komplikacija u čijoj osnovi je ateroskleroza.
- Između grupe pacijenata sa T2DM i grupom pacijenata bez T2DM uočena je statistički značajna razlika u učestalosti osoba sa pozitivnom porodičnom istorijom kardiovaskularnih bolesti, pa postojanje KVB u porodici predstavlja faktor rizika za razvoj ateroskleroze kod obolelih od tipa 2 DM-a.
- Nije uočena statistički značajna razlika u distribuciji alela i genotipova apoE 112/158 polimorfizma između obolelih i kontrolne grupe, kao ni između dve grupe obolelih, pa se on ne može smatrati genetičkim markerom rizika za razvoj kardiovaskularnih oboljenja u čijoj osnovi je ateroskleroza.
- Analiza polimorfizma Q192R gena za paraoksonazu 1 pokazala je statistički značajnu razliku u učestalosti alela i genotipova između grupe pacijenata sa T2DM i kontrolne grupe i između grupe pacijenata sa T2DM i grupe bez T2DM (sa aterosklerozom). Logistička regresiona analiza je pokazala postojanje značajno povećanog rizika za razvoj kliničkih manifestacija ateroskleroze kod dijabetičara koji nose R alel, pa se ovaj polimorfizam može smatrati genetičkim markerom osetljivosti na oksidativni stres.

- Analiza polimorfizama L55M i C(-107)T gena za paraoksonazu 1 nije pokazala statistički značajnu razliku u učestalostima alela i genotipova između ispitivanih grupa, pa se ovi polimorfizmi ne mogu smatrati faktorom rizika za razvoj kardiovaskularnih oboljenja u čijoj osnovi je ateroskleroza.
- Analiza polimorfizma Ile105Val gena za glutation S-transferazu P1 nije pokazala statistički značajnu razliku u učestalostima alela i genotipova između ispitivanih grupa, i stoga ispitivani polimorfizam nije faktor rizika za razvoj kardiovaskularnih oboljenja u čijoj osnovi je ateroskleroza.
- Analiza delecionog polimorfizma gena za glutation S-transferazu M1 pokazala je statistički značajnu razliku u učestalosti nultitog genotipa između obolelih od ateroskleroze i kontrolne grupe. Logistička regresiona analiza je pokazala povećan rizik za razvoj ateroskleroze kod osoba sa nultitim genotipom GSTM1.
- Analiza delecionog polimorfizma gena za glutation S-transferazu T1 pokazala je statistički značajnu razliku učestalosti nultitog genotipa između obolelih od ateroskleroze bez DMT2 i kontrolne grupe. Logistička regresiona analiza je pokazala postojanje značajno povećanje rizika za razvoj ateroskleroze kod osoba sa nultitim genotipom.
- Kombinovana analiza nultitih genotipova GSTM1 i GSTT1 gena pokazala je statistički značajnu razliku u učestalosti kombinovanih delecionih genotipova između obolelih i kontrolne grupe. Logistička regresiona analiza je pokazala da osobe sa dvostrukim nultitim genotipom imaju čak petnaest puta veći rizik da obole od ateroskleroze u odnosu na osobe sa prisutna oba gena. Kombinovana delecija GSTM1 i GSTT1 gena predstavlja značajan genetički marker za osetljivost na oksidativni stres.

7. LITERATURA

A

Adkins S., Gan K.N., Mody M., LaDu B.N. (1993) Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/ arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *American Journal of Human Genetics*, 53:598-608.

Adler V., Yin Z., Fuchs S.Y., Benezra M., Rosario L., Tew K.D., Pincus M.R., Sardana M., Henderson C.J., Wolf C.R., Davis R.J., Ronai Z. (1999) Regulation of JNK signalling by GSTP. *EMBO Journal*, 18:1321–1334.

Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX, Buolamwini J (1997) Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 272(15):10004–10012

Allan C.M., Walker D., Segrest J.P., Taylor J.M. (1995) Identification and characterization of a new human gene (ApoC4) in the apolipoprotein E, CI and CII gene locus. *Genomics*, 28:291–300.

Al-Majed H.T., Qasem J.A., Al-Sherifi A.K., Al-Attar A.A., Qasem A.A., Abdullah S.A.(2011) Association between apolipoprotein E-polymorphism and Ischemic heart disease patients with or without type 2 diabetes mellitus: a preliminary study in Kuwait. *Archives of Iranian Medicine*, 14(6):385-388.

Altuner D., Ates I., Suzen S.H., Koc G.V., Aral Y., Karakaya A. (2011) The relationship of PON1 QR 192 and LM 55 polymorphisms with serum paraoxonase activities of Turkish diabetic patients. *Toxicology and Industrial Health*, 27(10):873-878.

Amer, M.A., Ghattas M.H., Abo-Elmatty D.M., Abou-el-Ela S.H. (2012) Evaluation of glutathione S-transferase P1 genetic variants affecting type 2 diabetes susceptibility and glycemic control. *Archives of Medical Sciences*, 8(4):631-636.

Amer M.A., Ghattas M.H., Abo-Elmatty D.M., Abou-El-Ela S.H. (2011) Influence of glutathione S-transferase polymorphisms on type-2 diabetes mellitus risk. *Genetics and Molecular Research*, 31;10(4).

Anoop S., Anoop M., Meena K., Luthra K. (2010). Apolipoprotein E polymorphism in cerebrovascular and coronary heart disease. *Indian Journal of Medical Research*, 132:363-378.

Antikainen M., Murtomaki S., syvanne M., Pahlman R., Tahvanainen E., Jauhiainen M., frick m.H., Ehnholm C (1996) The Gln-arg 191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUM-PONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in Fins. *Journal of Clinical Investigations*, 98(4): 883-885.

Aviram M., Rosenblat M., Bisgaier C.L., Newton R.S., Primo-Parmo S.L., La Du B.N.(1998): Paraonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraonase. *Journal of Clinical Invest.igation*, 101:1581–1590.

Aviram M., (1999). Does paraonase play a role in susceptibility to cardiovascular disease. *Molecular Medicine Today*, 5:381–386.

Aviram M., Hardak E., Vaya J., Mahmood S., Milo S., Hoffman A., Billicke S., Draganov D., Rosenblat M. (2000) Human serum paraonase (PON) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation*, 101:2510–2517.

Aviram M., Rosenblat M. (2004) Paraonases 1, 2 and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radical Biology and Chemistry*, 37:1304-1316.

Aviram M., Rosenblat M. (2005) Paraonases and cardiovascular diseases: pharmacological and nutritional influences. *Current Opinion in Lipidology*, 16(2):393-399.

Awasthi Y.C. (editor) *The toxicology of glutathione transferases*. 1st Edition, CRC Press Taylor&Francis Group, Boca Raton, USA

Aynacioglu A.S., Cascorbi I., Mrozikiewicz P.M., Nacak M., Tapanyigit E.E., Roots I. (1999) Paraoxonase 1 mutations in a Turkish population. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 157(3):174-7.

B

Baynes J.W., Thorpe S.R. (1999) Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*, 48 (1):1–9.

Bayrak A., Bayrak T., Tokgözoğlu S.L., Volkan-salanci B., Deniz A., Yavuz B., Alikashişoğlu M., Demirpence E. (2012) Serum PON1-lactivity but not Q192R polymorphism is related to the extent of atherosclerosis. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 18:1-.

Bell D.A., Taylor J.A., Paulson D.F., Robertson C.N., Mohler J.L., Lucier G.W. (1993) Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *Journal of National Cancer Institute*, 85:1159–1164.

Bellosta S., Mahley R. W., Sanan D. A., Murata J., Newland D.L., Taylor J.M., Pitas R.E. (1995) Macrophage-specific expression of human apolipoprotein E reduces atherosclerosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E-null mice. *Journal of Clinical Investigation*, 96:2170–2179.

Bhatia S., Shukla R., Venkata Madhu S., kaur Gambhir J., Madhava prabhu K. (2003) Antioxidant status, lipid peroxidation and nitric oxide end products in patients with type 2 diabetes mellitus with nephropathy. *Clinical Biochemistry*, 36: 557-562.

Bhattacharyya T., Nicholls S.J., Topol E.J., Zhang R., Yang X., Schmitt D., Fu X., Shao M., Brennan D.M., Ellis S.G., Allayee H., Lusis A.J., Hazen S.L. (2008) Relationship of paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and functional activity with systemic oxidative stress and cardiovascular risk. *Journal of American Medical Association (JAMA)* 299:1265–1276.

Bid H.K., Konwar R., Saxena M., Chaudhari P., agrawal .G., Banerjee M. (2010) Association of glutathion s-transferase (GSTM1, T1 and P1) gene polymorphism with type 2 diabetes mellitus in north India population. *Journal of Postgraduate Medicine*, 56:176-181.

Billecke S., Draganov D., Counsell R. (2000) Human serum paraoxonase (PON1) isoenzymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. *Drug Metabolism and Disposition*, 28:1335-1342.

Boemi M, Leviev I, Sirolla C, Pieri C, Marra M, James RW. (2001) Serum paraoxonase is reduced in type 1 diabetic patients compared to non-diabetic, first degree relatives; influence on the ability of HDL to protect LDL from oxidation. *Atherosclerosis*, 155:229–235.

Brophy V.H., Jampsa .R.L., Clendenning J.B., McKinstry L.A., Jarvik G.P., Furlong C.E. (2001) Effects of 5' regulatory- region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. *American Journal of Human Genetics*, 68:1428-1436.

C

Camsari A., Tamer L., Aras Ateş N., Pekdemir H., Çiçek D., Ercan B., Camdeviren H., Atik U. (2005) Apolipoprotein E polymorphism in diabetic and non-diabetic patients: does it really contribute to atherosclerosis? *Acta Cardiologica*, 60(4):409-414.

Cataño H.C.,Cueva J.L., Cardenas A.M., Izaguirre V., Zavaleta A.I., Carranza E, Hernández A.F. (2006) Distribution of paraoxonase-1 gene polymorphisms and enzyme activity in a peruvian population. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 47:699-706.

Chisolm G.M., Steinberg D. (2000) The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radical Biology and Medicine*, 28:1815–1826.

Chobanian A.V., Dzau V.J. Renin angiotensin system and atherosclerotic vascular disease. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Vol. 1. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996:237-42.

Christiansen L., Bathum L., Frederiksen H., Christensen K. (2004) Paraoxonase 1 polymorphisms and survival. *European Journal of Human Genetics*, 12:843–847.

Clarimon, J., Eerola, J., Hellström, O., Tienari, P.J., and A. Singleton (2004). Paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and Parkinson's disease in a Finnish population. *Neuroscience Letters*, 367(2): 168-170.

Corbo r.M., Sacchi R. (1999) apolipoprotein E (apoE) allele distribution in the world. Is APOE*4 a 'thrifty' allele? *Annals of Human Genetics*, 63:301-310.

Costa L.G., Cole T.B., Furlong C.E. (2005) Paraoxonase (PON1): from toxicology to cardiovascular medicine. *Acta Biomedica*, 2:50-57.

Costa L.G., Eaton D.L. (2006) Gene-Environment Interactions. *Fundamentals of Ecogenetics*. 1st Edition, John Wiley and sons, Inc., Hoboken, New Jersey

Costa L.G., Giordano G., Furlong C.E. (2010) Pharmacological and dietary modulators of paraoxonase 1 (PON1) activity and expression: the hunt goes on. *Biochemical Pharmacology*, 81(3):337-344.ž

Ć

Ćorić V., Plješa-Ercegovac M., Matić M., Krivič B., Šuvakov S., Tulić C., Mimić-Oka J., Simić T. (2010) The role of GSTM1 and GSTT1 polymorphism in patients with renal cell carcinoma . *Journal of Medical Biochemistry*, 29: 204–210.

D

Datta S.K., Kumar V., Pathak R, Tripathi A.K., Ahmed R.S., Kalra O.P., Banerjee B.D. (2010) Association of glutathione S-transferase M1 and T1 gene polymorphism with oxidative stress in diabetic and nondiabetic chronic kidney disease. *Renal Failure*, 32:1189-1195.

Davies H.G., Richter R.J., Keifer M., Broomfield C.A., Sowalla J., Furlong C.E. (1996) The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nature Genetics*, 14:334-336.

Davignon J., Gregg R.E., Sing C.F. (1988) Apolipoprotein E polymorphisms and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 8:1-21.

Deakin S., Leviev I., Nicaud V., Bruhlar Meynet M.C., Tiret L., James R.W.; European Atherosclerosis Risk group. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(3): 1268-1273.

Deakin S., Leviev I., Bruhlar Meynet M.C., James R.W. (2003) Paraoxonase-1 promoter haplotypes and serum paraoxonase: a predominant role for polymorphic position -107, implicating the Sp1 transcription factor. *Biochemical Journal*, 372:643-649.

De Backer G., Ambrosioni E., Borch-Johnsen K., Brotons C., Cifkova R., Dallongeville J., Ebrahim S., Faergeman O., Graham I., Mancia G., Manger Cats V., Orth-Gomér K., Perk J., Pyörälä K., Rodicio J.L., Sans S., Sansoy V., Sechteme U., Silber S., Thomsen T., Wood D. (2003) European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. Third Joint Task Force of European and other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. *European Heart Journal*, 24:1601-10.

De Flora S., Izzotti A., Randerath K., Randerath E., Bartsch H., Nair J., Balansky R., van Schooten F., Degan P., Fronza G., Walsh D., Lewtas J. (1996) DNA adducts and chronic degenerative diseases. Pathogenetic relevance and implications in preventive medicine. *Mutation Research*, 366:197-238.

De Maria F., Pedersen J.Z., Caccuri A.M., Antonini G., Turella P., Stella L., Lo Bello M., Federici G., Ricci G. (2003) The specific interaction of dinitrosyl-diglutathionyl-iron complex, a natural NO carrier, with the glutathione transferase superfamily-suggestion for an evolutionary pressure in the direction of the storage of nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry*, 278(43):42283-42293.

Djan I., Stokić E., Sakač D., Djan M., Obreht D., Erak M., Jovanović N. (2011) Case-control study of Apo E gene polymorphism in young SHD patients and controls in the Serbian population. *Archives of Biological Sciences* 63(1):89-98

Doney A.S., Lee S., Leese G.P., Morris A.D., Palmer C.N. (2005) Increased cardiovascular morbidity and mortality in Type 2 diabetes is associated with the glutathione S-transferase theta-null genotype, A Go-DARTS study. *Circulation*, 111:2927-2934.

Dong L.M., Weisgraber K.H. (1996) Human apolipoprotein E4 domain interaction. Arginine 61 and glutamic acid 255 interact to direct the preference for very low density lipoproteins. *The Journal of Biological Chemistry* 271:19053-19057.

Draganov D.I., Sass K.M., Watson C.E., Bisgaier C.L., Reddy S.T., Teiber J.F., La Du B.N. (2002) The N-terminal sequences of human paraoxonase-1 (PON1) and paraoxonase-3 (PON3) are responsible for their different translocation and secretion. *Circulation*, 106 (II):123.

Draganov D.I., La Du B. N. (2004) Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 369:78-88.

Durrington P.N., Mackness B., Mackness M.I. (2001) Paraoxonase and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21:473-480.

D

Đorđević V., Nikolić A., Ljujić M., Nestorović A., Ristanović M., Tulić C., Radojković D. (2010) Combined effect of GSTM1 gene deletion, GSTT1 gene deletion and MTHFR C677T mutation in male infertility. *Archives of Biological Sciences*, 62 (3):531-530.

Đurić G., Svetel M., Nikolaević S.I., Dragadević N., Gavrilović J., Kostić V.S. (2007) Polymorphisms in the genes of cytochrome oxidase P450 2D6 (CYP2D6), paraoxonase 1 (PON1) and apolipoprotein E (APOE) as risk factors for Parkinson's disease. *Vojnosanitetski Pregled*, 64(1):25-30.

E

European association for the Study of Diabetes. EASD. Available from URL: <http://www.easd.org/easd/>

Eaton D.L., Bammler T.K. (1999) Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicological Sciences*, 49:156–164.

Ehnholm C., Mahley R.W., Chappell D.A., Weisgraber K.H., Ludwig E., Witztum J.L. (1984) Role of apolipoprotein in lipolytic conversion of β very low density lipoproteins to low density lipoproteins in type III hypolipoproteinemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81:5556-5570.

Eichner J.E., Dunn S.T., Perveen G., Thompson D.M., Stewart K.E. (2002) Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. *American Journal of Epidemiology*, 155:487-495.

Elliot S.J., Meszaros G., Schilling W.P. (1992) Effect of oxidant stress on calcium signalling in vascular endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 13:635-650.

Ergun M.A., Yurtcu E., Demirci H., Iihan M.N., barkar V., Yetkin I., Menevse A. (2011) PON1 55 and 195 polymorphisms in type 2 diabetes mellitus patients in a Turkish population. *Biochemical Genetics*, 49(1-2): 1-8.

F

Ferrario C.M., Richmond R.S., Smith R., Levy P., Strawn W.B., Kivlighn S. (2004) Renin–angiotensin system as a therapeutic target in managing atherosclerosis. *American Journal of Therapeutics, Review*. 11:44–53.

Flekač M., Škrha J., Zídková K., Lacinová Z., Hilgertová J. (2008) Paraoxonase 1 Gene Polymorphisms and Enzyme Activities in Diabetes Mellitus. *Physiological Research*, 57:717-726.

Fouchier S.W., Rodenburg J., Defesche J.C., Kastelein J.J. (2009) Management of hereditary dyslipidaemia; the paradigm of autosomal dominant hypercholesterolaemia. *European Journal of Human Genetics.*, 13(12):1247-53.

Fryer a.A., Bianco A., Hepple M., Jones P.W., Strange R.C., Spiteri M.A. (2000): Polymorphism at the glutathione S-transferase GSTP1 locus. A new marker for bronchial hyperresponsiveness and asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 161(5): 1437-1442.

Fullerton S.M., Clark A.G., Weiss K.M., Nickerson D.A., Taylor S.L., Stengard J.H., Salomaa Y., Vartiainen E., Perola M., Boerwinkle E., Sing C.F. (2000) Apolipoprotein E variation at the sequence level: Implications for the origin and maintenance of a major human polymorphism. *American Journal of Human Genetics*, 67:881–890.

Furlong C.E., Richter R.J., Chapline C., Crabb J.W.(1991) Purification of rabbit and human serum paraoxonase. *Biochemistry*, 30:10133-10140.

G

Gaidukov L., Rosenblat M., Aviram M., Tawfik D.S. (2006) The 192R/Q polymorphisms of serum paraoxonase PON1 differ in HDL binding, lipolactonase stimulation, and cholesterol efflux: *Journal of Lipid Research*, 47 (11):2492–2502.

Gibbons G.H., Pratt R.E., Dzau V.J. (1992) Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia: autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. *Journal of Clinical Investigation*, 90:456-461.

Glagov S., Weisenberg E., Zarins C.K., Stankunavicius R., Kolettis G.J. (1987) Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *New England Journal of Medicine*, 316:1371-1375.

Gokce N., Keaney J.F. Jr, Hunter L.M., Watkins M.T., Menzoian J.O., Vita J.A. (2002) Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: A prospective study. *Circulation*, 105:1567–1572.

Goldstein J.L., Brown M.S. (2009) The LDL receptor. Review. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(4):431-8.

Gönül N., Kadioglu E., Kocabaş N.A., Ozkaya M., Karakaya A.E., Karahalil B. (2012) The role of GSTM1, GSTT1, GSTP1 and OGG1 polymorphisms in type 2 diabetes mellitus risk: a case-control study in a Turkish population. *Gene*; 505(1): 121-127.

Grđić M., Barišić K., Rumora L., Salamunić I., Tadijanović M., Žanić-Grubišić T., Pšikalova R., Fleger-Meštrić Z., Juretić D. (2008) Genetic Frequencies of Paraoxonase 1 Gene Polymorphisms in Croatian Population. *Croatica Chemica Acta*, 81:105-111.

Gupta N., Binu k.B., Singh S., Maturu N.V., Sharma Y.P., Bhansali A., Gill K.D. (2012) Low serum PON1 activity: an independent risk factor for coronary artery disease in North-West Indian type 2 diabetics. *Gene*, 498(1): 13-19.

Güz G., Nurhan Ozdemir F., Sezer S., Işıklar I., Arat Z., Turan M., Haberal M. (2000) Effect of apolipoprotein E polymorphism on serum lipid, lipoproteins, and atherosclerosis in hemodialysis patients. *American Journal of Kidney Diseases* 36(4):826-836.

H

Haffner S.M. (1999) Diabetes, hyperlipidemia and coronary artery disease. *American Journal of cardiology*, 83(9B):17F-21F.

Hanlon C.S., Rubinsztein D.C. (1995) Arginine residues at codon 112 and 158 in the apolipoprotein E gene correspond to ancestral state in humans. *Atherosclerosis*, 112:85–90.

Harel M., Aharoni A., Gaidukov L., Brumshtein B., Khersonsky O., Meged R., Dvir H., Ravelli B.G.R., McCarthy A., Toker L., Silman I., Sussman J.L., Tawfik D.S. (2004) Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nature, Structural and Molecular Biology*, 11(5):412-419.

- Harries L.W., Stubbins M.J., Forman D., Howard G.C.W., Wolf C.R. (1997) Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis*, 18(4):641-644.
- Hassett C., Richter R.J., Humbert R.,(1991) Characterization of DNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence. *Biochemistry*, 30:10141-10149.
- Hatters D.M., Peters-Libeu C.A.,Weisgraber K.H. (2006) Apolipoprotein E structure: Insights into function. *Trends in Biochemical Sciences*, 31:445–454.
- Hayes J.D. Strange R.C. (2000) Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology*, 61:154–166.
- Hayes J.D., McLellan L.I., (1999) Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Research*, 31:273–300.
- Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. (2005) Glutathione transferases, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45:51-88.
- Heitzer T., Schlinzig T., Krohn K., Meinertz T., Munzel T. (2001) Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 104:2673 –2678.
- Higashi Y., Noma K., Yoshizumi M., Kihara Y. (2009) Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. Review. *Circulation*, J 73:411-418.
- Hofer S.E., Bennetts B., Chan A.K., Holloway B., Karschimkus C., Jenkins A.J., Silink M., Donaghue K.C. (2006) Association between PON1 polymorphisms, PON1 activity and diabetes complications. *Journal of Diabetes and its complications*, 20(5): 322-328.
- Holley S.L, Fryer A.A., Carroll W., Hoban P.R., Strange R.C. GST polymorphism: Where to now? Clinical applications and functional analysis. In: Awasthi Y.C. (editor) *the toxicology of glutathione transferases*. Taylor &Francis Group, 2007,129-154.

Hori M., Oniki K., Ueda K., Goto S., Mihara S., Marubayashi T., Nakagawa K. (2007) Combined glutathione S-transferase T1 and M1 positive genotypes afford protection against type 2 diabetes in Japanese. *Pharmacogenomics*, 8(10):1307-1314.

Humbert R., Adler D.A., Disteche C.M., Omiecinski C.J., Furlong C.E. (1993) The molecular basis of the human serum paraoxonase polymorphisms. *Nature Genetics*, 3:73-76.

I

Institut za javno zdravlje Srbije „ Dr Milan Jovanović Batut“. Analiza zdravstvenog stanja stanovništva 1997-2007. Analitička studija, beograd, 2008.

Institut za javno zdravlje Srbije „ Dr Milan Jovanović Batut“ Incidencija i mortalitet od akutnog koronarnog sindroma u Srbiji. Beograd, 2010.

Institut za javno zdravlje Srbije „ Dr Milan Jovanović Batut“ Incidencija i mortalitet od dijabetesa u Srbiji, 2010. Registar za dijabetes u Srbiji. Izveštaj broj 5. Beograd, 2011.

Ivarsson Y., Mannervik B. Combinatorial protein chemistry in three dimensions: a paradigm for the evolution of glutathione transferases with novel activities. In: Awasthi Y.C. (editor) *The toxicology of glutathione transferases*. Taylor & Francis Group, 2007, 47-70.

J

Jakubowski H. (2000) Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation. *Journal of Biological Chemistry*, 275:3957-3962.

James R.W., Leviev I., Ruiz J., Passa P., Froguel P., Garin M.C. (2000) Promoter polymorphism T(-107)C of the paraoxonase PON1 gene is a risk factor for coronary heart disease in type 2 diabetic patients. *Diabetes*, 49(8):1390-1393.

Jarvik G.P., Jampsa R., Richter R.J., Carlson C.S., Rieder M.J., Nickerson D.A., Furlong C.E. (2003) Novel paraoxonase (PON1) nonsense and missense mutations predicted by functional genomic assay of PON1 status. *Pharmacogenetics*, 13:291-295.

Jessup W., Kritharides L., Stocker R. (2004) Lipid oxidation in atherogenesis: an overview. *Biochemical Society Transactions*, 32(1):134-138.

Johansson S., Bondjers G., Fager G., Wedel H., Tsipogianni A., Olofsson S.O., Vedin A., Wiklund O., Wilhelmsson C. (1988) Serum lipids and apolipoprotein levels in women with acute myocardial infarction. *Arteriosclerosis*, 8(6):742-749

Juretic D., Motejlkova A., Kunovic B., Rekić B., Flegar-Mestric Z., Vujic L., Mesic R., Lukac-Bajalo J., Simeon-Rudolf V., (2006) Paraoxonase/arylesterase in serum of patients with type II diabetes mellitus. *Acta Pharmaceutica*, 56:59–68.

K

Kaneto H., Katakami N., Matsuhisa M., Matsuoka T. (2010) Role of reactive oxygen species in the progression on type 2 diabetes and atherosclerosis. *Mediators of Inflammation*, 2010:1-11.

Kariž S., Nikolajević Starčević J., Petrović D. (2012) Association of manganese superoxide dismutase and glutathione S-transferases genotypes with myocardial infarction in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 98(1): 144-150.

Khersonsky O., Tawfik D.S. (2005) Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase. *Biochemistry*, 44:6371-6382.

Kotur-Stevuljevic J., Spasic S., Jelic-Ivanovic Z., Spasojevic-Kalimanovska V., Stefanovic A., Vujovic A., Memon L., Kalimanovska-Ostic D. (2008) PON1 status is influenced by oxidative stress and inflammation in coronary heart disease patients. *Clinical Biochemistry*, 41:1067-1073.

L

La Du B.N. (1996) Structural and functional diversity of paraoxonases. *Nature Medicine*, 2:1186-1187.

Lacy .F, O'Connor D.T., Schmid-Schönbein G.W. (1998) Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *Journal of Hypertension*, 16:291-303.

Lai H.C. Qian B., Grove G., Tu C.P.D. (1988) Gene expression of rat glutathione S-transferases. Evidence for gene conversion in the evolution of the Yb multigene family. *Journal of Biological Chemistry*, 263 (23):11389–11395.

Lee M.H, Lu K., Patel S.B.(2001) Genetic basis of sitosterolemia. *Current Opinion in Lipidology*, 12(2):141–149.

Letellier C., Durou M.R., Jouanolle A.M., Le Gall J.Y., Poirier J.Y., Ruelland A. (2002) Serum paraoxonase activity and paraoxonase gene polymorphism in type 2 diabetic patients with or without vascular complications. *Diabetes and Metabolism*, 28:297–304.

Leus F.R., Zwart M, Kastelein J.J.P., Voorbij H.A.M. (2001) PON2 gene variants are associated with clinical manifestations of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia patients. *Atherosclerosis*, 154:641–649.

Leviev I, James RW (2000) Promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20:516-521.

Leviev I., Deakin S., James R.W. (2001) Decreased stability of the M54 isoform of paraoxonase as a contributory factor to variations in human serum paraoxonase concentrations. *Journal of Lipid Research*, 42:528-535.

Lewis S.J., Brunner E.J. (2004) Methodological problems in genetic association studies of longevity-The apolipoprotein E gene as an example. *International Journal of Epidemiology*, 33:962–970.

Li W.H., Tanimura M., Luo C.C., Datta S., Chan L. (1988) The apolipoprotein multigene family: Biosynthesis, structure, structure–function relationship and evolution. *Journal of Lipid Research*, 29:245–271.

Li H.L., Liu D.P., Liang C.C. (2003) Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress and diseases. *Journal of Molecular medicine*, 81:766-779.

Li J., Wang X., Huo Y., Niu T., Chen C., Zhu G., Huang Y., Chen D., Xu X. (2005) PON1 polymorphism, diabetes mellitus, obesity, and risk of myocardial infarction: Modifying effects of diabetes mellitus and obesity on the association between PON1 polymorphism and myocardial infarction. *Genetics in Medicine*, 7(1): 58-63.

Listowsky I., Arias I.M. (2007) Ligandin and Glutathione S-transferases, In: Awasthi Y.C. (editor) *the toxicology of glutathione transferases*. Taylor & Francis Group, 2007, 1-9.

Lusis A.J., Fogelman A.M., Fonarow G.C. (2004). Genetic basis of atherosclerosis: Part I: new genes and pathways. *Circulation*, 110:1868-1873.

M

Mackness M.I., Arrol S., Abbott C., Durrington P.N. (1993) Protection of low density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis*, 104:129-135.

Mackness B., Hunt R., Durrington P.N., Mackness M.I. (1997). Increased immunolocalisation of paraoxonase, clusterin and apolipoprotein AI in the human artery wall with progression of atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 17:1233–1238.

Mackness B., Mackness M.I., Arrol T., Turkie W., Durrington P.N. (1998) Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modifications. *FEBS Letters*, 423:57-60.

Madamanchi N.R., Vendrov A., Runge M.S. (2005) Oxidative stress and vascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25 (1):29–38.

Mahley R. W., Rall S.C. (2000) Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein annu. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 1:507-537.

Mahley R.W., Weisgraber K.H., Huang Y. (2009) apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *Journal of Lipid Research*, S183-S188.

Mastorikou M., Mackness M., Mackness B. (2006) Defective metabolism of oxidised-phospholipid by high-density lipoprotein from people with type 2 diabetes. *Diabetes*, 55:3099–3103.

Mattey D.L., Hassell A.B., Plant M., Dawes P.T., Olliver W.R., Jones P.W., Fryer A.A., Alldesea j.E., Strange R.C. (1999) Association of polymorphism in glutathione S-transferase loci with susceptibility and outcome in rheumatoid arthritis: comparison with the shared epitope. *Annals of the Rheumatic Disease*, 58(3):164-168.

McLellan R.A., Oscarson M., Alexandrie A.K., Seidegård J., Evans D.A., Rannug A., Ingelman-Sundberg M. (1997) Characterization of a human glutathione S-transferase mu cluster containing a duplicated GSTM1 gene that causes ultrarapid enzyme activity. *Molecular Pharmacology*, 52:958–965.

McMillan D.E. (1985) Blood flow and the localization of atherosclerotic plaques. *Stroke*, 16:582-587.

Mickovski-Katalina N., Savković S., Miljuš D., Živković S., Vukičević A., Rakočević I., Plavšić S. (2005) Karakteristike i značaj bolesti srca i krvnih sudova kod nas i u svetu. *Glasnik Instituta za zaštitu zdravlja Srbije* 77, 3-4: 31-34.

Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16:1215

Mohamed Ali S., Chia S.E. (2008) Interethnic variability of plasma paraoxonase (PON1) activity towards organophosphates and PON1 polymorphisms among Asian populations—a short review. *Industrial Health*, 46:309–317.

Morbois-Trabut L., Chabrolle C., Garrigue M.A., Lasfargues G., Lecomte P. (2006) Apolipoprotein E genotype and plasma lipid levels in Caucasian diabetic patients. *Diabetes and Metabolism*, 32(3):270-275.

Moyer A.M., Salavaggione O.E., Hebbring S.J., Moon I., Hildebrandt M.A., Eckloff B.W., Schaid D.J., Wieben E.D., Weinshilboum R.M. (2007) Glutathione S-transferase T1 and M1: gene sequence variation and functional genomics. *Clinical Cancer Research*, 13(23):7207-7216.

Moyer A.M., Salavaggione O.E., Wu T.Y., Moon I., Eckloff B.W., Hildebrandt M.A., Schaid D.J., Wieben E.D., Weinshilboum R.M. (2008) Glutathione s-transferase p1: gene sequence variation and functional genomic studies. *Cancer Research*, 68(12):4791-4801.

Murata M., Maruyama T., Suzuki Y., Saruta T., Ikeda (2004) Paraoxonase 1 Gln/arg polymorphism is associated with the risk of microangiopathy in Type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine*, 21(8):837-844.

N

Navab M., Hama-Levy S., Van Lenten B.J., Fonarow G.C., Cardinez C.J., Castellani L.W., Brennan M.L., Lusis A.J., Fogelman A.M., La Du B.N. (1997) Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio: *Journal of Clinical Investigations*, 99 (8):2005–2019.

Ng C.J., Wadleigh D.J., Gangopadhyay A., Hama S., Grijalva V.R., Navab M., Fogelman A.M., Reddy S.T. (2001). Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 276:44444-44449.

Nickerson D.A., Taylor S.A., Fullerton S.M., Weiss K.M., Clark A.G., Stengard J.H., Salomaa V., Boerwinkle E., Sing C.F. (2000) Sequence diversity and large scale typing of SNPs in human apolipoprotein E gene. *Genome Research* 10:1531–1545.

O

O'Leary K.A., Edwards R.J., Town M.M., Boobis A.R. (2005) Genetic and other sources of variation in the activity of serum paraoxonase/diazoxonase in humans: consequences for risk from exposure to diazinon *Pharmacogenetics and Genomics*, 15(1):51-60.

Online Mendelian Inheritance in Man. TANGERIER DISEASE, TGD. Available from URL: <http://omim.org/entry/205400>

Orphanet The portal for rare diseases and orphan drugs. Available from URL: <http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>

Ozer E.A., Pezzulo A., Shih D.M., Chun C., Furlong C., Lusic A.J., Greenberg E.P., Zabner J., (2005) Human and murine paraoxonase 1 are host modulators of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing. *FEMS Microbiology Letters*, 253(1):29–37.

P

Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*, 87:315–424.

Paik Y.K., Chang D.J., Reardon C.A., Davies G.E., Mahley R.W., Taylor J.M. (1985) Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. *PNAS*, 82: 3445-3449.

Palmer C.N., Young V., Ho M., Doney A., Belch J.J. (2003) Association of common variation in glutathione S-transferase genes with premature development of cardiovascular disease in patients with systemic sclerosis. *Arthritis and Rheumatism*, 48:854–855.

Parra S., Alonso-Villaverde C., Coll B., Ferré N., Marsillach J., Aragonès G., Mackness M., Mackness B., Masana L., Joven J., Camps J. (2007) Serum paraoxonase-1 activity and concentration are influenced by human immunodeficiency virus infection. *Atherosclerosis*, 194(1):175-181.

Pedersen W.A., Chan S.L., Mattson M.P., (2000) A mechanism for the neuroprotective effect of apolipoprotein E: isoform-specific modification by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Journal of Neurochemistry*, 74:1426–1433.

Pemble S., Schroeder K.R., Spencer S.R., Meyer D.J., Hallier E., Bolt H.M., Ketterer B., Taylor J.B. (1994) Human glutathione *S*-transferase theta (*GSTT1*): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochemical Journal*, 300:271–276.

Pham T., Kodvawala A., Hui D.Y. (2005) The receptor binding domain of apolipoprotein e is responsible for its antioxidant activity. *Biochemistry*, 44:7577–7582.

Primo-Parmo S.L., Sorenson R.C., Teiber J., La Du B.N. (1996) The human serum paraoxonase/arylesterase gene (*PON1*) is one member of a multigene family. *Genomics*, 33:498-507.

R

Radak Dj., Babic S., Peric M., Popov P., Tanaskovic S., Babic D., Jovic D., Otasevic P. (2012) Distribution of risk factors in patients with premature coronary, supra-aortic branches and peripheral atherosclerotic disease. *Medical Principles and Practice*, 21:228-233.

Ramprasath T., Senthil mrugan P., Prabakaran A.D., Gomathi P., Rathinavel A. Selvam G.S. (2011) Potential risk modification of *GSTT1*, *GSTM1* and *GSTP1* (glutathione *S*-transferases) variants and their association to CAD in patients with type 2 diabetes mellitus. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 407(1):49-53.

Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. (2002) *Diabetes care*, 25:5-20.

Riddell D. R., Graham A., Owen J. S. (1997) Apolipoprotein E inhibits platelet aggregation through the L-arginine:nitric oxide pathway. Implications for vascular disease. *Journal of Biological Chemistry*, 272:89–95.

Roest M., Himbergen T. M, Barendrecht A., Peeters P. H., van der Schouw Y. T., Voorbij H. A. M. (2007) Genetic and environmental determinants of the PON-1 phenotype: *European Journal of Clinical Investigation*, 37(3):187-196.

Rosenblat M., Gaidukov L., Khersonsky O., Vaya J., Oren R., Tawfik D.S. (2006) The catalytic histidine dyad of high density lipoprotein-associated serum paraoxonase-1 (PON1) is essential for PON1-mediated inhibition of low density lipoprotein oxidation and stimulation of macrophage cholesterol efflux. *Journal of Biological Chemistry*, 281:7657-7665.

Rosenblat M., Sapir O., Aviram M. Glucose inactivates paraoxonase 1 (PON1) and displaces it from high density lipoprotein (HDL) to a free PON1 form. In: Mackness B., Mackness M., Aviram M., Paragh G. (editors). *The paraoxonases: their role in disease development and xenobiotic metabolism*, Springer, 2008, 35-50.

Ross R. (1999) Atherosclerosis-an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine*, 340:115-126.

Rueckschloss U., Galle J., Holtz J., Zerkowski H.R., Morawietz H. (2001) Induction of NAD(P)H oxidase by oxidized LDL in human endothelial cells: antioxidative potential of HMG-coenzyme A reductase inhibitor therapy. *Circulation*, 104(15):1767–1772.

Ruscoe J.E., Rosario L.A., Wang T., Gate L., Arifoglu P., Wolf C.R., Henderson C.J., Ronai Z., Tew K.D. (2001): Pharmacologic or genetic manipulation of glutathione S-transferase P1-1 (GSTp1) influences cell proliferation pathways. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298(1): 339-345.

S

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K., Erlich H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487-491.

Saland J.M., Ginsberg H.N. (2007) Lipoprotein metabolism in chronic renal insufficiency. *Pediatric Nephrology*, 22:1095-1112.

Santl Letonja M., Letonja M., Ikolajević-Starčević j.N., Petrovič D. (2012) Association of manganese superoxide dismutase and glutathione S-transferases genotypes with carotid atherosclerosis in patients with diabetes mellitus type 2. *International Angiology*, 31(1): 33-41.

Sardo M.A, Campo S., Bonaiuto M., Bonaiuto A., Saitta C., Trimarchi G., Castaldo M., Bitto A., Cinquegrani M., Saitta A. (2005) Antioxidant effect of atorvastatin is independent of PON1 gene T(-107)C, Q192R and L55M polymorphisms in hypercholesterolaemic patients. *Current Medical Research and Opinion*, 21 (5): 777-784.

Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. (2000) Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*, 101:1899–1906.

Schiele F, DeBacquer D, Vincent-Viry M, Beisiegel U., Ehnholm C., Evans A., Kafatos A., Martins M.C., Sans S., Sass C., Visvikis S., De Backer G., Siest G. (2000). Apolipoprotein E serum concentration and polymorphism in six European countries: the ApoEurope Project. *Atherosclerosis*, 152:475–88.

Seixas S., Trovoada M.J., Rocha J. (1999). Haplotype analysis of the apolipoprotein E and apolipoprotein CI loci in Portugal and Sao Tome a principe (Gulf of Guinea): Linkage disequilibrium evidence that ApoE4 is the ancestral apoE allele. *Human Biology*, 71:1001–1008.

Sharma R., Ansari G.A.S., Awasthi Y.C. (2007) Physiological substrates of Glutathione S-Transferases, in: Y.C. Awasthi editor, *Toxicology of glutathione transferases*, Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton, 2007, pp. 179-203.

Sherratt P.J., Manson M.M., Thomson A.M., Hissink E.A., Neal G.E., van Bladeren P.J., Green T., Hayes J.D. (1998) Increased bioactivation of dihaloalkanes in rat liver due to induction of class theta glutathione S-transferase T1-1. *Biochemical Journal*, 335:619–630.

Shore V.G., Shore B. (1973) Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. *Biochemistry*, 12(3):502–507.

Singh P.P., Singh M., Mastana S.S. (2006) APOE distribution in world populations with new data from India and UK. *Annals of Human Biology*, 33(3):279-308.

Sorenson R.C., Primo-Parmo S.I., Kuo C.L., Adkins S., Lockridge O., La Du B.N. (1995) Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase. *PNASUSA*, 92:7187-7191

Sorenson R.C., Bisgaier C.L., Aviram M., Hsu C., Billecke S., LaDu B.N. (1999) Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apoprotein A-1 stabilizes activity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19:2214-2225.

Stanković S., Jovanović-Markovi Z., Majkić-Singh N., stanković A., Glišić S., Živković M., Kostić V., Alavantić D. (2004) Apolipoprotein E gene polymorphism as a risk factor for ischemic cerebrovascular disease. *Jugoslovenska medicinska knjiga*, 23:255-264.

Stannard A.K., Riddell D.R., Sacre S.M., Tagalakis A.D., Langer C., von Eckardstein A., Cullen P., Athanasopoulos T., Dickson G., Owen J.S. (2001) Cell-derived apolipoprotein E (ApoE) particles inhibit vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in human endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276:46011–46016.

Stengård J.H., Zerba K.E., Pekkanen J., Ehnholm C., Nissinen A., Sing C.F. (1995) Apolipoprotein E polymorphism predicts death from coronary heart disease in a longitudinal study of elderly Finnish men. *Circulation*, 91:265-269.

Stocker R., Keaney J.F. (2001) Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological Reviews*, 84:1381-1478.

Strange R.C., Spiteri M.A., Ramachandran S., Fryer A.A. (2001) Glutathione S-transferase family of enzymes. *Mutation Research*, 482:21–26.

Suehiro T., Nakamura T., Inoue M., Shiinoki T., Ikeda Y., Kumon Y., Shindo M., Tanaka H., Hashimoto K. (2000) A polymorphism upstream from the human paraoxonase (PON1) gene and its association with PON1 expression. *Atherosclerosis*, 150:295-308.

Suvakov S., Damnjanovic T., Stefanovic A., Pekmezovic T., Savic-Radojevic A., Pljesa-Ercegovac M., Matic M., Djukic T., Coric V., Mimic-Oka J., Dimkovic N., Simic T (2012) Glutathione S-transferase A1, M1, P1 and T1 null or low-activity genotypes are associated with enhanced oxidative damage among haemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*, doi:10.1093/ndt/gfs369

Swei A., Lacy F., DeLano F.A., Schmid-Schönbein G.W. (1997) Oxidative stress in the Dahl hypertensive rat. *Hypertension* , 30:1628-33.

T

Talmud P.J., Stephens J.W., Hawe E., Demissie S., Cupples L.A., Hurel S.J., Humphries S.E., Ordovas J.M. (2005) The significant increase in cardiovascular disease risk in APOEepsilon4 carriers is evident only in men who smoke: potential relationship between reduced antioxidant status and ApoE4. *Annals of Human Genetics* 69(Pt 6):613-622.

Tamer L., Ercan B., Camsari A., Yildirim H., Çiçek D., Sucu N., Ateş N.A., Atik U. (2004) Glutathione S-transferase gene polymorphism as a susceptibility factor in smoking-related coronary artery disease. *Basic Research in Cardiology*, 99:223–229.

Thommpson M.W., McInnes R.R., Willard H.F. Genetic variation, polymorphisms and mutation. In: *Genetics in Medicine*, 15th edition 1991:115-141.

Topic A., Spasojevic-Kalimanovska V., Zeljkovic A., Vekic J., Jelic-Ivanovic Z. (2007) Gender-related effect of apo E polymorphism on lipoprotein particle sizes in the middle-aged subjects. *Clinical Biochemistry*, 41(6):361-367.

Tsukamoto K., Watanabe T., Matshushima T., Kinoshita ., Kato H., Hashimoto Y., Kurokawa K., Teramoto T. (1993) Determination by PCR-RFLP of apo E genotype in a Japanese population. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 121(4):598-602.

Turnpenny P.D., Ellard S. (2009) *Emerijevi Osnovi Medicinske Genetike*, 13. Izdanje, Data Status, Beograd.

U

Ungvari Z., Csiszar A., Edwards J.G., Kaminski P.M., Wolin M.S., Kaley G., Koller A. (2003) Increased superoxide production in coronary arteries in hyperhomocysteinemia: role of tumor necrosis factor-alpha, NAD(P)H oxidase, and inducible nitric oxide synthase. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23:418–424.

V

Vaisi-Raygani A., Rahimi Z., Nomani H., Tavilani H., Pourmotabbed T. (2007) The presence of apolipoprotein epsilon4 and epsilon2 alleles augments the risk of coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Clinical Biochemistry*, 40(15):1150-1156.

Vaisi-Raygani A., Rahimi Z., Tavilani H., Pourmotabbed T. (2010) Butyrylcholinesterase K variant and the APOE-epsilon 4 allele work in synergy to increase the risk of coronary artery disease especially in diabetic patients. *Molecular Biology Reports*, 37(4):2083-2091.

Vlassara H. (1994) Recent progress on the biologic and clinical significance of advanced glycosilation end products. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 124(1):19-30.

Voso M.T., D'Alo F., Putzulu R., Mele L., Scardocci A., Chiusolo P., Latagliata R., Lo-Coco F., Rutella S., Pagano L., Hohaus S., Leone G. (2002) Negative prognostic value of glutathion S-transferase (GSTM1 and GSTT1) deletions in adult acute myeloid leukemia. *Blood*, 100(8):2703-2707.

W

Wang G., Zhang L., Li Q. (2006) Genetic polymorphisms of GSTT1, GSTM1, and NQO1 genes and diabetes mellitus risk in Chinese population, *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 341:310-313.

Wang Y., Luk A.O., Ma R.C., So W.Y., Tam C.H., Ng M.C., Yang X., Lam V. , Tong P.C., Chan J.C. (2012) Predictive role of multilocus genetic polymorphisms in cardiovascular disease and inflammation-related genes on chronic kidney disease in Type 2 diabetes-an 8 year prospective cohort analysis of 1163 patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 27(1):190-196.

Wasan K.M, Brocks D.R, Lee S.D., Sachs-Barrable K., Thornton S.J. (2008) Impact of lipoproteins on the biological activity and disposition of hydrophobic drugs: implications for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7:84-99.

Watson M.A., Stewart R.K., Smith G.B., Massey T.E., Bell D.A. (1998) Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis*, 19(2):275-280.

Wellen K.E., Hotamisligil G.S. (2005) Inflammation, stress, and diabetes *The Journal of Clinical Investigation*, 115 (5):1111–1119.

Weisgraber K.H., Innerarity T.L., Mahley R.W. (1982) Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *Journal of Biological Chemistry*, 257:2518–2521.

Wilson P.W., Schaefer E.J., Larson M.G., Ordoas J.M. (1996) Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease. A meta-analysis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 16:1250-1255.

Wilson M.H., Grant P.J., Hardie L.J., Wild C.P. (2000) Glutathione S-transferase M1 null genotype is associated with a decreased risk of myocardial infarction. *FASEB Journal*, 14:791–796.

X

Xia C., Hu J., Ketterer B., Taylor J.B. (1996): The organization of the human GSTP1-1 gene promoter and its response to retinoic acid and cellular redox status. *Biochemical Journal*, 313(1):155-161.

Y

Yalin S., Hatungil R., Tamer L., Ates N.A., Dogruer N., Yildirim H., Karakas S., Atik U. (2007) Glutathione S-transferase gene polymorphisms in Turkish patients with diabetes mellitus *Cell Biochemistry and Function*, 25:509-513.

Yang F., Wang .H., Yang F, Wang LH, Wang J, Dong YH, Hu JY, Zhang LH., (2005) Quorum quenching enzyme activity is widely conserved in the sera of mammalian species. *FEBS Letters*, 579(17):3713–3717.

Yin Z., Ivanov V.N., Habelhah H., Tew K., Ronai Z. (2000) Glutathione S-transferase p elicits protection against H₂O₂-induced cell death via coordinated regulation of stress kinases. *Cancer Research*, 60:4053–4057.

Z

Zang B., Eto S., Fan P., Bian C., Shimoji E., Saito T., Saku K. (2003) Paraoxonase (Pon1) Q192R polymorphism and serum Pon1 activity in diabetic patients on maintenance hemodialysis. *Clinical nephrology*, 60(4):257-265.

Zeleny M., Swertfeger D.K., Weisgraber K.H., Hui D.Y. (2002) Distinct apolipoprotein E isoform preference for inhibition of smooth muscle cell migration and proliferation. *Biochemistry*, 41:11820–11823.

8. BIOGRAFIJA AUTORA

Diplomirani molekularni biolog i fiziolog Ivana Grubiša (rođ. Pejin) rođena je 19.03.1980. godine u Zrenjaninu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija, upisala je školske 1999/2000 godine, a diplomirala školske 2006/2007 godine na usmerenju Eksperimentalna biomedicina. Iste godine upisala je doktorske studije na matičnom Biološkom fakultetu, modul Genetika. Školske 2007/2008 godine upisala je akademske specijalističke studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Genetika, a 2009. godine odbranila je specijalistički rad.

U periodu od 2006 do 2007 godine, Ivana Grubiša je bila zaposlena kao istraživač pripravnik na naučnom projektu iz programa Osnovnih istraživanja finansiranom od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije Ev. Br 143022. U tom periodu učestvovala je u vođenju praktične nastave na Katedri za biologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Od septembra 2007. godine zaposlena je u Službi za laboratorijsku dijagnostiku Kliničko-bolničkog centra „Zvezdara“, na Odeljenju za humanu genetiku i prenatalnu dijagnostiku. Šef Odeljenja je od maja 2012. godine. Trenutno je angažovana na naučnom projektu iz oblasti osnovnih istraživanja Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije Ev br OI175075.

U dosadašnjem naučnom radu, Ivana Grubiša je bila autor i koautor više naučnih publikacija u časopisima međunarodnog i nacionalnog značaja i više saopštenja na skupovima međunarodnog značaja. Autor je poglavlja u knizi međunarodnog značaja. Godine 2012. dobitnik je Nacionalne stipendije za 2012 koju dodeljuje Evropsko društvo za genetiku ljudi.

Oblasti interesovanja: medicinska genetika, populaciona genetika ljudi

9. PRILOZI

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а **Ивана Грубиша**

број уписа **GC060072**

Изјављујем

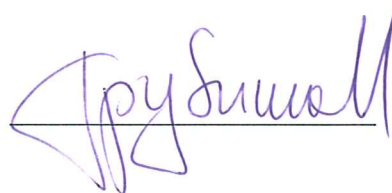
да је докторска дисертација под насловом

**Генетички маркери оксидативног стреса код болесника са манифестним
дијабетесом типа 2 и атеросклерозом**

- 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 докторанда

У Београду, **21.02.2013**



Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада**

Име и презиме аутора: **Ивана Грубиша**

Број уписа: **GC060072**

Студијски програм: **Биологија, модул Генетика**

Наслов рада: **Генетички маркери оксидативног стреса код болесника са манифестним дијабетесом типа 2 и атеросклерозом**

Ментор: **проф др Јелена Милашин, проф др Марина Стаменковић-Радак**

Потписани: **Ивана Грубиша**

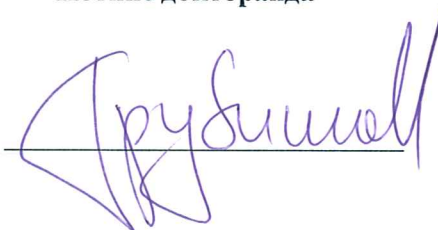
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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 докторанда

У Београду, **21.02.2013.**



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Генетички маркери оксидативног стреса код болесника са манифестним дијабетесом типа 2 и атеросклерозом

која је моје ауторско дело.

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

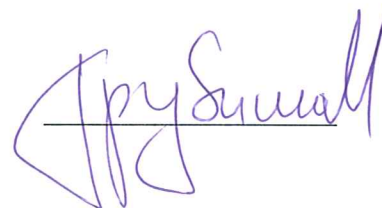
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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 докторанда

У Београду, **21.02.2013.**



1. Ауторство - Дозвољавате 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. Дозвољавате 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. Дозвољавате 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. Дозвољавате 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. Дозвољавате 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. Дозвољавате 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.