

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Jelica R. Pantelić

**ISPITIVANJE POLIMORFIZAMA eNOS  
GENA KAO FAKTORA RIZIKA ZA RAZVOJ  
RETINOPATIJE PREVREMENO  
ROĐENE DECE**

doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF MEDICINE

Jelica R. Pantelić

**INVESTIGATION OF eNOS GENE  
POLYMORPHISMS AS A RISK FACTORS FOR  
THE DEVELOPMENT OF RETINOPATHY OF  
PREMATURITY**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

**MENTOR:**

**Profesor dr Ivan Stefanović**

Klinika za očne bolesti – Klinički Centar Srbije, Beograd

Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

**KOMENTOR:**

**Docent dr Tatjana Damjanović**

Institut za humanu genetiku Medicinskog fakulteta, Beograd

Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

**ČLANOVI KOMISIJE:**

**Profesor dr Nataša Cerovac**

Klinika za neurologiju i psihijatriju za decu i omladinu, Beograd

Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Docent dr Biljana Jekić**

Institut za humanu genetiku Medicinskog fakulteta, Beograd

Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Profesor dr Ana Oros**

Klinika za očne bolesti – Klinički Centar Vojvodine, Novi Sad

Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

**Datum odbrane:** \_\_\_\_\_

**Iskreno i od srca se zahvaljujem:**

**Mentoru, profesoru dr Ivanu Stefanoviću**, koji je imao viziju, razumevanje, poverenje i omogućio mi da se bavim nadasve humanim poslom – oftalmološkim skriningom prevremeno rođene dece. Zahvaljujem mu se na podršci i bodrenju tokom izrade ovog rada;

**Komentoru, docentu dr Tatjani Damnjanović**, na izuzetnoj stručnoj pomoći, savetima, idejama i nesebičnom zalaganju. Veliko joj hvala na strpljenju, razumevanju i odvojenom vremenu;

**Profesorki dr Ani Oros** – mom učitelju, na zavidnom znanju i iskustvu, na svemu što me je naučila iz svoje bogate naučne i kliničke prakse. Zahvaljujem se na korisnim savetima i sugestijama prilikom pisanja doktorske disertacije;

**Svim kolegama, medicinskim sestrama i osoblju Odeljenja za neonatologiju Klinike za ginekologiju i akušerstvo KCS** na podršci i razumevanju;

**Osoblju Instituta za humanu genetiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu** na stručnoj pomoći u laboratorijskom radu;

**Majci** na bezuslovnoj ljubavi, pomoći i podršci

**Suprugu i deci** na razumevanju, strpljenju i ljubavi.

*Posvećeno Slobodanu, Vasiliju i Vukašinu*

## **ISPITIVANJE POLIMORFIZAMA eNOS GENA KAO FAKTORA RIZIKA ZA RAZVOJ RETINOPATIJE PREVREMENO ROĐENE DECE**

### **REZIME**

**Uvod:** Retinopatija prematuriteta (ROP) je oboljenje mrežnjače oka prevremeno rođene dece i osnovni je uzrok teškog oštećenja vida u detinjstvu. Genetička istraživanja ROP usmerena su ka otkrivanju varijanti gena odgovornih za razvoj teških formi ROP-a.

**Cilj** ove studije bio je da ispita učestalost genotipova i alela polimorfizama T-786C i 4a/4b gena za endotelnu azot oksid sintetazu (eNOS) u populaciji prevremeno rođene dece kao i povezanost ispitivanih polimorfni varijanti sa nastankom teškog stepena retinopatije. Takođe, cilj ove studije je ispitivanje kliničkih faktora rizika udruženih sa nastankom teškog stepena ROP-a.

**Metodologija:** Istraživanje je uključilo 239 prevremeno rođene dece. Na osnovu sprovedenog oftalmološkog skrininga prevremeno rođena deca su podeljena u dve grupe. ROP grupa je obuhvatila 113 dece kod kojih je stepen ROP-a zahtevao oftalmološku terapiju, a kontrolnu grupu činilo je 126 dece bez terapije. DNK je izolovana iz brisa bukalne sluznice prevremeno rođene dece a ispitivanje polimorfizama vršeno je PCR metodom.

**Rezultati:** Ispitivanje polimorfizma T-786C pokazalo je da je 39,1% dece homozigotno za češći alel T (genotip TT), 52,3% su heterozigoti (genotip CT) i 8,6% homozigoti za ređi alel C (genotip CC). Učestalost C alela je 34,8%. Učestalost genotipova T-786C polimorfizma u grupi sa ROP-om je: 40,0% TT genotipa, 51,7% CT genotipa i CC genotipa 8,3%. U kontrolnoj grupi učestalost TT genotipa je 38,2%, CT genotipa 52,9% i CC genotipa 8,8%. Učestalost C alela u ROP grupi je 34,2%, a 35,3% u kontrolnoj grupi. Ispitivanjem polimorfizma 4a/4b utvrđeno je da je 65,3% dece homozigotno za češći alel 4b (genotip bb), 31,2% su heterozigoti (genotip ab) i 3,5% homozigoti za ređi alel 4a (genotip aa). Učestalost 4a alela je 19,1%. Učestalost 4a/4b polimorfizma u grupi sa ROP-om je: genotipa 4bb 60,2%, genotipa 4ba 34,9% i 4aa genotipa 4,9%. U kontrolnoj grupi učestalost genotipa 4bb je 70,1%, genotipa 4ba 27,6% i 4aa genotipa 2,3%. Učestalost 4a alela u ROP grupi je 22,3%, a 16,1% u kontrolnoj grupi. Razlika u

učestalosti genotipova i alela eNOS T-786C i eNOS 4a/4b polimorfizama između ROP i kontrolne grupe nije statistički značajna.

Prevremeno rođena deca nosioci 4aa genotipa imaju nižu nedelju gestacije, telesnu masu i Apgar skor, a veći broj dana provedenih na terapiji O<sub>2</sub> u odnosu na decu koja imaju druge genotipove (4bb i 4ba). Srednje vrednosti NG ispitivane po recesivnom modelu se statistički značajno razlikuju, tj. nosioci 4aa genotipa imaju značajno niže srednje vrednosti NG nego nosioci 4bb i 4ba genotipa. Multivarijantna linearna regresiona analiza sa polom, TM i Apgar skorom kao kovarijatama nije pokazala asocijaciju 4a/4b genotipa sa vrednostima NG kod ispitivane prevremeno rođene dece. Multivarijantna regresiona analiza je pokazala da su nezavisni faktori rizika za razvoj ROP-a: niska nedelja gestacije, niska telesna masa na rođenju, pneumonija, sepsa, intraventrikularna hemoragija i nekrotični enterokolitis.

**Zaključak:** Kod prevremeno rođene dece u našoj sredini, T-786C i 4a/4b polimorfizmi eNOS gena ne predstavljaju faktor rizika za nastanak teške forme ROPa. Nezavisni faktori rizika za razvoj ROP-a su: niska nedelja gestacije, niska telesna masa na rođenju, pneumonija, sepsa, intraventrikularna hemoragija i nekrotični enterokolitis.

**KLJUČNE REČI:** retinopatija prevremeno rođene dece, T-786C polimorfizam, 4a/4b polimorfizam, eNOS gen

**NAUČNA OBLAST:** oftalmologija

**UŽA NAUČNA OBLAST:** humana genetika

**UDK:** 617.735-07-053.32:575(043.3)

## INVESTIGATION OF eNOS GENE POLYMORPHISMS AS A RISK FACTORS FOR THE DEVELOPMENT OF RETINOPATHY OF PREMATURITY

### ABSTRACT

**Introduction:** Retinopathy of prematurity (ROP) is a disease of the retina of premature infants and is the main cause of severe visual impairment in childhood. Genetic studies of ROP are directed towards to discovering variants of genes responsible for the development of severe forms of ROP.

**The aim** of this study was to determine the frequency of genotypes and allele of polymorphisms T-786C and 4a/4b genes for endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in the population of premature infants as well as the correlation between the polymorphic variants and the development of severe degree of retinopathy. The goal of this study was to evaluate clinical risk factors associated with the occurrence of severe degree of ROP.

**Methodology:** The study included 239 premature infants. On the basis of conducted ophthalmological screening premature infants were divided into two groups. ROP group consisted of 113 children in whom the degree of ROP demanded ophthalmological therapy, and the control group consisted of 126 children without therapy. DNA was isolated from the buccal mucosa swabs of premature infants and the examination of polymorphisms was performed by PCR method.

**Results:** Examination of T-786C polymorphism has shown that 39.1% of children are homozygous for common allele T (TT genotype), 52.3% are heterozygous (genotype CT) and 8.6% are homozygous for rare allele C (genotype CC) . The frequency of C allele is 34.8%. The frequency of genotypes T-786C polymorphism in the group with ROP is 40.0% TT genotype, 51.7% CT genotype and CC genotype 8.3%. In the control group the frequency of TT genotype is 38.2%, 52.9% CT genotype and CC genotype is 8.8%. The frequency of C allele in the ROP group is 34.2% and 35.3% in the control group. By examination of polymorphism 4a/4b we found that 65.3% of children are homozygous for common allele 4b (genotype bb), 31.2% are heterozygous (genotype ab) and 3.5% are homozygous for rare allele 4a (genotype aa). The frequency of 4a allele is 19.1%. The frequency of 4a/4b polymorphism in the ROP group is

4bb genotype 60.2%, 34.9% 4b genotype and genotype 4a 4.9%. In the control group, genotype frequency of 4bb is 70.1%, 27.6% 4b genotype and genotype 4a 2.3%. The frequency of allele 4a in the ROP group is 22.3% and 16.1% in the control group. The difference in the frequency of genotypes and alleles of eNOS T-786C and eNOS 4a/4b polymorphisms between the ROP and the control group is not statistically significant. Premature infants the carriers of 4aa genotype have a lower week of gestation, the body weight and Apgar score, a greater number of days spent on the O2 therapy compared to children who have other genotypes (4bb and 4ba). Mean values of the NG examined by recessive model are statistically significantly different, ie. 4aa genotype carriers had a significantly lower mean values than the NG holders of 4bb and 4ba genotype. Multivariate linear regression analysis to gender, TM and the Apgar score as covariates did not show an association of 4a/4b genotype with the values of NG in the examined premature infants. Multivariate regression analysis showed that the independent risk factors for the development of ROP are: low weeks of gestation, low birth weight, pneumonia, sepsis, intraventricular hemorrhage and necrotizing enterocolitis.

**Conclusion:** In preterm infants in our midst, T-786C and 4a/4b eNOS gene polymorphisms do not represent a risk factor for severe form of ROP. Independent risk factors for developing the ROP are: low weeks of gestation, low birth weight, pneumonia, sepsis, intraventricular hemorrhage and necrotizing enterocolitis.

**KEY WORDS:** Retinopathy of prematurity, T-786C polymorphism, 4a/b polymorphism, eNOS gene

**SCIENTIFIC AREA:** ophthalmology

**FIELD OF ACADEMIC EXPERTISE:** human genetics

**UDC:** 617.735-07-053.32:575(043.3)



# SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| <b>1. UVOD</b> .....  | 1  |
| 1.1 RETINOPATIJA PREVREMENO ROĐENE DECE .....   | 1  |
| 1.2 VASKULOGENEZA I ANGIOGENEZA RETINE .....  | 3  |
| 1.3 INTERNACIONALNA KLASIFIKACIJA ROP-ICROP .....   | 6  |
| 1.3.1 Agresivni posteriorni ROP – AP ROP .....  | 14 |
| 1.4 KLINIČKI FAKTORI RIZIKA ZA RAZVOJ ROP-a .....   | 16 |
| 1.5 GENETIČKI FAKTORI RIZIKA ZA RAZVOJ ROP-a .....  | 19 |
| 1.5.1 Polimorfizmi DNK – genski polimorfizmi .....  | 19 |
| 1.5.2 Uticaj polimorfizama u genu koji kodira VEGF<br>sa nastankom ROP .....  | 22 |
| 1.5.3 Uticaj polimorfizama u genu koji kodira IGF-1<br>sa nastankom ROP-a .....   | 23 |
| 1.5.4 Uticaj polimorfizama u genu koji kodira ACE<br>sa nastankom ROP-a .....   | 24 |
| 1.5.5 Nasledne monogenske bolesti koje u osnovi imaju retinopatiju .....  | 24 |
| 1.5.5.1 Uticaj mutacija u genima kandidatima za familijarnu<br>eksudativnu vitreoretinopatiju (FEVR) sa nastankom ROP-a ..... | 24 |
| 1.5.5.2 Uticaj mutacija u genu koji kodira protein za Norijevu<br>bolest sa nastankom ROP-a .....                             | 25 |
| 1.5.6 Uticaj polimorfizama u genu koji kodira eNOS sa<br>nastankom ROP-a .....  | 26 |
| 1.6 SKRINING PREMATURENE RETINOPATIJE.....  | 28 |
| 1.7 ISTORIЈAT LEČENJA ROP-a .....   | 31 |
| 1.7.1 Krio terapija.....  | 31 |
| 1.7.2 Laserfotokoagulacija retine (LFC).....  | 31 |
| 1.7.3 Anti VEGF (anti vascular endothelial grow factor) terapija.....   | 32 |
| 1.7.4 Hirurška terapija.....  | 34 |
| 1.7.5 Genska terapija .....   | 34 |
| <b>2. CILJEVI RADA</b> .....  | 36 |

|  |    |
|--|----|
| <b>3. METODOLOGIJA ISTRAŽIVANJA</b> .....                            | 37 |
| 3.1 UZORAK ISPITANIKA .....  | 37 |
| 3.2 MOLEKULARNO-GETIČKA ISTRAŽIVANJA.....                            | 39 |
| 3.2.1 Izolacija DNK iz bukalne sluznice prevremeno rođene dece ..... | 39 |
| 3.2.2 Reakcija lančane polimerizacije – PCR .....                    | 40 |
| 3.2.3 Analiza polimorfizama T-786C gena za eNOS .....                | 41 |
| 3.2.4 Analiza polimorfizama 4a/4b gena za eNOS .....                 | 42 |
| 3.3 KLINIČKA ISPITIVANJA .....                                       | 43 |
| 3.4 STATISTIČKA ANALIZA.....   | 44 |
| <b>4. REZULTATI</b> .....  | 46 |
| 4.1 REZULTATI GENETIČKIH ANALIZA .....                               | 50 |
| 4.2 REZULTATI KLINIČKIH FAKTORA RIZIKA .....                         | 59 |
| <b>5. DISKUSIJA</b> .....  | 69 |
| <b>6. ZAKLJUČCI</b> .....  | 87 |
| <b>7. LITERATURA</b> .....   | 89 |

# 1. UVOD

## 1.1 RETINOPATIJA PREVREMENO ROĐENE DECE

Retinopatija prevremeno rođene dece (Retinopathy of prematurity-ROP), ranije nazivana retrolentalna fibroplazija (RLF), predstavlja oboljenje mrežnjače oka. U osnovi ROP predstavlja razvojni vaskularni proliferativni poremećaj koji se javlja kod nepotpuno vaskularizovane mrežnjače prevremeno rođene dece. Javlja se u više razvojnih faza. Retrolentalna fibroplazija je završni stadijum oboljenja i predstavlja ožiljnu organizaciju retine i staklastog tela, sa njihovom potpunom destrukcijom, što se manifestuje slepilom. Sam termin retrolentalna fibroplazija zadržan je kao patohistološka dijagnoza samo za najteži stepen ROP-a (1).

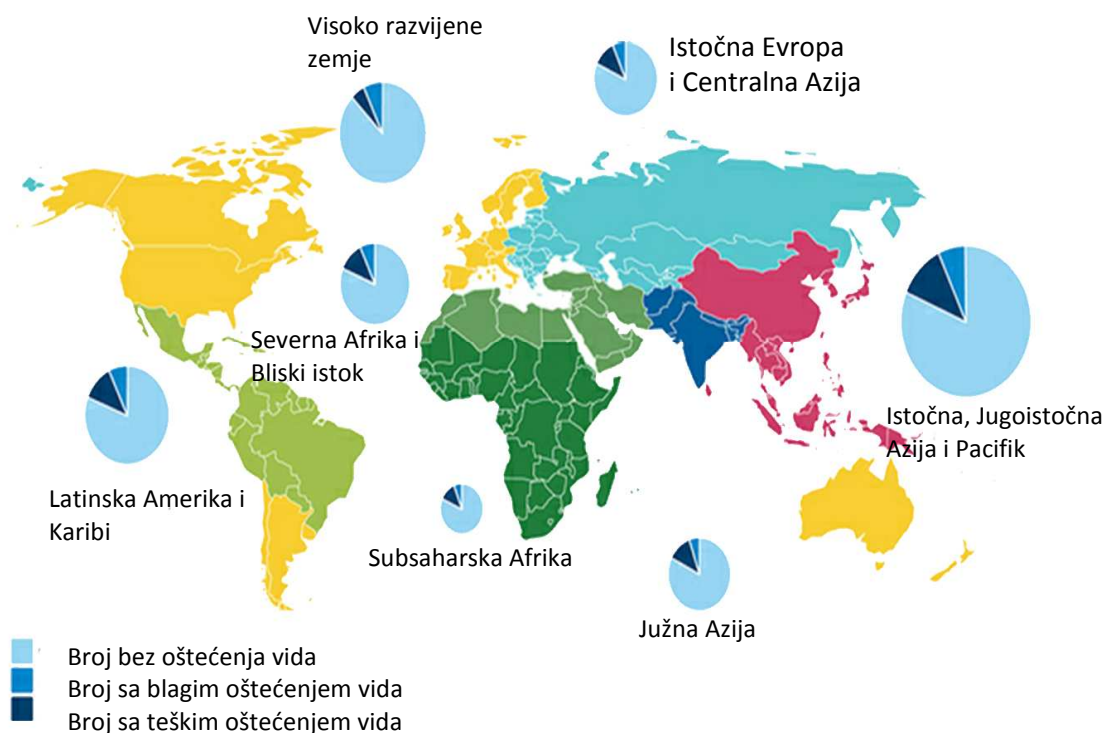
Oboljenje zahvata mrežnjaču u toku njenog razvoja i manifestuje se prestankom razvoja normalnih krvnih sudova sa pojavom proliferativne retinopatije. Prvi put retrolentalnu fibroplaziju opisuju 1942. godine Terry i saradnici i ukazuju na povezanost ovog poremećaja sa prevremenim rođenjem deteta. Uvođenje dodatnog kiseonika u lečenju prevremeno rođene dece počelo se povezivati sa pojavom retrolentalne fibroplazije (1).

Ashton i njegovi sledbenici su izneli mehanizam patogeneze retrolentalne fibroplazije na studijama animalnih modela (2). Eksperimenti su sprovedeni kod novorođenih jedinki sa nedovoljno vaskularizovanom retinom. Eksperimentalni radovi Ashtona i Petza kombinovani sa kliničkim studijama Kinsey-a pokazuju povezanost između upotrebe visokih doza kiseonika i razvoja retrolentalne fibroplazije (2,3). Izlaganje visokim dozama kiseonika, kod novorođenih životinja dovodi do razvoja retinopatije sa promenama na krvnim sudovima, poznate pod nazivom kiseonikom indukovana retinopatija (Oxygen induced retinopathy OIR) (4). Visoke doze kiseonika dovode do vazoobliteracije krvnih sudova koji se razvijaju. Prelazak na sobno okruženje, što predstavlja uslove relativne hipoksije, praćen je vazoproliferativnim odgovorom i fibrozom (5). Sličan model za formiranje retinopatije prihvaćen je i kod prematurusa (5,6).

Početak pedesetih godina dvadesetog veka, kiseonik je prepoznat kao glavni uzrok retrolentalne fibroplazije i njegova upotreba je bila vrlo smanjena. Ovo je dovelo do značajnog smanjenja incidence slepila, a s druge strane, imalo je za posledicu visoku incidencu sistemskih posledica kod prematurusa sa visokim morbiditetom (1). Uvođenjem monitoringa nivoa gasova u krvi tokom sedamdesetih godina, omogućeno je bolje dokumentovanje i sagledavanje potreba za kiseonikom. Opšte stanje prematurusa je indikacija za terapiju kiseonikom (7). Činjenica da i uz dobar monitoring kiseonika ROP perzistira, navodi na ispitivanje uticaja drugih faktora koji učestvuju u razvoju ROP-a i mogućnost postojanja drugih faktora rizika.

Umesto naziva retrolentalna fibroplazija uvodi se naziv retinopatija prematuriteta (retinopathy of prematurity – ROP). Do tada se verovalo da je retrolentalna fibroplazija kongenitalna bolest (8). Prematurna retinopatija je proces koji se razvija u vremenu koje sledi posle prevremenog rođenja. Klinički se manifestuje između 32 i 42 nedelje gestacije (NG). Tokom tog perioda bolest počinje, razvija se i završava ostavljajući trajne posledice. Ključnu ulogu u otkrivanju i lečenju ROPa ima pravovremeni oftalmološki skrining. ROP je najraniji i najčešći uzrok oštećenja vida u dečijem uzrastu i vodeći uzrok slepila u razvijenim zemljama širom sveta. U 2010. godini oko 184700 (169600-214500) prevremeno rođene dece je razvilo neki oblik ROP-a. Od te dece 20000 (15500-27200) je slepo ili ima teško oštećenje vida zbog ROP-a, a 12300 (8300-18400) ima lakše ili srednje oštećenje vida. U zemljama u razvoju 65% prevremeno rođene dece ima neki oblik oštećenja vida, a 6,2% dece je rođeno posle 32 nedelje gestacije (9).

Nedovoljno razvijena i ne svuda dostupna neonatalna nega, nekritična upotreba kiseonika u terapiji, nemogućnost sprovođenja oftalmološkog skrininga i nedostupnost terapijskih metoda samo su neki od uzroka ROP-a. ROP je problem u svim zemljama sveta i neophodno je da se u njegovo rešavanje uključi šira društvena zajednica.



**Slika 1.** Prikaz oštećenja vida dece u svetu kao poledica ROP-a

(preuzeto i prilagođeno Preterm-associated visual impairment and estimates of retinopathy of prematurity at regional and global levels for 2010.)

## 1.2 VASKULOGENEZA I ANGIOGENEZA RETINE

Tokom ranog embrionalnog razvoja retina se transformiše od jednog sloja nediferentovanih neuralnih ćelija u slojevito organizovanu strukturu (10). Istovremeno sa sazrevanjem nervnih elemenata, razvija se vaskularna mreža retine u složeno vaskularno stablo koje odgovara metaboličkim potrebama retine. Razvoj vaskularne mreže retine obuhvata vaskulogenezu i angiogenezu.

Tokom procesa vaskulogeneze nastaju de novo formacije primordijalnih krvnih sudova centralne dve trećine retine (10). Proces vaskulogeneze retine započinje u 16 nedelji gestacije (NG) rastom ćelija mezenhimalnog tkiva iz hijaloidnog vaskularnog sistema u predelu papile očnog živca, prostirući se u vidu useka po površini retine prema periferiji. Mezenhimalne ćelije imaju ulogu prekursora ćelija vaskularnog endotela, koji se remodelira stvarajući kapilare, arterije i vene. Formiranje preostalih retinalnih krvnih

sudova se odvija procesom angiogeneze, prorastanjem od početno stvorenih krvnih sudova ka periferiji (11,12).

Normalna angiogeneza u nazalnom delu postiže se u 36 NG, a u temporalnom delu između 39 i 41 NG i indukovana je prisustvom brojnih faktora koji se sintetišu u uslovima fiziološke hipoksije (faza zavisna od vaskularnog endotelnog faktora rasta – VEGF). Kod prevremeno rođenih beba angiogeneza retine nije završena pa se ovaj proces nastavlja nakon rođenja. Tokom postnatalnog sazrevanja krvnih sudova retine postoji rizik za nastanak ROP-a. Proces premature retinopatije prolazi kroz dve faze:

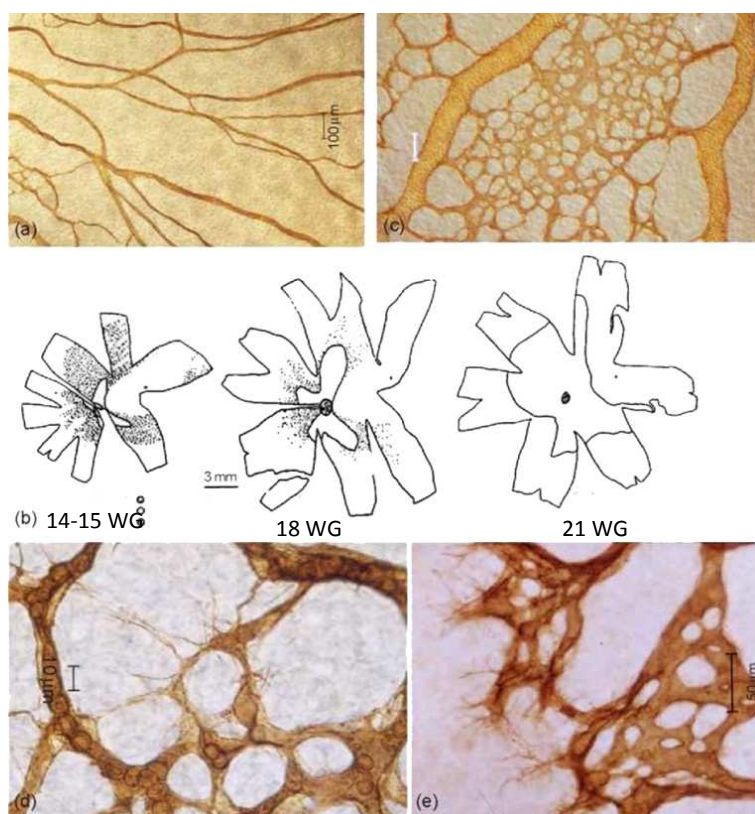
I faza: široke zone periferne avaskularne retine dovode do retinalne hipoksije

II faza: ishemična retina produkuje angiogene faktore, što za posledicu ima neovaskularizaciju na granici vaskularizovane i avaskularne retine. Ova novoformirana neovaskularizacija predstavlja mezenhimalni arteriovenski šant koji je patognomonična lezija premature retinopatije. U uslovima ishemije proliferacija brzo napreduje, vrši trakciju na retinu i proces se završava trakcionom ablacijom retine (13).

Rodenje predstavlja prelazak iz relativno hipoksične sredine uterusa u sredinu bogatu kiseonikom. Ako se neovaskularizovana retina izloži visokim dozama kiseonika, može se javiti vazokonstrikcija. Relativna hiperoksija uzrokuje sniženje nivoa VEGF i supresiju vaskularnog razvoja. Smanjenje nivoa VEGF vodi vazoobliteraciji. Periferna avaskularna retina postaje hipoksična i stvaraju se ishemijske zone. Kao odgovor imamo povećanu produkciju VEGF-a i stvaranje neovaskularizacije koja uključuje prorastanje krvnih sudova u staklasto telo, tj. proliferativnu retinopatiju (13). Ako produkcija faktora rasta perzistira, proces premature retinopatije napreduje. Ako VEGF opada, dolazi do regresije ROPa. Bitno je napomenuti i ulogu insulinu sličnog faktora rasta (IGF-Insulin growth factor). Kada se posle rođenja prematurusa koncentracija IGF-I podigne, omogućava se normalan vaskularni odgovor i ne dolazi do razvoja ROP-a. Naime vaskularizacija se normalno razvija jer se VEGF ne može akumulirati. Krvni sudovi obezbeđuju dopremanje kiseonika za retinu u razvoju i time se uspostavlja kontrola produkcije VEGF-a (11,12,13).

Fiziološki, angiogeneza je precizno regulisana, ili u suprotnom dovodi do proliferativne retinopatije. VEGF je snažan i osnovni pokretač angiogeneze. Ekspresija VEGF gena je regulisana različitim faktorima. Hipoksija je jedan od najmoćnijih pokretača

VEGF ekspresije. Hipoksija inducibilni faktor 1 (HIF-1) je ključni transkripcijski faktor u ushodnoj regulaciji VEGF gena posredovanoj hipoksijom. Azot oksid (NO) kao i hipoksija ushodno reguliše ekspresiju VEGF gena povećanjem HIF-1 aktivnost (14). Protein kinaza B (PKB) put može biti uključen u NO posredovanu HIF-1 aktivaciju u ograničenim ćelijskim linijama. Postoje neki izveštaji o inhibitornim efektima NO na HIF-1 i VEGF aktivnosti. Ovi oprečni podaci o efektu NO mogu se uglavnom pripisati količini oslobođenog NO. Azot monoksid može uticati na povećanje ili smanjenje ekspresije VEGF gena u istim uslovima u zavisnosti od koncentracije. VEGF posredovana angiogeneza zahteva proizvodnju NO posredstvom aktivirane endotelijalne azot oksid sintaze (eNOS). Aktivacija eNOS obuhvata nekoliko puteva uključujući PKB, Ca(2+)/kaldmodulin i protein kinazu C. VEGF ekspresija posredovana NO može biti regulisana aktivnošću HIF-1, hem oksigenaze 1 (HO-1) i VEGF posredovana produkcija NO eNOS-om zavisno od količine proizvedenog NO. Ovi uzajamni odnosi između NO i VEGF mogu da doprinesu regulisanju angiogeneze i u normalnim tkivima (14).



**Slika 2.** Vaskularizacija humane fetalne retine

(preuzeto Hughes S, Yang H, and Chan-Ling T. Investigative Ophthalmology and Visual Science 2000)

### **1.3 INTERNACIONALNA KLASIFIKACIJA ROP – ICROP (International Classification for Rethinopathy of Prematurity)**

Razvojem jedinstvene klasifikacije po anatomskim karakteristikama, kao što je Međunarodna klasifikacija premature retinopatije – International Classification for Retinopathy of Prematurity – (ICROP) 1984. godine omogućeno je da budu ujednačeni kriterijumi praćenja, dijagnostika aktivne forme retinopatije, pravovremeno lečenje i praćenje rezultata lečenja (15).

Ova klasifikacija obuhvata tri parametra:

- **Lokalizacija** (zona) procesa na retini
- **Proširenost** (broj sati) patološki izmenjene vaskularizacije
- **Ozbiljnost** i težina (stadijum) patološki izmenjene vaskularizacije

#### **1. Lokalizaciju procesa na retini po zonama (1, 2 i 3)**

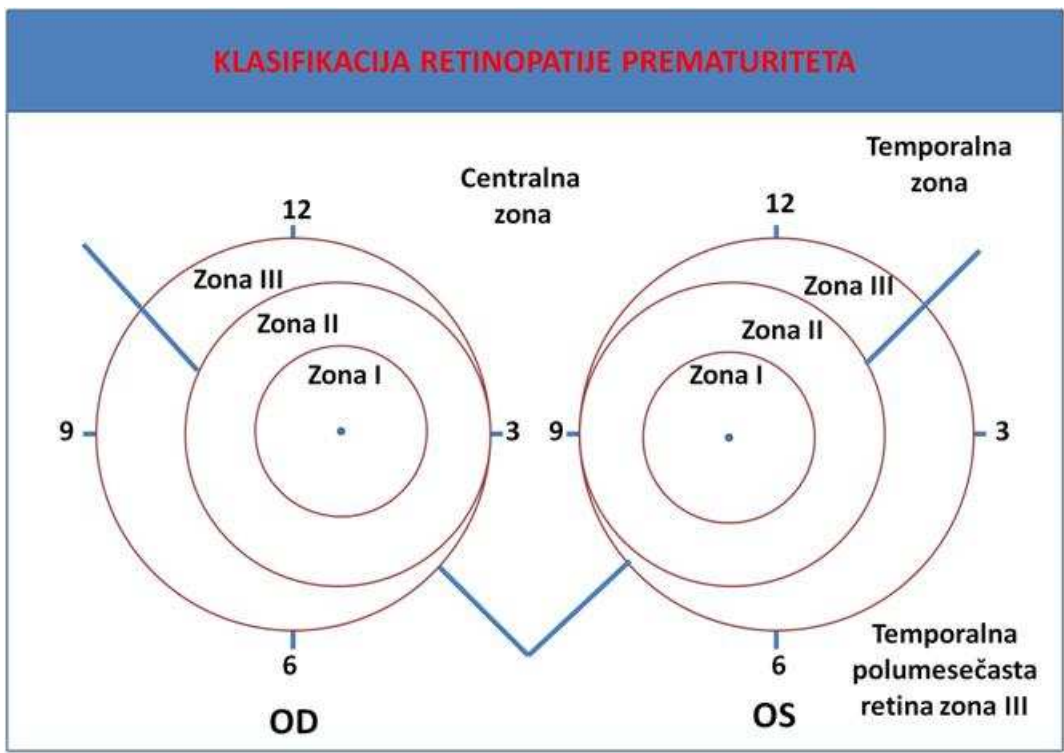
Zona se definiše prema najposterornijem položaju procesa.

**Zona 1**, (zadnji pol) predstavlja zonu kruga sa centrom na papili vidnog živca, sa poluprečnikom dve dužine distance papila – makula. Ovo znači da su se krvni sudovi razvili na toj površini retine, a na njihovim krajevima započinje patološki proces, što ostavlja široku zonu periferne retine ishemičnom.

**Zona 2**, poluprečnik do zupčaste linije nazalno, znači pomeranje patološkog procesa dalje od zadnjeg pola, sa užom površinom ishemične retine.

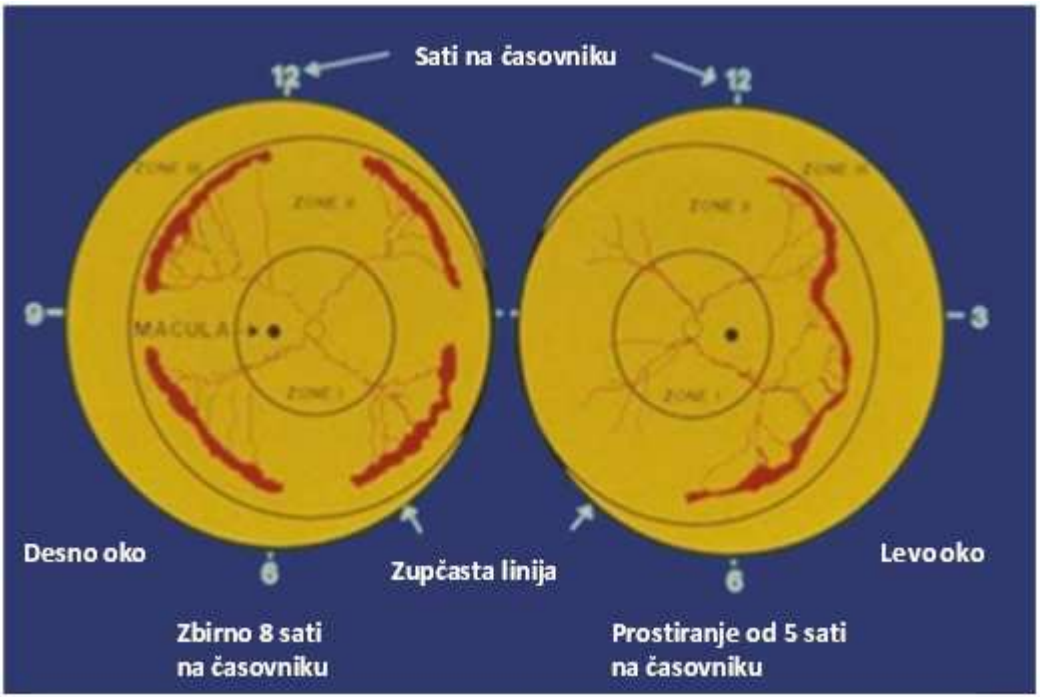
**Zona 3**, sa lokalizacijom samo temporalno, predstavlja po težini najlakšu varijantu.





Slika 3. Šema retine po zonama

Proširenost ili lučno prostiranje, obeležava se brojem sati. Kao kritična vrednost se uzima zahvaćenost retine od pet sati.

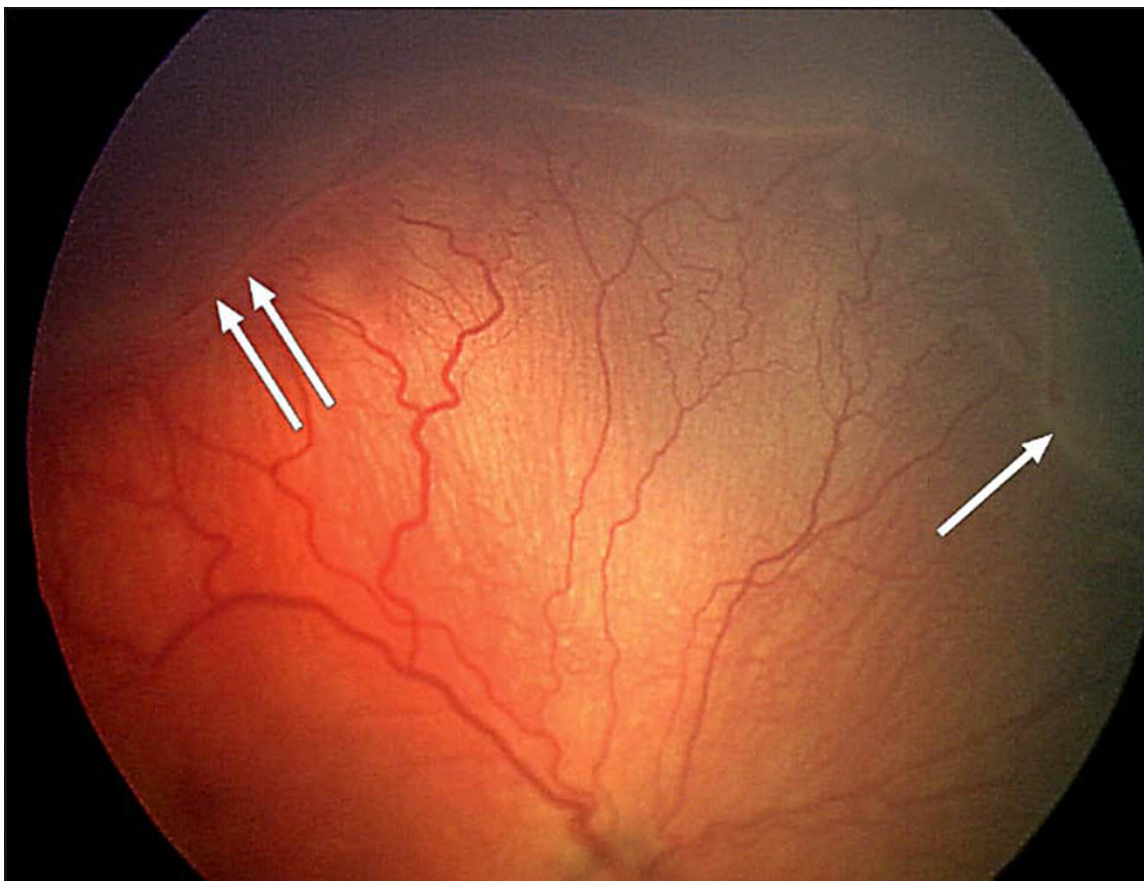


Slika 4. Proširenost patološki izmenjene vaskularizacije

## 1. Stadijum patološki izmenjene vaskularizacije (1-5)

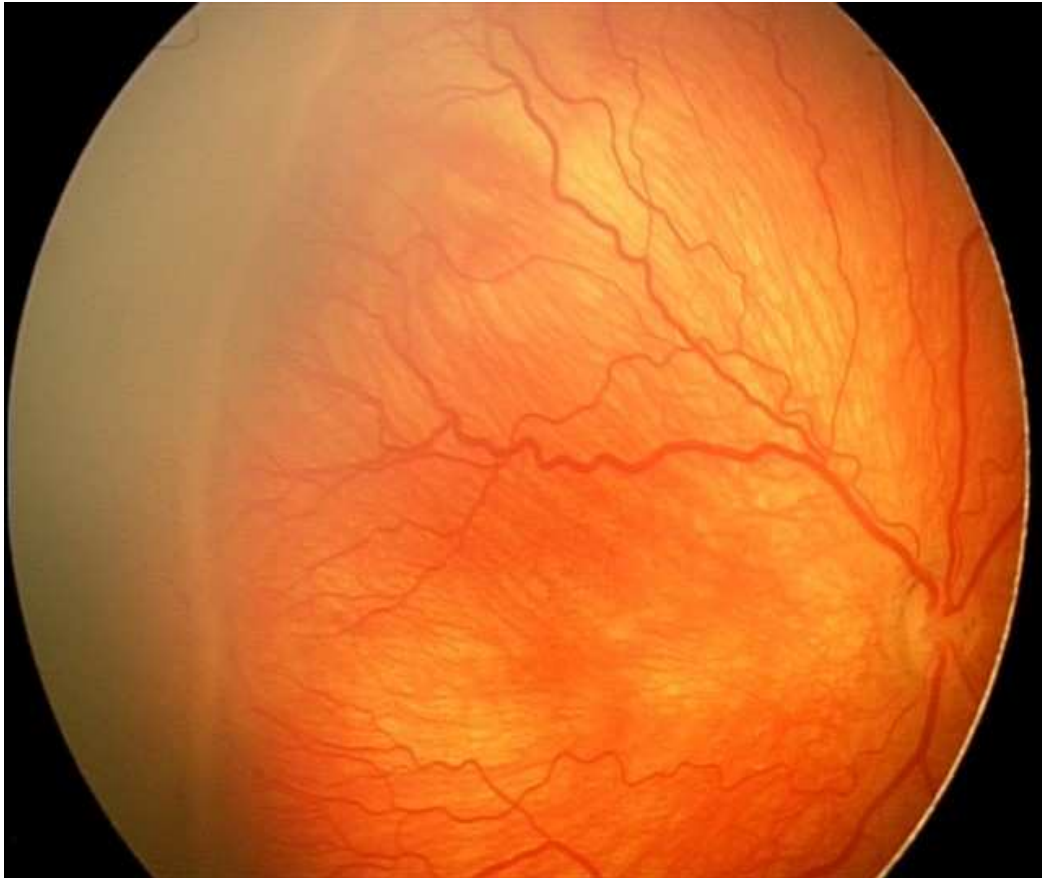
Ozbiljnost bolesti se opisuje u stadijumima:

**Stadijum 1** – ROP1 (demarkaciona linija): prvi znak je razvoj tanke linije koja razdvaja avaskularnu nezrelu perifernu retinu od vaskularizovane retine zadnjeg pola

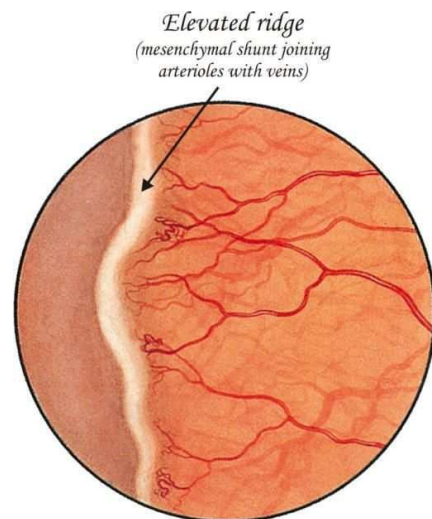
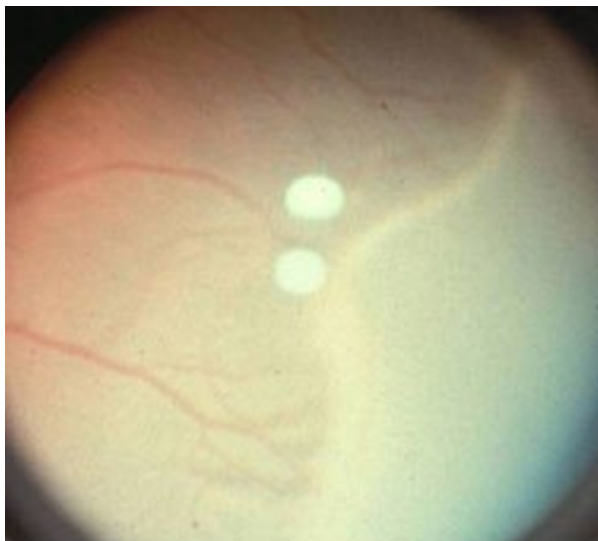


**Slika 5.** ROP 1 – demarkaciona linija (medicinska dokumentacija)

**Stadijum 2** – ROP2 (greben): razvijanje demarkacione linije u izdignuti greben koji predstavlja mezenhimni šant između arteriola i venula.

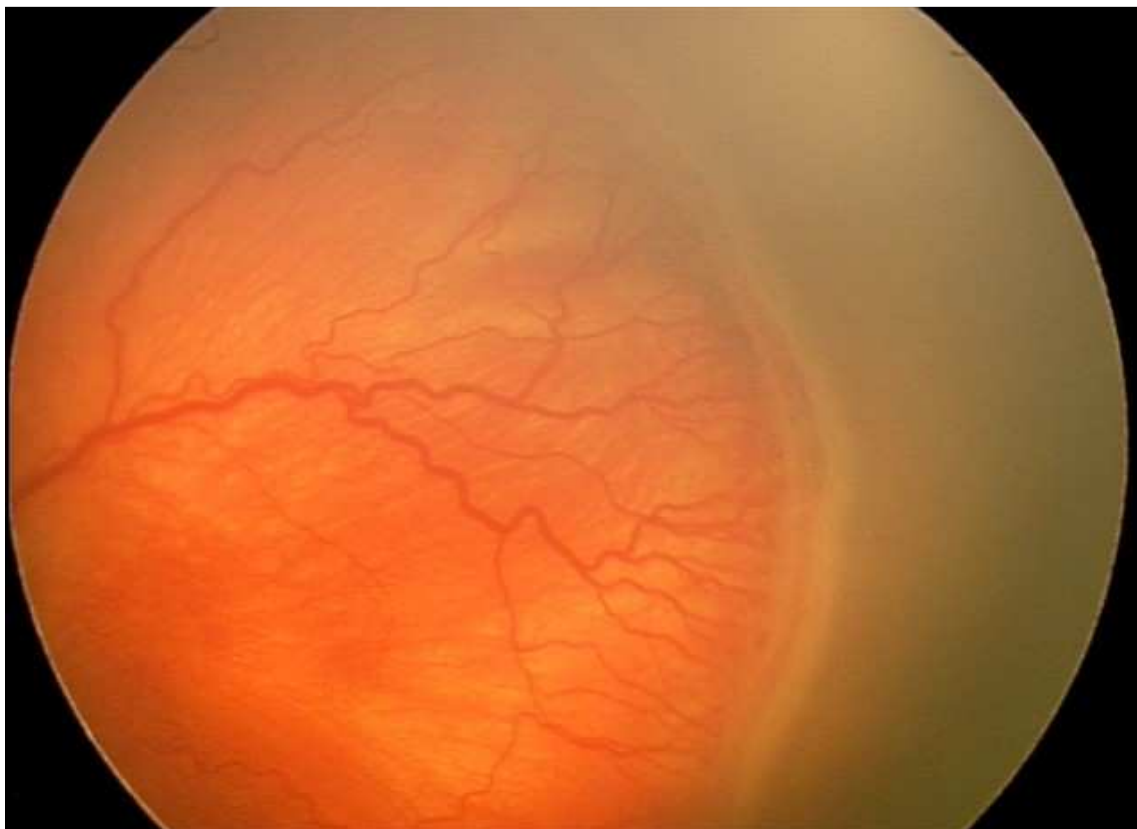


**Slika 6.** ROP 2- greben (medicinska dokumentacija)

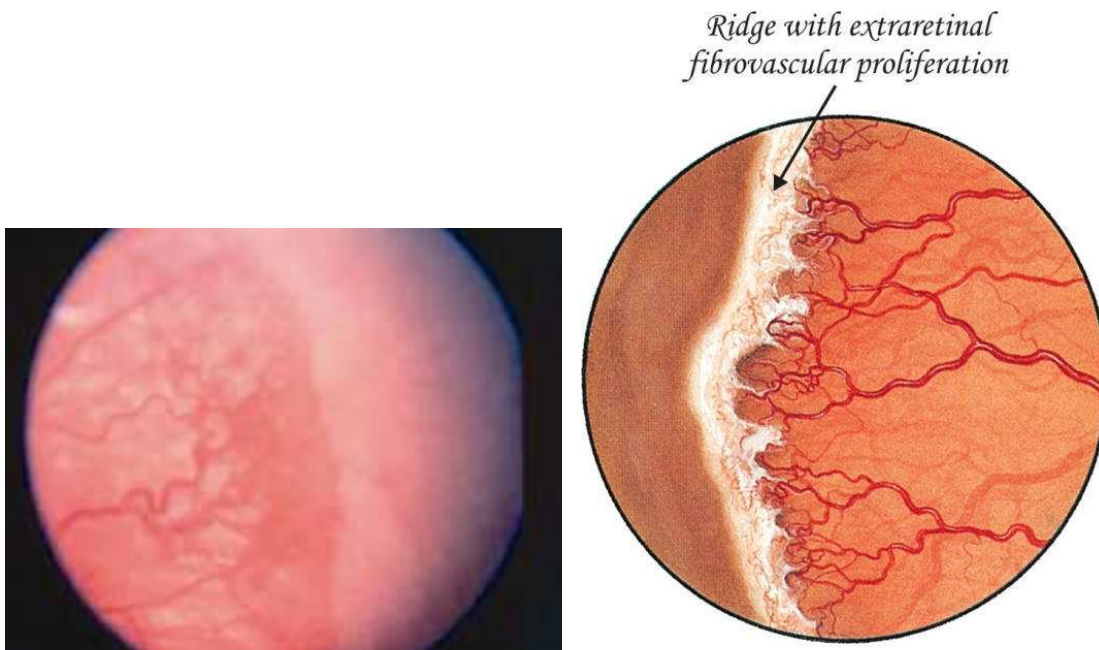


**Slika 1.6** Stadijum 2. ROP-greben  
(preuzeto i prilagođeno Sonali M. Retinopathy Of Prematurity. Healthcare. 2015.)

**Stadijum 3** – ROP3 (greben sa ekstraretinalnom fibrovaskularnom proliferacijom)  
Napredovanjem bolesti greben dobija ružičastu boju usled fibrovaskularne proliferacije, koja napreduje po površini retine i ulazi u vitreus. Retinalne hemoragije su česte, kao i krvarenje u staklasto telo.



**Slika 7.** ROP III-Greben sa fibrovaskularnom proliferacijom (medicinska dokumentacija)



**Slika 7-1. Stadijum 3. ROP-greben sa fibrovaskularnom proliferacijom**  
 (preuzeto i prilagođeno Sonali M. Retinopathy Of Prematurity. Healthcare. 2015.)

Kada se ovim promenama pridruži proširenje vena i pojačana izvijuganost arterija, promene se definišu kao znak plus - plus disease (16).

U Cryo-ROP studiji **“threshold disease”** se definiše stadijum ROP 3+ sa lokalizacijom u zoni I ili II gde se promene prostiru kontinuirano u luku 5 h, ili zbirno 8 h (17).

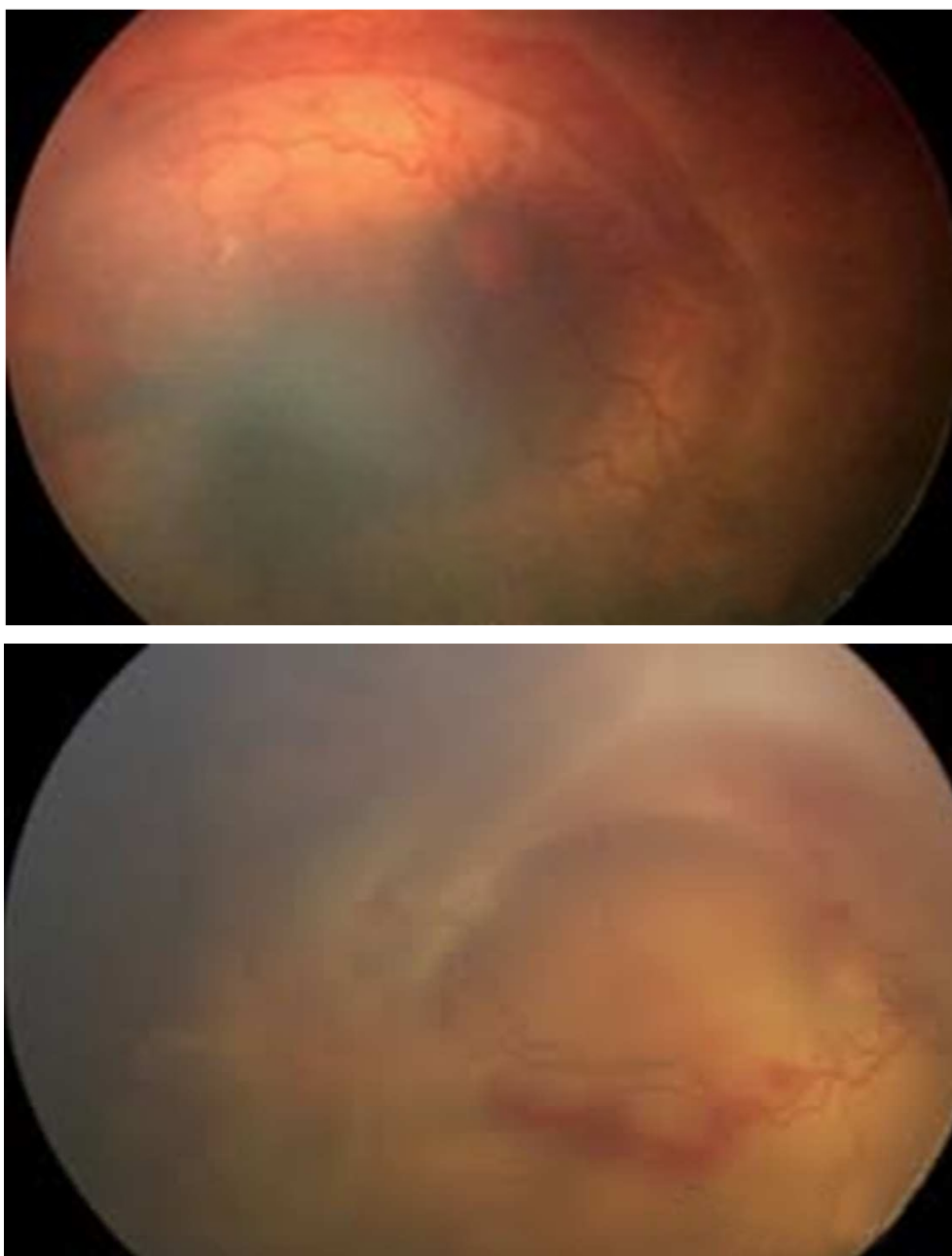
**“Prethreshold disease”** predstavlja formu ROP kada je ispunjen barem jedan kriterijum od sledećih:

- sama po sebi lokalizacija zone I, zona II i
- stadijum ROP 2+ ili ROP 3 bez plus fenomena, ili
- 3+ u manjem sektoru (18,19).

**Stadijum 4** – (subtotalna ablacija retine): ablacija retine koja počinje na krajnjoj periferiji i širi se centralno

4-a: zahvata makulu

4-b: ne zahvata makulu

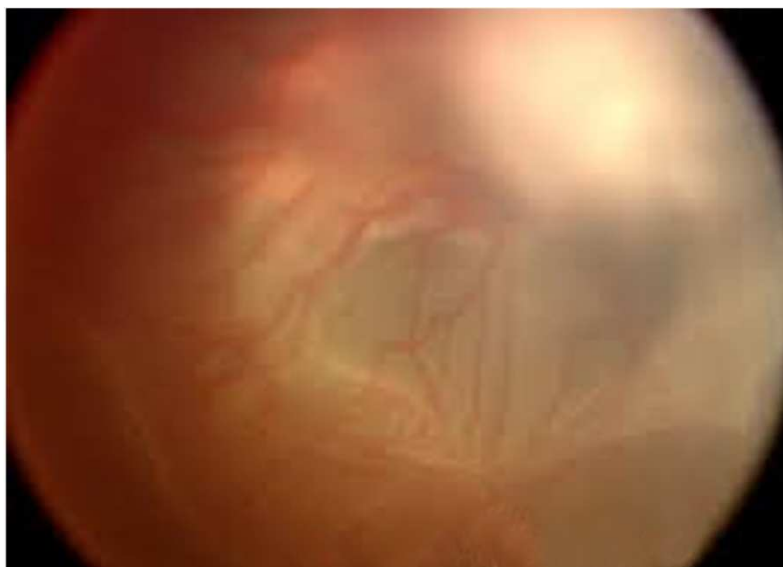


**Slika 8. Stadijum 4a i 4b ROP – subtotalna ablacija retine**  
(preuzeto i prilagođeno Kuschel C, Dai S. Retinopathy Of Prematurity. Newborn Services Clinical Guideline. 2007.)



**Slika 9.** ROP 5 – totalna ablacija retine prikazana ehografski (medicinska dokumentacija)

e) **Stadijum 5** – totalna ablacija retine.



**Slika 9-1.** Stadijum 5 ROP-totalna ablacija retine  
(preuzeto i prilagođeno Kuschel C, Dai S. Retinopathy Of Prematurity. Newborn Services Clinical  
Guideline. 2007.)

### 1.3.1 AGRESIVNI POSTERIORNI ROP – AP ROP

Naglo progresivna retinopatija zadnjeg pola jeste entitet koji je uveden u Internacionalnu klasifikaciju premature retinopatije tokom revizije 2005. godine (20). Ovaj poseban entitet definiše izrazitu izvijuganost arterijskih i dilataciju venskih krvnih sudova u zoni I u sva četiri kvadranta. Osnovna karakteristika uz ovu morfologiju i lokalizaciju, jeste da ne prolazi kroz klasične stadijume – prvi, drugi, treći, već direktno nastaje ablacija mrežnjače sa snažnom trakcijom staklastog tela. Ovaj oblik ROPa sreće se kod najnezrelije dece. Pojavljuje se ranije nego klasičan oblik, već posle treće nedelje postnatalnog perioda. Ova najagresivnija i najteža forma premature retinopatije zahteva urgentan tretman. I dalje ovi oblici predstavljaju osnovni uzrok vitreoretinalnoj trakciji, sa teškom posledicom gubitka potencijala funkcije vida (13,19).

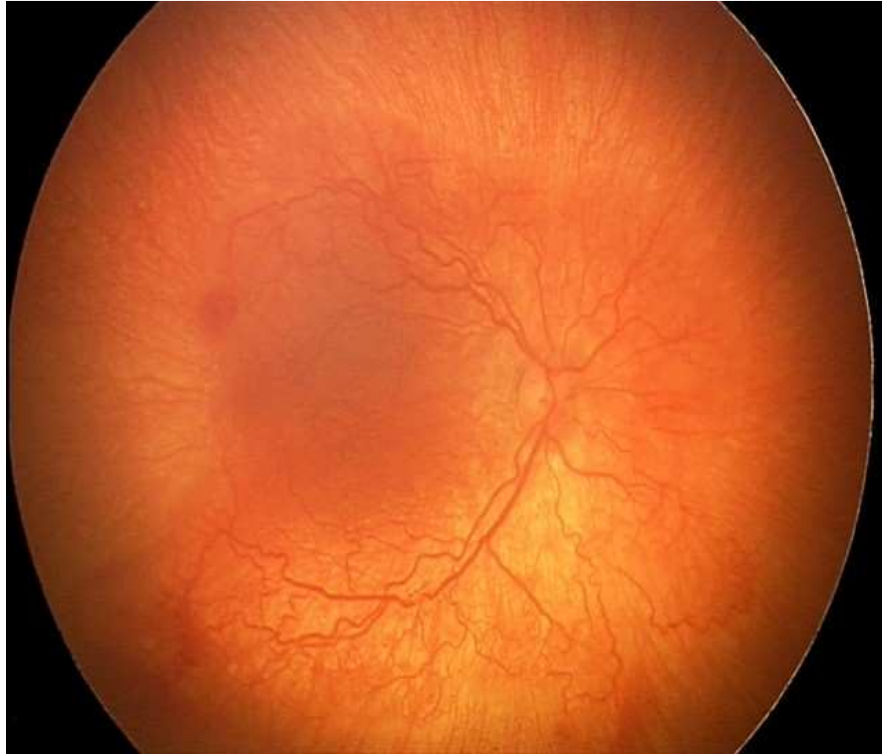
U cilju otkrivanja aktivnih oblika retinopatije, dokumentovanja, praćenja rezultata lečenja od 2011. godine u našoj zemlji (Institut za neonatologiju) postoji najsavremenija Ret Cam. Od tog perioda na Institutu za neonatologiju postoji opsežna dokumentacija praćenja svih lečenih pacijenata od ROPa u našoj zemlji.



**Slika 10.** Ret Cam 3

(Clarity, USA-Institut za neonatologiju, Bg, Septembar 2011.)





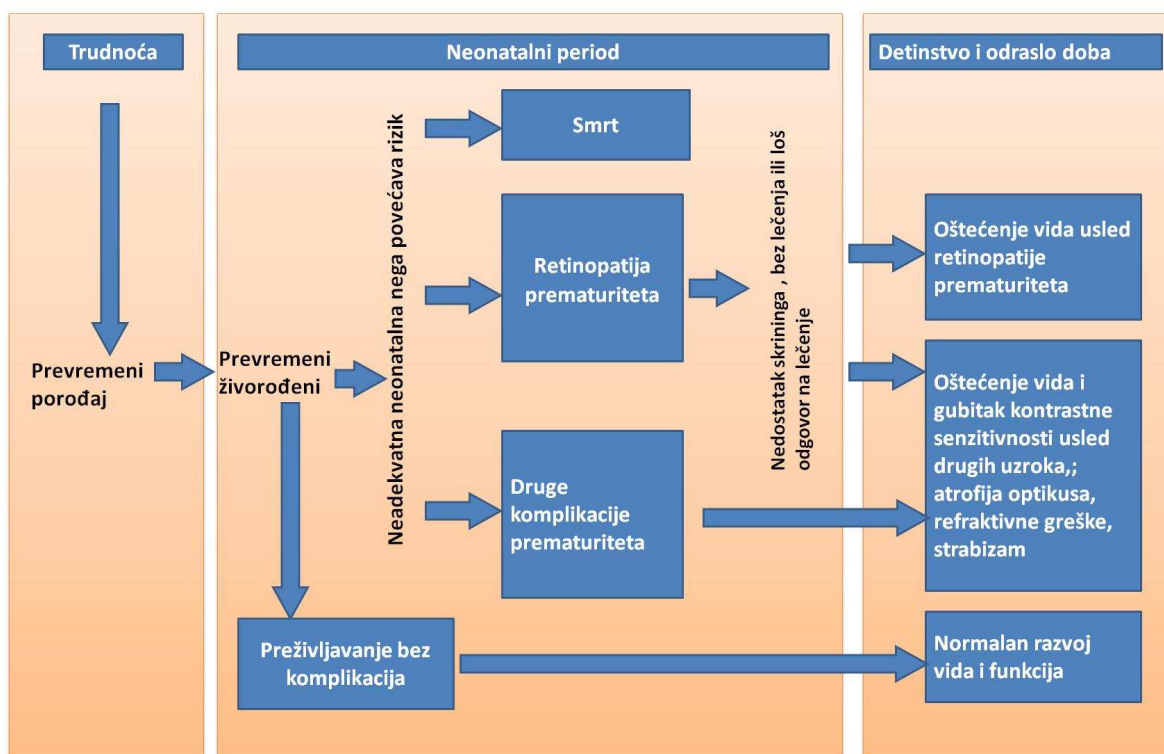
**Slika 11. Red Cam – AP ROP (medicinska dokumentacija)**



**Slika 12. Red Cam – sedam dana nakon laser fotokoagulacije (LFC) -medicinska dokumentacija**

## 1.4 KLINIČKI FAKTORI RIZIKA ZA RAZVOJ ROP-a

Faktori koji usporavaju ili onemogućuju normalan razvoj vaskularizacije retine kod prevremeno rođene dece su brojni, međusobno se kombinuju i dopunjuju. Osnovni zadatak neonatologa i oftalmologa je da se obezbedi adekvatna neonatalna nega, sprovede pravovremeni skrining i terapija aktivnih oblika ROP-a kako bi se obezbedili uslovi za pravilan razvoj vida.



**Slika 13.** Šema uzroka oštećenja vida prevremeno rođene dece

Na slici su prikazani mogući uzroci oštećenja vida kao posledica prevremenog rođenja. Neophodno je naglasiti da ROP nije jedini krivac oštećenja vida prevremeno rođene dece. Značajnu ulogu igraju oštećenja centralnog nervnog sistema, atrofija optikusa, strabizam i refrakcione anomalije.

Dominantni faktori rizika za razvoj ROP-a su parametri nezrelosti zadati rođenjem kao što su: niska porođajna telesna masa (manja od 1500g, posebno ispod 1250g), niska nedelja gestacije (manja od 32 NG), parametri opšteg zdravstvenog stanja i

oštećenja CNS-a (21,22). Pored toga sepsa, visoke koncentracije terapijskog kiseonika, broj transfuzija, respiratorne bolesti, parametri lečenja kao i genetski faktori značajni su faktori rizika (23,24,25).

U različitim zemljama odrednice za skrining u odnosu na telesnu masu i nedelju gestacije su različite. Tako su nedavno objavljeni rezultati istraživanja na američkoj populaciji prevremeno rođene dece na osnovu kojih telesna masa manja od 1500g predstavlja jasnu indikaciju za isključivanje dijagnoze ROP-a ukoliko je gestaciona starost na rođenju punih 30 ili više nedelja (25). U pomenutom istraživanju 0,5% dece izvan gore pomenutih kriterijuma je zahtevalo primenu terapije zbog ROP-a (25).

Međutim, na osnovu analiza kliničkih karakteristika i faktori rizika za ROP kod korejske odojčadi sa telesnom masom na rođenju većom od 1500g uočena je totalna incidenca ROP-a od 11,94%, a ROP koji je zahtevao lečenje detektovan je kod 3,98% slučajeva (26). Totalno trajanje oksigenoterapije, upotreba surfaktanta, respiratorni distres sindrom, bronhopulmonalna displazija i upotreba antibiotika duže od 14 dana značajno su povećali rizik za razvoj ROP-a koji zahteva oftalmološko lečenje. Ova studija je potvrdila da se ROP koji zahteva dalje lečenje u azijskoj populaciji javlja i kod dece sa telesnom masom na rođenju većom od 1500g. Da bi se izbegla mogućnost propusta težih oblika ROP-a kod prevremeno rođene dece sa većom telesnom masom na rođenju, potrebna su dodatna istraživanja na većim uzorcima kako bi se mogle korigovati smernice u odgovarajućim vodičima (26).

Terapijska primena kiseonika u lečenju prevremeno rođene dece je značajan faktor rizika za pojavu ROP-a (27). Indikacija za terapiju kiseonikom je opšte stanje prematurusa. Eksperimenti na novorođenim životinjama ukazuju da izlaganje visokim dozama kiseonika dovodi do razvoja retinopatije sa promenama na krvnim sudovima – kiseonikom indukovana retinopatija (4). Visoke doze kiseonika dovode do vazoobliteracije krvnih sudova u razvoju (5). Prelazak na sobno okruženje, što predstavlja uslove relativne hipoksije, praćen je vazoproliferativnim odgovorom i fibrozom (11,27).

Enomoto i sar. ispitivali su faktore rizika novorođenčadi sa nedeljom gestacije ispod 32 (28). Nedelja gestacije, telesna masa na rođenju, dužina trajanja terapije kiseonikom, dužina trajanja pozitivnog pritiska kiseonika i maksimalna frakcija zasićenosti kiseonika ( $FiO_2$ ) pokazali su značajnu povezanost sa razvojem teškog oblika

ROP-a u univarijantnoj analizi. U multivarijantnoj analizi dužina trajanja oksigenoterapije i  $FiO_2$  pokazali su se kao značajni faktori rizika povezani sa nastankom teškog oblika ROP-a (28).

Kao poseban faktor rizika za nastanak ROP-a kod prevremeno rođene dece navodi se i razvoj neonatalne sepse. Tolsma i sar. pratili su i ispitivali ranu i kasnu bakterijemiju kod prevremeno rođene dece sa ROP-om rođene u 28 NG i pre (29). Novorođenčad su podeljena u grupe sa ranom (postnatalna prva nedelja), sa kasnom (od 2 do 4 nedelje) bakterijemijom, sa definitivnom (kulturom potvrđenom) bakterijemijom i sa pretpostavljenom (antibiotici korišteni više od 72 h uprkos negativnoj krvnoj kulturi) bakterijemijom. Uočili su da je definitivna (kulturom potvrđena) bakterijemija nezavistan faktor rizika za teže forme ROP-a i plus bolest, dok je pretpostavljena kasna bakterijemija povezana sa težim formama ROP-a.

Neonatalna sepsa, izloženost kisoniku i niska nedelja gestacije imaju sinergistički efekat na razvoj ROP-a (30). Sa povećanim rizikom od razvoja teške forme povezani su visoka koncentracija kiseonika i ugljendioksida u krvi i nizak pH (30).

Drugi faktori rizika za razvoj ROPa su: pripadnost beloј rasi, kongenitalne srčane mane, infekcije, multiple epizode apnee, konvulzije, respiratorni distres, pneumonija, bradikardija, parametri opšteg zdravstvenog stanja (Apgar score), intrakranijalno krvarenje, anemija, hiperbilirubinemija i blizanačka trudnoća (23,24). Takođe, značajni su i parametri lečenja koji uključuju broj transfuzija, primenu surfaktanta, vitamina E, eritropoetina i deksametazon (23,24,31).

Faktori rizika za razvoj ROP-a od strane majke opisani u literaturi su: preeklampsija, sideropenijska anemija, starije životno doba, višerotka i dugogodišnji pušački staž (32,33).

U studiji objavljenoј 2015. godine na turskoј populaciji uključene su majke dece sa ROP-om (32). Retrospektivno su analizirani i pregledani njihovi nalazi iz perioda kada su bile trudne u cilju registrovanja sideropenijske anemije. Deca rođena od majki sa deficitom gvožđa, udruženim sa anemijom sa izraženo smanjenim nivoom hemoglobina i hematokrita, smanjenim MCV, smanjenim nivoom gvožđa u serumu i sniženim nivoom feritina bila su pod većim rizikom da razviju ROP. Ovi rezultati su prvi koji sugerišu da deficit gvožđa

majke u trudnoći predstavlja rizik za razvoj ROP-a. Nalazi sugerišu da suplementacija preparatima gvožđa u toku trudnoće može smanjiti rizik za razvoj ROP-a (32).

Wu i sar. ispitivali su demografske i faktore rizika vezane za majku (33). Kontrolna grupa u ovoj studiji sastojala se od prevremeno rođene dece koja nisu razvila ROP tokom perioda praćenja, dok se ciljna grupa sastojala od prevremeno rođene dece sa razvijenim težim formama ROP-a. Nedelja gestacije i pol bili su isti u obe grupe. Upoređivani su faktori rizika između kontrolne i ciljne grupe koji su uključivali demografske kao i maternalne karakteristike. Od ukupno posmatranih 66 faktora rizika, jedino su se telesna masa na rođenju i starost majke izdvojili kao značajni faktori rizika. Godine starosti majke su novi identifikovan faktor rizika za razvoj ROP-a (33).

## **1.5 GENETIČKI FAKTORI RIZIKA ZA RAZVOJ ROP-a**

U cilju otkrivanja nasledne predispozicije za teže stadijume retinopatije prematuriteta značajna su genetička ispitivanja koja omogućavaju otkrivanje gena odgovornih za razvoj ROP-a. Do sada je u svetu, sproveden mali broj istraživanja polimorfizama gena vezanih za razvoj ROP-a. Eksperimentalni modeli kojima je omogućeno ispitivanje faktora rasta i genetska istraživanja tragaju za objašnjenjem mehanizma nastanka premature retinopatije. Rano otkrivanje mogućeg genotipa sa predispozicijom za ROP omogućilo bi blagovremenu primenu odgovarajuće terapije. U toku su istraživanja i moguća primena genske terapije

### **1.5.1 POLIMORFIZMI DNK – GENSKI POLIMORFIZMI**

Polimorfizmi predstavljaju varijacije u naslednoj osnovi čoveka koje se normalno sreću u humanim populacijama. Unutar vrsta postoje varijacije koje se manifestuju na morfološkom, hromozomskom, proteinskom i nivou DNK sekvenci. Za gen se kaže da je polimorfan ako postoji više od jedne alelske varijante tog gena u populaciji. Pojam polimorfizam vremenom je stekao pogrešno tumačenje, jer se smatralo da ako je neki gen polimorfan, na primer, ima dve varijante, jedna je normalna, a druga mutirana. Međutim, to nije tako, obe varijante su normalne samo je jedna češća, a druga ređa u populaciji i zbog toga se sada uvodi tačnija terminologija, a to je alelska varijanta. Ako jedinka ima

dve iste alelske varijante nekog gena na osnovu genotipa ona je homozigot za tu alelsku varijantu, a ukoliko su različite heterozigot. Ako posmatramo više gena i više polimorfizama, kombinacija njihovih alela na jednom hromozomu naziva se haplotip.

Da bi se određena varijanta proglašila polimorfizmom neophodno je da se ta alelna forma javlja sa učestalošću većom od 1%, odnosno da je učestalost heterozigota u populaciji veća od 2%. S druge strane, retke forme se definišu kao genetičke varijante kod kojih je manje učestali alel u populaciji prisutan u procentu manjem od 1% (34).

Postoje tri osnovna tipa DNK polimorfizama: polimorfizmi pojedinih nukleotida (SNP – Single Nucleotide Polymorphism), polimorfizmi broja uzastopnih ponovaka (VNTRs – Variable ili SNTR Small Number Tandem Repeats) i inserciono-delecioni (I/D) polimorfizmi.

Polimorfizmi zamene jednog nukleotida (SNP) predstavljaju polimorfizme na nivou jednog nukleotida u DNK, koji biva zamenjen drugim. Prisustvo jednog od ta dva nukleotida se označava kao jedna, a prisustvo drugog na istom mestu kao druga alelna varijanta. Ove zamene mogu biti sinonimne, nesinonimne i besmislene. Sinonimne ne dovode do promene aminokiseline na proteinskom nivou, što znači da najverovatnije ne dovode ni do promene funkcije proteina, a samim tim ni do fenotipske promene, dok nesinonimne promene menjaju aminokiselinu u proteinu, a to može dovesti do promene funkcija proteina. Besmislene (“nonsense”) promene dovode do zamene kodona za aminokiselinu stop kodonom, što znači da dovodi do prekida sinteze proteina i njihov efekat zavisi od pozicije SNP-a u genu. SNP polimorfizmi čine 90% svih polimorfizama u humanom genomu. Ovi se nalaze duž celog genoma, u intronima, egzonima, promotorima, pojačivačima itd. (34). Prvi korak u genetičkim studijama predstavlja pronalaženje veze između polimorfizama pojedinačnog nukleotida i određenog stanja ili bolesti. Asocijativne studije koje se rade na genima kandidatima teže da otkriju veću učestalost SNP-ova određenog gena kod grupe ispitanika koja ima bolest u odnosu na grupu ispitanika koja je nema. Studije asocijacije celog genoma (GWAS, Genome Wide association Studies) imaju za cilj da pretraže SNP-ove u kompletnom genomu i da otkriju SNP-ove u genima koji ranije nisu bili povezivani sa određenim stanjem ili bolešću (35).

Različiti broj uzastopnih ponovaka (VNTR, variable number of tandem repeats) je drugi tip polimorfizama. Tandemski ponovljene sekvence u molekulu DNK mogu biti

minisateliti i mikrosateliti. Minisateliti su dužine i do nekoliko hiljada nukleotida i najčešće se nalaze u regionu telomera. Mikrosateliti su tandemski ponovljeni segmenti DNK dužine do 10 nukleotida koji mogu biti ponovljeni i nekoliko stotina puta. Najčešće se ponavljaju sekvence od dva, tri ili četiri nukleotida. Polimorfizmi ovog tipa imaju veliku primenu u metodama koje se koriste za identifikaciju osoba (34).

Genetički polimorfizam može nastati i kao rezultat insercije ili delecije nukleotida. Polimorfizam ovog tipa podrazumeva da jedna alelna varijanta sadrži određenu sekvencu DNK (insercija) dok ga druga alelna varijanta ne sadrži (delecija). Jednu vrstu polimorfizama tipa insercija/delecija (I/D) predstavlja i prisustvo ili odsustvo Alu sekvenci. Alu sekvence su nazvane po restrikcionom enzimu AluI koji je korišćen za njihovu detekciju i sastoje se od dve sekvence dužine 120-150 bp. Insercije ovog tipa se nalaze u proseku na svakih 3 kb (34).

Danas se sve više proučava uloga DNK polimorfizama kao markera genetičke predispozicije za razvoj određenih poremećaja. To se pre svega odnosi na multifaktorske poremećaje koji nastaju sadejstvom većeg broja gena i faktora sredine. Da bi se utvrdilo da li neki polimorfizam predstavlja predispoziciju za nastanak poremećaja primenjuju se studije asocijacije u kojima se analizira udruženost ispitivanog poremećaja sa određenim genskim varijantama. Velika pažnja posvećuje se ispitivanju veze polimorfizama i mutacija u različitim genima sa specifičnim bolestima, uključujući i bolesti koje nastaju kao posledica poremećene angiogeneze. Različiti istraživači su ispitivali ulogu genetičkih varijanti u nastanku bolesti oka (šećerna bolest, senilna degeneracija makule) uključujući i nastanak retinopatije kod prevremeno rođene dece (36,37). Zbog izuzetne kompleksnosti ove bolesti, čijem nastanku doprinose kako genetički faktori tako i faktori sredine, identifikovanje gena i genetičkih varijanti koje doprinose patogenezi bolesti predstavlja izuzetno zahtevan zadatak.

Geni kandidati za nastanak ROP-a uključuju primarne posrednike u angiogenezi koja se dešava u retini koja se formira, a najznačajniji od njih je vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) (38,39), gen koji kodira protein za Norrijevu bolest (NDP, Norrie disease gen) (40,41,42), angiotenzin konvertujući enzim (ACE) (41) i gen koji kodira endotelnu azot oksid sintetazu (eNOS) (44,45). Većina studija u kojima su ispitivani genetički faktori rizika za nastanak ROP-a je urađena na genima kandidatima. Ono što je

karakteristično za ove studije je da su urađene na malim uzorcima tj. imaju malu statističku snagu, ili nisu bile u mogućnosti da se repliciraju u drugim populacijama.

### **1.5.2 UTICAJ POLIMORFIZAMA U GENU KOJI KODIRA VEGF SA NASTANKOM ROP**

Studije u kojima su ispitivane genetičke varijante u genima kandidatima za ROP, kao što je na primer VEGF, su pokazale značajnu asocijaciju ovih genetičkih varijanti sa nastankom ROP-a (38,39). U očnoj vodici pacijenata sa intravitrealnom neovaskularizacijom, uključujući i pacijente sa ROP-om, je uočen veći nivo VEGF-a (46). iRNK za VEGF je detektovana u avaskularnoj retini kao i neposredno ispred bedema u očima prevremeno rođene dece sa uznapredovalim ROP-om, dok je nivo ove iRNK bio smanjen nakon periferne laser fotokoagulacije retine (47). Istraživanja su pokazala da je nivo VEGF u subretinalnoj tečnosti kod pacijenata koji su u četvrtom stadijumu ROP-a značajno veći u odnosu na kontrolu (48). VEGF je takođe detektovan i u 65% fibrovaskularnih membrana uklonjenih vitrektomijom iz očiju prevremeno rođene dece koja su bila u petom stadijumu ROP-a (49).

Gen za VEGF je izrazito polimorfan sa više od 70 opisanih polimorfnihih mesta (38,50). Promotorski region ovog gena sadrži više polimorfizama od kojih su neki povezani sa ROP-om. Neki od polimorfizama se nalaze u 5' regionu koji se ne prevodi u protein (5'-UTR, 5'-untranslated region), i u 3' regionu koji se ne prevodi u protein (3'-UTR, 3'-untranslated region). Nekoliko polimorfizama u genu za VEGF utiče na nivo proteinskog produkta (50). Cooke i sar. su pokazali da alel -634G u 5'-UTR gena za VEGF predstavlja nezavisni faktor rizika za aktivnu formu ROP-a (39). Homozigoti za G alel, koji je povezan sa povećanim nivoom VEGF, su imali dvostruko veću verovatnoću za progresiju ka aktivnoj formi ROP-a u odnosu na druge genotipove. Međutim, meta-analiza je pokazala da G-634C polimorfizam možda i nije asociiran sa rizikom za nastanak ROP (51). Pokazano je i da je polimorfizam C-936T, koji se nalazi u 3'-UTR gena za VEGF asociiran sa nivoom VEGF u perifernoj krvi. Naime, nosioci genotipa CC imaju povećan nivo VEGF u poređenju sa nosiocima TT genotipa (52). S druge strane, meta-analiza Liu-a i saradnika je pokazala da je polimorfizam T-460C asociiran sa uznapredovalim ROP-om, dok za polimorfizme G-634C, C-2578A i C-936T nije pronađena statistički značajna asocijacija sa ROP-om (53). Polimorfizmi u genu za



VEGF su pokazali vezu sa razvojem makularnog edema kod pacijenata sa dijabetom i sa razvojem neovaskularizacije kod senilne degeneracije makule (54,55). Za sada je razumevanje doprinosa koji polimorfizmi u VEGF imaju u patogenezi ROP-a nepotpuno. Moguće je da se efekti koje polimorfizmi u ovom genu imaju na razvoj bolesti razlikuju u različitim etničkim grupama što bi doprinelo uočenim razlikama (36). Međutim, većina objavljenih studija govori u prilog asocijaciji polimorfizama u genu za VEGF sa ROP-om što ukazuje na značaj koji bi ovaj gen mogao da ima u podložnosti za nastanak bolesti (56). U toku je i nekoliko kliničkih istraživanja u kojima se procenjuje efikasnost agenasa koji blokiraju delovanje VEGF u tretmanu ROP-a.

### **1.5.3 UTICAJ POLIMORFIZAMA U GENU KOJI KODIRA IGF-1 SA NASTANKOM ROP-A**

Insulinu sličan hormon rasta 1 (IGF1, Insulin-like Growth Factor 1) reguliše fiziološki rast i utiče na težinu na rođenju. Neophodan je za normalan razvoj krvnih sudova retine u postnatalnom period, a istraživanja pokazuju da deluje sinergistički sa VEGF(35). Nedavna istraživanja su pokazala da bi nizak nivo IGF1 u serumu mogao predstavljati faktor rizika za razvoj retinopatije (36). Ovi rezultati su podržani studijama urađenim na miševima kod kojih je isključen gen za IGF1. Kod ovih miševa je došlo do abnormalnog rasta krvnih sudova retine. Kada je nivo IGF1 u serumu nakon rođenja dovoljno visok dolazi do normalnog razvoja krvnih sudova i ne razvija se ROP. Ukoliko je IGF1 konstantno nizak krvni sudovi prestaju da rastu i nezrela avaskularna retina postaje hipoksična. Retinalna hipoksija je povezana sa povećanim nivoom VEGF. Kako IGF1 raste do kritičnog nivoa retina počinje neovaskularizaciju. Odložena produkcija IGF1 kod ove prerano rođene dece koreliše sa proliferativnom fazom ROP-a. Zato bi merenje nivoa IGF1 u serumu kod prevremeno rođene dece moglo pomoći proceni rizika za nastanak ROP-a (35,36). Nedavno je spekulisano da genetički faktori mogu uticati na ekspresiju gena za IGF1 (49). S obzirom da je nivo IGF1 određen nivoom IGF-1 receptora (IGF-1R) i imajući u vidu da najučestaliji polimorfizam u genu za IGF-1R (G-3174A) dovodi do niskog nivoa IGF1 u plazmi moguće je da ovaj polimorfizam ima ulogu u nastanku ROP-a. Međutim, studije asocijacije nisu podržale hipotezu da ovaj polimorfizam predstavlja faktor rizika za nastanak ROP-a u različitim populacijama (40,57).

#### **1.5.4 UTICAJ POLIMORFIZAMA U GENU KOJI KODIRA ANGIOTENZIN KONVERTUJUĆI ENZIM (ACE) SA NASTANKOM ROP-A**

Fenomen hipoksije – reoksigenacije pokreće zaštitne mehanizme u tkivu oka kao što su glikoliza, širenje krvnih sudova, angiogeneza i povećana transkripcija eritropoetina. Ovo može dovesti do promene u transkripciji gena koji direktno dovode do inflamacije i angiogeneze, kao i gena renin-angiotenzin sistema (RAS). Imajući u vidu činjenicu da komponente RAS-a imaju bitnu ulogu u procesu inflamacije, vazodilatacije i angiogeneze nije iznenađujuće da su rađena ispitivanja veze ROP-a i RAS-a. Interesantno je da je i I/D polimorfizam u genu za ACE povezan sa ROP-om u populaciji Kuvajta (58). Utvrđeno je da pacijenti sa proliferativnom dijabetičkom retinopatijom nakon terapije sa ACE inhibitorima, imaju nižu koncentraciju VEGFa u staklastom telu.

#### **1.5.5 NASLEDNE MONOGENSKE BOLESTI KOJE U OSNOVI IMAJU RETINOPATIJU**

##### **1.5.5.1 Uticaj mutacija u genima kandidatima za familijarnu eksudativnu vitreoretinopatiju (FEVR) sa nastankom ROP-a**

Molekularno genetičke studije urađene na pacijentima sa familijarnom eksudativnom vitreoretinopatijom (FEVR) su identifikovale mutacije u nekoliko gena kandidata (gen koji kodira protein za Norijevu bolest, FZD4, LRP5 i TSPAN12) koje su povezane sa X-vezanom, autozomno-dominantnom i autozomno-recesivnom formom FEVR. Svi ovi geni su uključeni u Wnt signalni put posredovan beta-kateninom koji kontroliše razvoj krvnih sudova u retini (40,59,60). Zbog mutacije u ovim genima signalni put norrin - FZ -LRP5-TSPAN12 može postati nefunkcionalan što dovodi do poremećaja u vaskularizaciji retine i do FEVR (61,62). Interesantno je da su najmanje tri FEVR gena (gen koji kodira protein za Norijevu bolest, FZD4 i LRP5) mutirani i u malom procentu (3-11%) pacijenata sa teškim oblikom ROP-a (63,64,65). Ova genetička predispozicija je nedavno potvrđena i u studiji urađenoj na blizancima (57). Ovo ukazuje da Wnt signalni put ima bitnu ulogu i u razvoju težih oblika ROP-a i da bi u budućnosti mogao biti iskorišćen za razvijanje novih terapijskih pristupa (66,67).

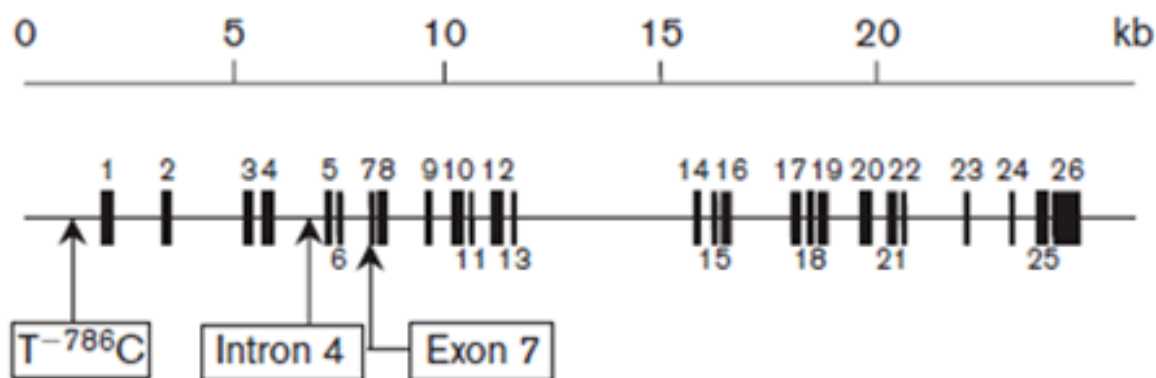
### 1.5.5.2 Uticaj mutacija u genu koji kodira protein za Norijevu bolest sa nastankom ROP-a

Norijeva bolest, koja spada u grupu FEVR, i ROP predstavljaju grupu bolesti sa sličnim fenotipom. Norijeva bolest predstavlja izuzetno retko, X-vezano nasledno oboljenje čije su glavne odlike bilateralno slepilo usled retinopatije, gluvoća i mentalna retardacija (68). Izazvana je mutacijom u genu koji kodira protein za Norijevu bolest što rezultuje nedostatkom funkcionalnog Norijevog proteina (69). Nedostatak ovog proteina uzrokuje zaostajanje razvoja retinalne vaskularizacije koja vodi do ishemije retine i do hipoksijom-posredovane akumulacije faktora angiogeneze. Mutacije u genu koji kodira protein za Norijevu bolest uzrokuju X-vezanu formu FEVR, dok su druge forme ove bolesti povezane sa mutacijama u drugim genima (70,71). Studije koje su ispitivale ulogu gena koji kodira protein za Norijevu bolest u patogenezi ROP-a su pružile kontradiktorne podatke. Pretpostavlja se da bi mutacije u ovom genu mogle biti povezane sa uznapredovalim slučajevima ROP-a. Naime, u studiji Hiraoka i sar. je procenjeno da bi mutacije u genu koji kodira protein za Norijevu bolest mogle biti povezane sa svega 3% slučajeva uznapredovalnih oblika ROPa (64). Takođe, kod četiri pacijenta je nađena veza mutacije R121W i L108P u trećem egzonu ovog gena sa teškom formom ROP-a (61). *De novo* nastala delecija CT ponovka u promotoru gena koji kodira protein za Norijevu bolest je nađena kod 6,5% dece sa teškim oblikom ROP-a, pri čemu nije nađena kod blizanca jednog od ove dece koji je imao blagi oblik ROP-a, kod roditelja, ni u kontrolnom uzorku (65). Takođe je identifikovan i polimorfizam u genu koji kodira protein za Norijevu bolest (C-597A) koji je asociran sa teškim oblikom ROP-a (41). Sve ove studije, iako urađene na malim uzorcima, dodatno potvrđuju hipotezu da genetički faktori u velikoj meri doprinose razvoju težih formi ROP-a kod prevremeno rođene dece. Međutim, nedavno urađena studija nije našla značajnu vezu polimorfizama u genu koji kodira protein za Norijevu bolest sa ROP-om i istraživači su zaključili da polimorfizmi u ovom genu nemaju bitnu ulogu u patogenezi ove bolesti (66). Takođe, u studiji Dickinsona i sar. nije nađena veza između nekoliko novo otkrivenih mutacija i delecija u genu koji kodira protein za Norijevu bolest sa teškim oblikom ROP-a (62). Moguće je da ovi kontradiktorni rezultati o uticaju polimorfizama i mutacija u genu koji kodira protein za Norijevu bolest na podložnost za nastanak ROP-a mogu biti objašnjeni etničkim

razlikama u ispitivanim populacijama. Ono što je sigurno je da je potrebno da se urade dodatne studije u cilju nedvosmislene potvrde uloge mutacija i polimorfizama u ovom genu u patogenezi bolesti.

### 1.5.6 UTICAJ POLIMORFIZAMA U GENU KOJI KODIRA eNOS SA NASTANKOM ROP-A

Gen za eNOS je lociran na hromozomu 7, u regionu 7q35 – 7q36. Sastoji se od 26 egzona i 25 introna, a obuhvata DNK segment veličine od oko 21kb. U genu za eNOS identifikovan je veći broj polimorfnih mesta, koji se nalaze u različitim regionima gena. Do sada je opisano četrnaest alelnih varijanti u promotoru, egzonima i intronima. Najviše proučavani i opisivani polimorfizmi su T-786C u promotorskom regionu, 4a/4b (VNTR) u intronu 4 i G894T u egzonu 7.



**Slika 14.** Organizacija eNOS gena i lokalizacija tri polimorfizma  
(preuzeto od Tanus-Santosa i sar. 2001)

Supstitucija T→C na poziciji -786 utiče na aktivnost promotora gena za eNOS (44). Polimorfizam u intronu 4 predstavlja VNTR polimorfizam, i javlja se u dva alelna oblika. Alel 4a ima 4x27-bp tandemskih ponovaka, dok 4b alel ima 5x27-bp ponovaka. Sam 27-bp ponovak je cis-regulatorna sekvenca promotora eNOS gena, odgovara karakterističnom obrascu pojačivača, i zajedno sa T-786C polimorfizmom reguliše transkripciju endotelne NO sintetaze tj. rezultuju smanjenom ekspresijom gena za eNOS (43,44). SNP G-894T se nalazi u egzonu 7 (75). Ovaj polimorfizam rezultuje zamenom glutaminske kiseline asparaginskom na poziciji 298 u proteinu (Glu298Asp) i dovodi do promene u aktivnosti eNOS enzima, utiče na smanjenje produkcije azot oksida i dovodi do endotelne disfunkcije.

Azot monoksid je snažan biološki medijator koji ima brojne fiziološke i patofiziološke uloge. To je slobodni radikal male molekulske mase i lipofilne prirode. Hemijski je nestabilan molekul sa kratkim poluživotom i niskom koncentracijom u plazmi koja se kreće se u rasponu 1 – 20 nmola. NO inhibira adheziju monocita i agregaciju trombocita, kao i kontrakciju i proliferaciju glatke muskulature krvnih sudova i proliferaciju fibroblasta. Olakšava protok krvi i reguliše vaskularni tonus. Takođe, modulira leukocit-endotelnu interakciju i inhibira oksidaciju LDL čestica. Utiče na ekspresiju brojnih gena, između ostalih i VEGF, faktora rasta fibroblasta-2 i metaloproteinaza matriksa (72). NO karakteriše prosta difuzija, brzo razlaganje kiseonikom i njegovim radikalima. Unutar ćelije nivo azot monoksida je kontrolisan sistemima koji sintetišu i metabolišu NO. Glavni mehanizam razgradnje NO in vivo je konverzija u nitrate u reakciji sa oksihemoglobinom (72).

Kod brojnih vaskularnih bolesti nanomolarne koncentracije NO imaju citoprotektivnu ulogu, dok je u mikromolarnim koncentracijama NO citotoksičan. Stvara se iz L-arginina delovanjem familije enzima azot oksid sintetaza (eNOS), uz dobijanje citrulina kao nusproizvoda. Izolovane su tri različite izoforme eNOS enzima koje predstavljaju produkte tri različita gena. Geni koji kodiraju ove tri humane izoforme su NOS1, NOS2 i NOS3 (43). Numerisani su po redosledu otkrivanja i kodiraju neuralnu azot oksid sintetazu (nNOS), inducibilnu azot oksid sintetazu (iNOS) i endotelnu azot oksid sintetazu (eNOS). Neuralna i endotelna azot oksid sintetaza (NOS) se konstantno sintetišu u organizmu i nazivaju se konstitutivne NOS. Treća izoforma, iNOS nije eksprimirana u fiziološkim uslovima već mora prvo biti indukovana. eNOS je prvobitno izolovana iz vaskularnog endotela, a otkrivena je i u monocitima, trombocitima. Različite izoforme enzima pokazuju visok stepen homologije. Oko 55% aminokiselinskih sekvenci je istovetno (43,72).

NO koji se oslobađa iz odgovarajućih ćelija svoju aktivnost ostvaruje preko stimulacije guanilat ciklaze što dovodi do porasta cikličnog guanozin-monofosfata (cGMP) u različitim tkivima. Aktivacija cikličnog guanozin-monofosfata (cGMP) u glatkim mišićima krvnih sudova preko cGMP zavisnih protein kinaza dovodi do vazorelaksacije. Protein kinaze dovode do otvaranja  $Ca^{2+}$  zavisnih kalijumovih kanala, hiperpolarizacije i relaksacije. NO utiče i na sintezu prostaglandina čime indirektno reguliše vaskularni tonus (72).

Rusai i sar. sproveli su istraživanje koje se odnosi na analizu T-786C i 4a/4b polimorfizama eNOS gena sa razvojem teških oblika ROP-a kod prevremeno rođene dece koja su imala malu telesnu masu na rođenju (73). Rezultati ove studije istakli su da je genotipska distribucija eNOS 4a/4b polimorfizma značajno drugačija kod prevremeno rođene dece sa teškim oblikom ROP-a u poređenju sa prevremeno rođenom decom sa lakšim stadijumima ROP-a koji nisu zahtevali lečenje. Oni su istakli da je 4aa genotip nezavisni faktor rizika za ozbiljan stadijum ROP-a. U istoj studiji nije bila uočena veza između eNOS T-786C i ROP-a. Ovi polimorfizmi su prethodno povezani sa dijabetičkom retinopatijom kod dijabetesa tipa 2 i sa brojnim kardiovaskularnim bolestima (43,44,74,75).

U literaturi postoje podaci koji ukazuju na povezanost 4a/4b polimorfizma sa nivoom metabolita azot oksida u plazmi kod zdravih ljudi (76,77). Uočeno je da nosioci 4a alela imaju manji nivo metabolita azot oksida u plazmi (78). Smanjena proizvodnja azot oksida može pogoršati retinalnu vazoobliteraciju tokom prve faze ROP-a (79) i potom i angiogenezu u drugoj fazi (80). S obzirom da je gen koji kodira eNOS lociran u blizini drugih gena koji su asocirani sa mikrovaskularnim komplikacijama kao što je dijabetička retinopatija (75,81), moguća je njihova međusobna povezanost i uticaj.

Studija u kojoj su ispitivani polimorfizmi u genu za eNOS na različitim etičkim populacijama je pokazala vezu između polimorfizama T-786C i G-894T sa razvojem ROP-a. Naime, u ovoj studiji je zaključeno da su aleli 786C i 894T značajni faktori rizika za razvoj ROP-a u populaciji belaca i afričkih Amerikanaca (82).

## **1.6 SKRINING PREMATURENE RETINOPATIJE**

Osnovno i najvažnije ispitivanje u kliničkom pristupu prematurnoj retinopatiji predstavlja oftalmološki skrining. Oftalmološki skrining mora da obuhvati svu decu sa rizikom za razvoj prematurne retinopatije (13,24,83). Dobra selekcija dece sa visokim rizikom za pojavu prematurne retinopatije, kao i pravovremeno započinjanje pregleda, omogućuju pravilno sprovođenje prevencije i lečenja (84,85).

Idealan program skrininga treba da obuhvati detekciju svih slučajeva prematurne retinopatije, da ih prati, a istovremeno treba da se izbegnu nepotrebni pregledi. Program

skrininga se razvija u tesnoj saradnji pedijataru neonatologa i oftalmologa. Odrednice za oftalmološki skrining u svetu bitno se razlikuju. Presudnu ulogu ima razvijenost neonatalne nege i kontrolisana primena terapijskog kiseonika. Strategija skrininga prematurne retinopatije jeste da se pregledima očnog dna prevremeno rođene dece otkriju nepravilnosti u razvoju krvne mreže sa ciljem otkrivanja aktivnog oblika prematurne retinopatije, a pravovremenim lečenjem spreči njen dalji razvoj. Kriterijum TM manja ili jednaka 1500g i NG manja ili jednaka 32 jeste skrining kriterijum za visoko razvijene zemlje (25). Naš cilj je da mu se što više približimo, ali da ne propustimo nijedan slučaj aktivnog oblika ROP-a. U našoj zemlji skriningom su obuhvaćena prevremeno rođena deca telesne mase na rođenju 2000 g i manje, i/ili nedelje gestacije 36 i manje (13,84,86). Ovde mogu da se uvrste i ona prevremeno rođena deca koja su izvan ovih kriterijuma ali nose dodatne rizik faktore u toku razvoja (13,23,24,86,87).

Vremenske odrednice početka skrininga redefinisane su na svetskom ROP kongresu 2009. godine u Indiji. Prvi pregled se obavlja u zavisnosti od gestacijske nedelje u kojoj je dete rođeno i to:

- deca vrlo niske (22, 23, 24, 25, 26 NG) gestacije ne pre 30 GN, znači kada zbirno postignu 30 GN.
- deca rođena sa 31, 32, 33 NG – pregled nakon 3 nedelje od rođenja
- deca rođena sa 34 NG i više – pregled nakon 2 nedelje od rođenja.

U toku skrininga nalaz na očnom dnu beleži se u skladu sa Međunarodnom klasifikacijom prematurne retinopatije. Bazirano na smernicama Međunarodne klasifikacije, a u zavisnosti od nalaza na očnom dnu određuje se i termin sledećeg pregleda za 7 ili 14 dana. Ovi intevali se ponavljaju sve dok se ne završi proces vaskularizacije retine (88).

**Tabela 1 Vremenske odrednice započinjanja oftalmološkog skrininga**

| Nedelja gestacije | Postmenstrualna nedelja (PMA) | Nedelja posle rođenja |
|-------------------|-------------------------------|-----------------------|
| 22                | 30                            | 8                     |
| 23                | 30                            | 7                     |
| 24                | 30                            | 6                     |
| 25                | 30                            | 5                     |
| 26                | 30                            | 4                     |
| 27                | 31                            | 4                     |
| 28                | 32                            | 4                     |
| 29                | 33                            | 4                     |
| 30                | 33                            | 3                     |
| 31                | 34                            | 3                     |
| 32                | 35                            | 3                     |
| 33                | 36                            | 3                     |
| 34                | 36                            | 2                     |
| 35                | 37                            | 2                     |

Prematurna retinopatija predstavlja ozbiljan zdravstveni problem. Prevencija prematurne retinopatije fokusira se na eliminaciji faktora rizika, podizanju nivoa neonatalne nege, oftalmološkom skriningu i pravovremenosti terapije. Pregled retine indirektnim oftalmoskopom je dostupan, lako izvodljiv, a značaj tretmana je neprocenjiv (13,86,89).



## **1.7 ISTORIJAT LEČENJA ROP-a**

Cilj liječenja ROP-a je destrukcija avaskularne ishemične periferne retine. U periodu 72 h od dijagnostikovanja aktivne retinopatije potrebno je započeti liječenje (90).

### **1.7.1 KRIO TERAPIJA**

Krio terapija koristila se devedesetih godina prošlog veka. Početkom ovog veka objavljeni su rezultati Multicentrične studije CRYO ROP (Multicenter Trial of Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity) koja je tokom perioda od 10 godina pratila oči na koje je primenjena krio terapija kao i oči koje su služile kao kontrolna grupa (17).

Pacijenti sa obostranom "threshold ROP" (n=240) tretirani su krioterapijom samo na jednom oku. Prevrneno rođena deca sa ROP blažeg oblika od "threshold" retinopatije su metodom slučajnog odabira tretirana krio terapijom na jednom oku, dok oko sa "threshold" retinopatijom nije tretirano krio terapijom. Nakon deset godina ponovljeno je testiranje gde je ocenjivana oštrina vida i analizirane strukturne promene na očnom dnu, odnosno rezidualne promene u vezi sa ROP-om. Nađen je manji broj kako strukturno tako i funkcionalno nezadovoljavajućih rezultata kod dece koja su tretirana u odnosu na kontrolnu grupu: 44,4% prema 62,1% kada se u obzir uzimala oštrina vida pri gledanju na daljinu, 42,5% prema 61,6% pri gledanju na blizinu, a kada je parameter bio promene na očnom dnu rezultat je bio 27,2% prema 47,9%. Totalna ablacija retine nastavila je da se razvija u kontrolnoj grupi kod 38,6% za 5 godina do 41,4% za period do 10 godina, dok je kod tretiranih pacijenata ovaj procenat stalno bio isti na nivou od 22%. Nakon deset godina oči koje su bile tretirane krio terapijom imale su mnogo manje šansi da u potpunosti izgube vid. Rezultati su pokazali dugoročni značaj krioterapije u očuvanju oštrine vida kod očiju sa aktivnom formom ROP-a (17).

### **1.7.2 LASERFOTOKOAGULACIJA RETINE (LFC)**

Destrukcija ishemične retine vrši se upotrebom argon ili diodnog lasera koja zbog dostupnosti posteriornih zona može predstavljati prednost u odnosu na krio metodu. Diodni laser dobro prodire kroz zamućene optičke medije. Laser pečati se postavljaju

jedan pored drugoga sa odgovarajućim razmakom (pola širine sopstvenog prečnika) jer se kasnije pečati šire. Oni se uočavaju kao okrugla bela polja, a nakon nedelju dana već je prisutna tamna ožiljna pigmentacija. Redukovanje vaskularizacije grebena kao terapijski odgovor uočljiv je 7 dana posle krio i laser terapije. U slučaju neovaskularizovanih zona sa mestima neovaskularizacije terapijska procedura se ponavlja (13) .

ETROP (*Early Treatment for Retinopathy Prematurity*) studija analizira rezultate ranog tretmana laser fotokoagulacije retine kod aktivnog oblika retinopatije prevremeno rođene dece (92). Deca sa bilateralnom visoko rizičnom aktivnom ROP (n=317) tretirana su na jednom slučajno odabranom oku LFC terapijom dok je drugo oko tretirano konvencionalno (kontrolno oko). Kod asimetričnih slučajeva (n=84), oko sa visoko rizičnom aktivnom ROP nasumično je tretirano ranim ili konvencionalnim tretmanom. Strukturalna ispitivanja su vršena u 6 i 9 mesecu. Studija je pokazala smanjenje nepovoljnih rezultata oštine vida kod pacijenata sa ranim tretmanom sa 19,8% na 14,3%. Strukturalne promene su redukovane sa 15,6% na 9,0% za 9 meseci. Rani tretman kod visoko rizične aktivne ROP značajno redukuje neželjene rezultate kod primarnih i sekundarnih (strukturnih) promena (92).

Iako je laser terapija uspešna u tretmanu ROP-a, javljaju se i komplikacije u vidu katarakte, ishemije prednjeg segmenta, zadnjih sinehija, krvarenja iz prednjeg segmenta i staklastog tela i fluktuacije intraokularnog pritiska. Dugoročno gledano gubi se periferni vid, češća je pojava refrakcionih anomalija (visoka miopija), strabizma, glaukoma i ablacije retine. Nekada je tretman nemoguće uraditi zbog loše vizuelizacije (krvarenja u staklastom telu) ili se srećemo sa napredovanjem bolesti i pored ponovljenih laser tretmana. Nedostatak je i što laser nije široko dostupan, tako da neka deca ostaju bez mogućnosti za lečenje.

### **1.7.3 ANTI-VEGF (VASCULAR ENDOTHELIAL GROW FACTOR) TERAPIJA**

ROP je bifazna bolest koja se sastoji od inicijalne faze – kiseonik indukovane vaskularne obliteracije nakon koje sledi period – hipoksijom indukovane vaskularne proliferacije. Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) igra važnu ulogu u multifaktorijskoj patogenezi sa značajno povećanim vrednostima nađenim u očima sa prematurnom retinopatijom (93,95,96).

Intravitrealna primena anti VEGF lekova pokazala se korisna u tretmanu ROPa kao samostalna ili kao dopuna laser tretmanu. Mintz-Hittner i sar. upotrebili su intravitrealno anti VEGF kod očiju sa napredovanjem bolesti i pored urađenog laser tretmana (2008). Došlo je do povlačenja neovaskularizacije (95). Kong i sar. objavljuju ohrabrujuće rezultate mono tretmana anti VEGF terapijom u očima sa neprovidnim medijima (hemoragije staklastog tela) kao i u očima gde je terapija laserom bila nedovoljna (96).

O efikasnosti intravitrealne primene anti VEGF terapije kod teških oblika ROP-a pišu i drugi autori (97,98,99,100,101,102,103).

Publikacija BEAT ROP studije 2011. godine (*Bevacizumab Eliminates the Angiogenic Threat of Retinopathy of Prematurity*) o upotrebi bevacizumaba u terapiji zone I i II ROP-a stvorila je nadu da možda postoji jednostavniji, jeftiniji i efikasniji tretman od terapije laserom, trenutno standardnog lečenja (93). Zaključeno je da anti VEGF terapija superiorna u zoni I, a da u zoni II nema prednosti u odnosu na LFC.

Neonatologija i oftalmologija imaju impresivnu saradnju u zajedničkim istraživanjima i u budućnosti su potrebne sveobuhvatne studije koje će pratiti rezultate anti VEGF terapije na oštrinu vida i rizika za pojavu neželjenih efekata terapije u dužem vremenskom periodu na samom oku kao i u organizmu (104).

Terapija ROP je evoluirala iz starije, destruktivnije metode (krioterapije) do mlađih, manje destruktivnih (laser) i intravitrealna aplikacija anti VEGF. Po literaturnim podacima anti VEGF terapija jeste potisnula LFK ali ga nije potpuno eliminisala (99,100,101,102,103,104). LFK se danas koristi retko samostalno, a češće kao dopuna. Anti VEGF terapija je posebno korisna za stadijum 3+ ROP-a sa krvarenjem koje smanjuje vizuelizaciju, kod rigidne pupile, intravitealne neovaskularizacije sa ranim ili minimalnim razvojem fibroznih membrana ili agresivne posteriorne retinopatije (104).

#### **1.7.4 HIRURŠKA TERAPIJA**

U slučajevima kod kojih je ROP udružen sa ablacijom retine indikovano je hirurško lečenje (105). Standardna terapija za retinopatiju prematurusa stadijum 4-5 uključuje: pars plana vitrektomiju i lensektomiju, scleral buckling i vitrektomiju sa poštedom sočiva (neki slučajevi u četvrtom stadijumu). Analizira se i kombinovano lečenje vitrektomijom i konzervativnom terapijom (104,105). U zaključku treba napomenuti da je teško odrediti optimalno vreme za hiruršku intervenciju u stadijumima 4 i 5, zbog nepovoljnog anatomskog i funkcionalnog ishoda u stadijumu 5. Obe metode, vitrektomija i scleral buckling imaju tendenciju da rezultuju lošim centralnim (makularnim) vidom kod dece sa uznapredovalom formom ROP-a, pa je preporuka da se hirurška intervencija izvrši u četvrtom stadijumu neposredno pre nego ablacija zahvati makulu što obezbeđuje bolje anatomske i funkcionalne rezultate (105).

Operativni zahvati na malom oku su izuzetno složeni, zahtevaju specijalnu opremu i vrhunskog hirurga. Rade se samo u specijalizovanim centrima u svetu. Operacija se radi na oba oka u opštoj anesteziji. Često je opšte stanje deteta kritično, tako da operaciju nije moguće izvesti odmah po postavljanju indikacije što dodatno otežava i pogoršava prognozu. I pored korektno tehnički urađene operacije svedoci smo da se uspe u anatomskom smislu tj. retina se vrati na mesto, ali da izostane funkcionalni rezultat, u ovom slučaju vid (13,19,105).

#### **1.7.5 GENSKA TERAPIJA ROP-A**

Uprkos napretku biologije i molekularne genetike u toku nekoliko proteklih decenija pokušaji “transporta” terapijskih gena su često bili razočaravajući. Razlog obično leži u poteškoćama isporuke i ekspresije terapijskog gena u željenom organu. Za gensku terapiju mora da se koristi vektor koji transportuje gen ili gene do cilja. Vektor treba da bude koristan, bezopasan, održiv i sposoban da isporuči gensku sekvencu koja će biti ubačena u ciljnu ćelijsku DNK (106). Vektor mora biti u mogućnosti da prođe ćelijsku membranu i preživi u stranom okruženju, a dok je izvan ćelije mora da preživi domaći imuni sistem. Imuni sistem je problem koji predstavlja najveći izazov za gensku terapiju. Virusne vektore koji se upotrebljavaju u genskoj terapiji brzo prepoznaje imuni

sistem domaćina i uništava. Sa trenutnom tehnologijom ROP je idealna bolest za proučavanje genske terapije (razvija se i javlja tokom kratkog vremenskog perioda). Čak i ako virusni vektor opstaje samo nekoliko dana ili nedelja, još uvek može efikasno da pruži genetski materijal dovoljno dugo da utiče na bolest. Pored svega ROP se javlja unutar oka gde je imuni sistem relativno neaktivan. Genska terapija koja bi modifikovala regulaciju citokina i faktora rasta, za koje se zna da su povezani sa nastankom ROP-a, bi bila obećavajuća ukoliko bi se dokazala na animalnom modelu. Transfer gena virusnim vektorima u krvne sudove na modelu retinopatije prematuriteta kod pacova ispitivao je Chowers u svojoj studiji (106). Testirao je izvodljivost transfera gena u hijaloidne krvne sudove i u delove retine sa preretinalnom neovaskularizacijom kod pacova sa ROP-om koristeći različite virusne vektore. Adenovirusni vektori su se pokazali kao efikasni za genski transfer u krvne sudove na animalnom modelu ROP-a (106). Ovo može biti prvi korak ka korišćenju transfera gena kao sredstva za modulaciju okularne neovaskularizacije za eksperimentalne i terapijske svrhe.

Budući istraživači moraju pažljivo da izbegnu kolateralne efekte i treba da razmotre razvojnu prirodu bolesti. Bila bi tragedija da se zaustavi patološka neovaskularizacija, a da se izazovu efekti kao što su izmenjeni razvoj fotoreceptorskih ćelija i nishodna regulacija faktora koji doprinose normalnom razvoju krvnih sudova kao što su pericitni rast i preživljavanje. Budućnost zahteva više naučnog rada. Dok ne saznamo više detalja o molekularnim mehanizmima koji uzrokuju ROP, transfer gena će biti nesiguran u terapiji ROP-a (106).

## **2. CILJEVI RADA**

Ispitivanje se sprovodi sa ciljem da se kod prevremeno rođene dece od 25 do 36 nedelje gestacije:

1. Utvrdi učestalost genotipova i alela polimorfizama T-786C i 4a/4b gena za eNOS
2. Analizira prisustvo povezanosti ispitivanih polimorfnih geneskih varijanti sa nastankom teškog stepena retinopatije prevremeno rođene dece
3. Ispitaju faktori rizika udruženi sa nastankom teškog stepena retinopatije prevremeno rođene dece.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1 UZORAK ISPITANIKA

Istraživanje je sprovedeno kao prospektivno klinička studija preseka u periodu od 1. januara 2011. do 31. decembra 2015. godine na Institutu za Ginekologiju i akušerstvo Kliničkog Centra Srbije u Beogradu. Molekularno-genetička ispitivanja uređena su u laboratoriji Instituta za humanu genetiku Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Istraživanje je odobreno od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

U studiju su uključena 239 prevremeno rođena deteta. Kod sve dece oftalmološki skrining je obavljen u jedinicama intenzivne i poluintenzivne nege. U našoj zemlji skriningom su obuhvaćena prevremeno rođena deca sa telesnom masom na rođenju 2000 g i manje, i/ili 36 nedelja gestacije i manje.

Na osnovu sprovedenog oftalmološkog skrininga prevremeno rođena deca podeljena su u dve grupe:

1. ROP grupa je obuhvatila prevremeno rođenu decu kod kojih je stepen ROP-a zahtevao oftalmološku terapiju
2. Kontrolnu grupu su činila deca kod kojih terapija nije primenjena.

ROP grupa je obuhvatila svu decu (u period 1.1.2011. do 31.12.2015.god) koja su zbog aktivnog oblika retinopatije prematuriteta zahtevala primenu oftalmološke terapije, njih 113. Tom broju je prilagođen broj dece u kontrolnoj grupi, njih 126 kod kojih terapija nije primenjena. Genetička ispitivanja su rađena iz brisa bukalne sluznice. Uzorak za genetičku analizu je manji od kliničkog jer je analizirano samo po jedno dete iz višeplođnih trudnoća. Genetička analiza je bila uspešna kod 174 novorođenčeta od čega 84 pripada ROP, a 90 kontrolnoj grupi.

Roditelji prevremeno rođene dece su obavešteni u pismenoj formi o oboljenju (ROP), načinu lečenja, mogućim posledicama, kao i ciljevima molekularno-genetičke studije u koju

će njihova deca biti uključena. Roditelji su dali pismeni pristanak da se uzme bris bukalne sluznice njihovog deteta i da dete učestvuje u istraživanju.

Prevremeno rođenu decu sa rizikom za razvoj ROP-a za oftalmološki skrining selektuju pedijatri neonatolozi. Saradnja osoblja pedijatrijskog tima i oftalmologa omogućuje sigurnost održavanja dobrog opšteg stanja deteta, dobar pristup oku i obezbeđuje uslove za detaljan pregled retine. Za pregled je potrebna maksimalno široka zenica. Maksimalna midrijaza se postiže ukapavanjem 2,5% phenylephrina i 0,5% cyclopentolata dva puta u razmaku od 10 minuta pola sata pre pregleda. Pregled se radi indirektnim binokularnim oftalmoskopom i 20D lupom. Za pregled perifernih delova retine koristi se skleralni depresor. Kapačni otvor se drži široko otvoren pomoću blefarostata.

Terapija ROP-a se sprovodi unutar 72 sata od postavljanja indikacije. Terapija podrazumeva intravitrealnu aplikaciju anti VEGF-a i-ili laserfotokoagulaciju periferne, avaskularne retine.

Intravitrealna aplikacija anti VEGF koristi se kao terapija aktivnih oblika retinopatije prevremeno rođene dece od jula 2011. godine u našoj zemlji. Terapija se sprovodi kao monodoza ubrizgavanjem 0,5ml rastvora sa 0,625mg anti VEGF-a intravitrealno. Intervencija se izvodi u lokalnoj topikalnoj anesteziji (sol. 0,5% Tropicamid). Za aplikaciju se koristi 30G igla. Mesto aplikacije je 1,5- 2 mm od limbusa – pars plana. Igla se usmerava ka centru oka i lek se ubrizgava.

Destrukcija avaskularne i ishemične periferne retine radi se u lokalnoj anesteziji, uz prisustvo neonatologa i praćenje vitalnih parametara deteta. Žičani blefarostat omogućuje pristup oku. Destrukcija retine vrši se laserskom energijom (visoka temperatura), upotrebom dioda lasera sa emisijom infracrvene svetlosti talasne dužine 810 nm, a vizuelizacija se postiže uz 20D lupu. Pri maksimalno proširenoj zenici uz indentaciju skleralnim depresorom (kao u toku skrining pregleda) postavljaju se laser pečati. Snopu svetlosti za pregled dodat je laserski snop, čiju tačnu lokalizaciju određuje tačkasti ciljni marker, čime se postiže dobra preciznost lokalizacije pečata. Primenom metode indirektnog laseroftalmoskopa lako i dobro su za tretman dostupne posteriorne zone retine. Intervencija se obavlja na oba oka. Nekada je neophodno ponoviti intervenciju tj. dodati još laser pečata kada se u toku praćenja ustanovi da bolest napreduje.



Ispitivali smo post-natalne faktore rizika: pol, nedelju gestacije, telesnu masu na rođenju, način završetka porođaja, decu iz višeplođnih trudnoća, Apgar scor (AS), intreuterini zastoj rasta (SGA), prisustvo anemije, hiperbilirubinemije, pneumonije i sepse. Ispitivali smo potrebu za primenom terapije kiseonikom (oksigenoterapija), potrebu za mehaničkom ventilacijom kao i prisustvo respiratornog distress sindroma (RDS) i bronhopulmonalne displazije (BPD). Takođe smo analizirali i prisustvo težih stepena (III i IV) intraventrikularnih hemoragija (IVH) i nekrotičnog enterokolitisa (NEC).

## **3.2 MOLEKULARNO-GETIČKA ISTRAŽIVANJA**

### **3.2.1 IZOLACIJA DNK IZ BUKALNE SLUZNICE PREVREMENO ROĐENE DECE**

Za planirano genetičko ispitivanje totalna genomska DNK svih prematurusa izolovana je iz brisa bukalne sluznice metodom fenolhloroform ekstrakcije.

Postupak izolacije izvodi se u više faza.

Prvi dan se raspakuju predhodno dobro osušeni brisevi bukalne sluznice. Pažljivo se makazama prebaci što veći deo vaticice sa briseva u plastične epruvete sa poklopcima i doda 280µl TNS pufera i 20µl proteinaze K. Uzorak se strese na dno epruvete i stavi u vodeno kupatilo na 56 °C tokom noći.

Drugi dan se uzorci centrifugiraju 30 sekundi na 4000 obrtaja. Potom se vatica ocedi pincetom o zidove epruvete i prebaci u probušenu epruvetu od 0,5ml koju zatvaramo pa vraćamo u veću epruvetu od 2ml. Ponovo centrifugiramo 1 min na 4000 obrtaja, izbacujemo epruvetu od 0,5ml i u oborenu tečnost dodajemo 300µl suspenzije fenol:hloroform:izoamil alkohol u odnosu 25:24:1. Izmešamo obrtanjem epruvete. Centrifugiramo 7min na 4000 obrtaja. Supernatantu dodamo 300µl rastvora hloroform:izoamil alkohol u odnosu 24:1. Centrifugira se ponovo 7min i gornja faza prebaci u nove epruvete. Doda se 30ml NaCl 3 M i 600µl u apsolutnog etanola sa leda, pomeša i ostavi na ledu tokom noći.

Treći dan se uzorci centrifugiraju 30 minuta na 15000 obrtaja. Odlije se alkohol. Zatim se vrši ispiranje sa 70% etanolom. Uzorci se suše u termostatu na 37°C dva sata. Potom se doda 50µl destilovane vode i ostavi da se rastvara preko noći.

Za detekciju polimorfizma primenili smo reakciju lančane polimerizacije (PCR).

### **3.2.2 REAKCIJA LANČANE POLIMERIZACIJE – PCR**

Princip PCR reakcije je selektivno umnožavanje željenog regiona DNK pomoću termostabilne DNK polimeraze - Taq polimeraze. Neophodno je poznavati nukleotidni redosled ciljnog segmenta, radi sinteze specifičnih oligonukleotidnih graničnika-prajmera, komplementarnih terminalnim delovima analiziranog regiona, veličine 20-30 bp. Prajmeri će se specifično vezati za denaturisanu DNK i ograničiti ciljni region (ponašaju se kao RNK početnica). Za svaki set prajmera određuje se optimalna koncentracija Mg.

Pri analizi svih polimorfizama u ovom radu 25µl reakcione smeše za svaki uzorak je sadržalo:

- 2,5µl 10 x PCR pufera
- 1,5µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0,5µl 10 mM dNTP
- 0,5µl prim 1 (300 ng / µl)
- 0,5µl prim 2 (300 ng / µl)
- 2µl DNK (100 ng / µl)
- 0,2µl Taq polimeraze (5U/ µl)
- H<sub>2</sub>O (destilovana, ampulirana) ad 25 µl

Reakcija se odvija kroz cikluse:

- a) Denaturacije (95 °C)
- b) Hibridizacije prajmera (aniling od 52-70°C)
- c) Sinteze novih lanaca (elongacija 72°C)

Kroz 35-40 ciklusa dobija se  $10^5$  ciljne sekvence. Brzina ugradnje nukleotida pri elongaciji je 30-100 nukleotida u sekundi.

PCR reakcije su izvršene u aparatu Perkin–Elmer Thermal Cycler 2400 i Applied Biosystems Thermal Cycler 2720. Provera ispitivanih PCR produkata vršena je nakon elektroforeze na 8% poliakrilamidnom gelu (PAA) ili 2% agaroznom gelu. Za bojenje DNK je korišćena syber safe boja, a gelovi su prosvetljavani na UV-transiluminatoru i slikani digitalnom kamerom.

### **3.2.3 ANALIZA POLIMORFIZMA T-786C GENA ZA ENOS**

Pri PCR reakciji u ovom ispitivanju korišćeni su prajmeri koji ograničavaju region od 306 bp u kome se nalazi polimorfno mesto T-786C. Sekvenca prajmera je:

5'sense - prajmer GTG TAC CCC ACC TGC ATT CT - 3'

5'antisense - prajmer CCC AGC AAG GAT GTA GTG AC - 3'

Uslovi amplifikacije su:

- početna denaturacija 3 min na 94°C
- 40 ciklusa od tri koraka
  - denaturacija 1 min na 94°C
  - vezivanje prajmera 1 min na 60°C
  - ekstenzija prajmera i polimerizacija DNK 1 min na 72°C.
- završna ekstenzija 7 min na 72°C.

Produkti PCR reakcije bili su veličine od 306 bp.

Digestija PCR produkata je vršena restrikcijom enzimom PdiI.

Analiza produkata digestije sledila je nakon elektroforeze na 8% poliakrilamidnom gelu, imajući u vidu da:

- homozigoti genotipa CC poseduju dva fragmenta - 225 bp i 81 bp;
- heterozigoti genotipa CT poseduju tri fragmenta - 306 bp, 225 bp i 81 bp;
- homozigoti genotipa TT poseduju jedan fragment -306 bp.

### **3.2.4 ANALIZA POLIMORFIZMA 4A/4B GENA ZA eNOS**

4a/4b polimorfizam u četvrtom intronu VNTR analizirali smo PCR reakcijom koristeći prajmere koji ograničavaju region sa polimorfnim mestom. Sekvenca prajmera je:

5'sense - prajmer CTA TGG TAG TGC CTT GGC TGG AGG - 3'

5'antisense - prajmer ACC GCC CAG GGA ACT CCG CT - 3'

Uslovi amplifikacije:

- početna denaturacija 3 min na 94°C
- 35 ciklusa od tri koraka:
  - denaturacija 1 min na 94°C
  - vezivanje prajmera 1 min na 60°C
  - ekstenzija prajmera i polimerizacija DNK 1 min na 72°C.
- završna ekstenzija 7 min na 72°C.

Dobijeni su sledeći fragmenti:

DNA fragment dužine 210-bp koji odgovara alelu 4b sa pet 27-bp ponovka i fragment dužine 183-bp koji odgovara 4a alelu sa četiri ponovka.

### 3.3 KLINIČKA ISPITIVANJA

Prisustvo faktora rizika analizirano je korišćenjem medicinske dokumentacije.

Nedelja gestacije je ocenjivana na osnovu termina poslednje menstruacije majke i termina porođaja određenog praćenjem ultrazvučnim pregledima u toku trudnoće, kao i na osnovu spoljnih karakteristika deteta.

Na osnovu telesne mase i nedelje gestacije, a prema antropometrijskim normativima za novorođenčad (tabela Durutović – Gligorović S.), određeno je da li su deca odgovarajuća za nedelju gestacije (*Appropriate for Gestational Age – AGA*), mala za nedelju gestacije (*Small for Gestational Age – SGA*), ili velika za nedelju gestacije (*LGA*).

Apgar skor određuje akušer u porodilištu ukoliko se radi o vaginalnom porođaju, odnosno neonatolog ako je porođaj završen carskim rezom.

Gasne analize i acidobazni status rađeni su iz uzorka kapilarne krvi iz pete i analize vršene na aparatu: GEM. Premier 3000.

Asfiksija je procenjivana na osnovu kliničke slike, Apgar scora i acidobaznog statusa.

Analiziran je broj dana na terapiji kiseonikom. Kiseonik se primenjuje u vidu respiratorne potpore (nazalni CPAP i konvencionalna mehanička ventilacija), ili u vidu kontrolisane povećane koncentracije inspiratornog kiseonika (difuzno preko atmosfere Medical-Servo inkubatora ili hood-a). Primenjivan je nazalni CPAP (kontinuirani pozitivni pritisak na kraju inspirijuma) u vidu „bubble CPAP-a”. Konvencionalna sinhronizovana mehanička ventilacija u vidu SIPPV i SIMV je sprovedena aparatima: Drager Babylog 8000+, Drager VN 500 i Simens.

Krvna slika je rađena iz uzorka kapilarne ili venske krvi, a vrednosti određivane na aparatu Simens advia 2120 hematology system. Kriterijum za anemiju je koncentracija hemoglobina manja od 90 mg/l.

Vrednosti bilirubina su određivane iz uzorka venske krvi na aparatu Philips, Reichert Unistat mode 131031OC. Kriterijum za hiperbilirubinemiju je koncentracija bilirubina veća od 170  $\mu\text{mol/l}$ .

Sepsa je određivana na osnovu pozitivne hemokulture, kliničke slike, povišenog C-reaktivnog proteina (CRP), vrednosti leukocita, trombocita i leukocitarne formule.

Ultrazvuk centralnog nervnog sistema rađen je ultrazvučnim aparatom: Logicum 3 Pro sondom od 7.5 MHz. Ultrazvučni nalazi intraventrikularne hemoragije (IVH) graduirani su od I do IV stepena prema Papileu (107). Uključena su deca sa III I IV stepenom IVH.

Stepen respiratornog distres sindroma (RDS) ocenjivan je na osnovu Rtg pluća po Bomsellu (I-IV stepen) (108). Pneumonija je dijagnostikovana na osnovu Rtg pluća, kliničkog (auskultatornog) nalaza i rezultata krvne slike.

Dijagnoza nekrotičnog enterokolitisa (NEC) je postavljana prema Bellovoj klasifikaciji (109). Uključena su deca koja su imala NEC I i II stadijum i koja su zahtevala medicinski tretman. Isključena su deca sa težim stadijumom koji je zahtevao hirurški tretman i prevođenje u drugu ustanovu.

### **3.4 STATISTIČKA ANALIZA**

U ovoj studiji korišćene su deskriptivne i analitičke statističke metode.

Od deskriptivnih korišćeni su:

- apsolutni i relativni brojevi (n,%)
- mere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana)
- mere disperzije (standardna devijacija, percentili)

Od analitičkih statističkih metoda korišćeni su testovi razlike:

- parametarski (t test, ANOVA)
- neparametarski (Hi-kvadrat test, Mann-Whitney U test, Kruskal-Wallis test).

Izbor testa za testiranje razlike zavisio je od tipa podataka i raspodele. Parametarski testovi korišćeni su za testiranje značajnosti razlike numeričkog obeležja posmatranja sa normalnom raspodelom, dok su neparametarski testovi korišćeni za testiranje značajnosti razlike numeričkog obeležja posmatranja sa raspodelom koja nije

normalna. Pored toga, Hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) test je korišćen za testiranje značajnosti razlike između grupa kod nominalnih obeležja posmatranja.

Za analizu povezanosti korišćena je logistička regresiona analiza, univarijantna i multivarijantna.

Multivarijantno modelovanje je rađeno u dva koraka. U prvom, korišćen je Enter metod, u analizu su ušli svi prediktori koji su bili statistički značajni u univarijantnoj analizi. Bacward metodom sa kriterijumom za ulazak  $p=0,05$  i kriterijum za isključenje 0,10 dobijeni su prediktori čije p vrednosti u modelu ne prelaze 0,10.

Rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

Sve verovatnoće od 0,05 i manje su korišćene kao verovatnoće za odbacivanje nulte hipoteze.

Svi podaci obrađeni su u SPSS 20.0 (IBM korporacija) softverskom paketu.

## 4. REZULTATI

Napredak nauke i tehnologije u svim oblastima, naročito u medicini, rezultovao je većim brojem višeplođnih trudnoća, većim brojem rizičnih trudnoća i boljom neonatalnom negom. Pomerene su granice rađanja i prvorođene su sve starije. Ovi i mnogi drugi faktori rizika utiču na sve veći broj prevremenih porođaja kao osnovnog razloga za pojavu ROP-a.

**Tabela 1.** Broj živorođene i procenat prevremeno rođene dece na KGA KCS – medicinska dokumentacija

| <b>Godina</b> | <b>Broj živorođene dece</b> | <b>Prevremeno rođena deca (%)</b> |
|---------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| <b>2011.</b>  | 6637                        | 10,9                              |
| <b>2012.</b>  | 6700                        | 10,2                              |
| <b>2013.</b>  | 6729                        | 11                                |
| <b>2014.</b>  | 6840                        | 11,8                              |
| <b>2015.</b>  | 6464                        | 12,6                              |

Iz tabele 1 uočava se prilično ujednačen broj živorođene dece od 2011. do 2014. godine uz stalan porast prevremeno rođene dece. 2015. godine manje je živorođene dece u odnosu na prethodnu godinu uz znatan porast prevremeno rođene dece. Prevremeno rođena deca su deca rođena pre 36 NG.

Karakteristike prevremeno rođene dece obuhvaćene ovim istraživanjem prikazane su tabeli 2.



**Tabela 2.** Opšte karakteristike ispitivanog uzorka

|  |              | N   | %      |
|--|--------------|-----|--------|
| Podela uzorka                                | ROP          | 113 | 47,3%  |
|  | kontrolna    | 126 | 52,7%  |
| Pol  | muški        | 116 | 48,5%  |
|  | ženski       | 123 | 51,5%  |
| Oftalmološka<br>dijagnoza<br>kontrolne grupe | Uredan nalaz | 70  | 29,3%% |
|  | ROPI         | 44  | 18,4%  |
|  | ROPII        | 12  | 5,0%   |
| Oftalmološka<br>dijagnoza<br>ROP grupe       | ROP 3+       | 51  | 21,3%  |
|  | AP ROP       | 36  | 15,1%  |
|  | ROP2+2A      | 26  | 10,9%  |
| Th   | AntiVEGF     | 99  | 87,6%  |
|  | LFC          | 10  | 8,8%   |
|  | AntiVEGF+LFC | 4   | 3,5%   |

Istraživanjem je obuhvaćeno 239 prevremeno rođena deteta. ROP grupu činilo je 113 (47,3%), a kontrolnu 126 (52,7%) prevremeno rođene dece. Dečaka je bilo 116 (48,5%), a devojčica 123 (51,5%). Deca ROP grupe lečena su ukoliko su imala dijagnoze ROP3+, 51 (21,3%), AP ROP 36 (15,1%) i ROP 2+2A 26 (10,9%). Deca kontrolne grupe su imala uredan nalaz - njih 70 (29,3%), ROPI - 44 (18,4%) i ROPII - 12 (5,0%). Deca ROP grupe lečena su intravitrealnom aplikacijom anti vazoendotelijalnog faktora rasta - njih 99 (87,6%), laserfotokoagulacijom 10 (8,8%) ili sa obe metode 4 (3,5%).

**Tabela 3.** Srednje vrednosti NG, TM, Apgara i broja dana na terapiji O2 ispitivanog uzorka

|                        | Aritmetička sredina | SD     | Perc. 25 | Perc. 75 | Min | Maks |
|------------------------|---------------------|--------|----------|----------|-----|------|
| NG                     | 30.74 ±             | 2.06   | 29.00    | 32.00    | 25  | 37   |
| TM (g)                 | 1323.01 ±           | 282.22 | 1,100.00 | 1,500.00 | 795 | 2300 |
| Apgar skor             | 5.51 ±              | 1.81   | 4.00     | 7.00     | 1   | 9    |
| Broj dana na kiseoniku | 18.57 ±             | 15.17  | 7.00     | 26.00    | 1   | 103  |

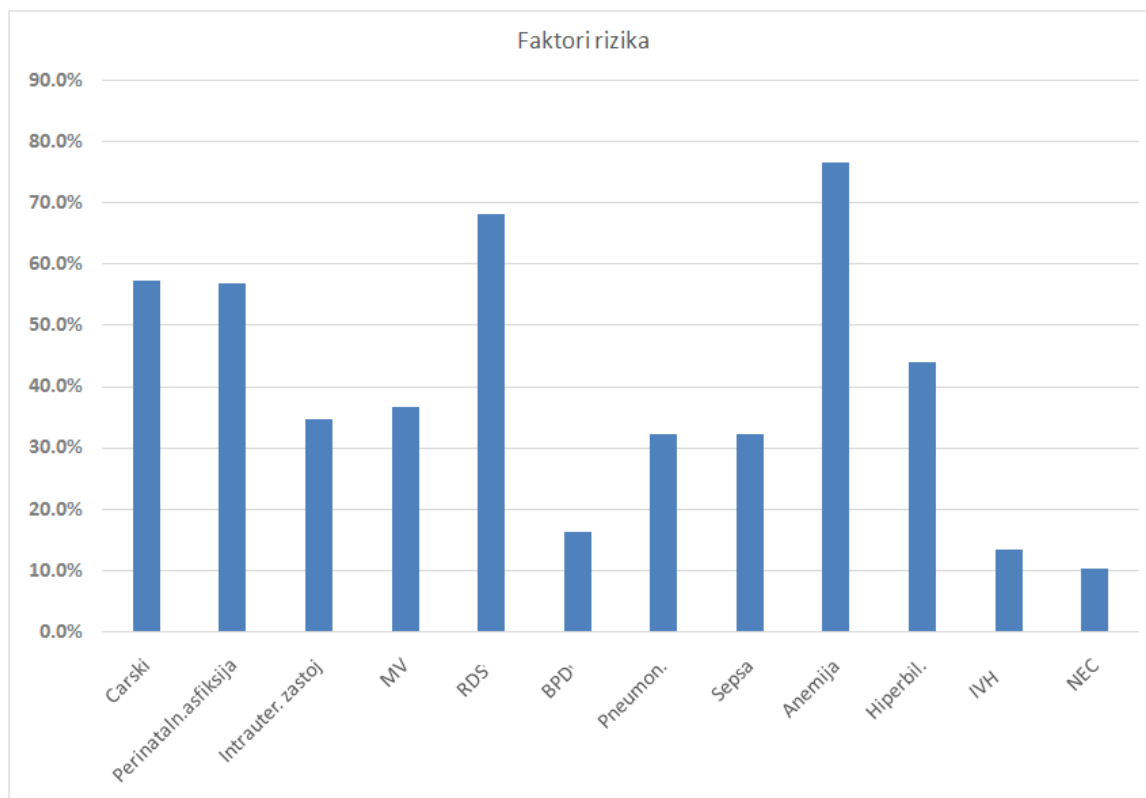
NG-nedelja gestacije, TM-telesna masa, srednja vrednost ± standardna devijacija (SD)

Srednja vrednost NG ispitivanog uzorka je 30,74±2,06, srednja vrednost TM je 1323,01±282,22, srednja vrednost Apgar skora 5,51±1,81 i srednja vrednost broja dana na terapiji kiseonikom 18,57±15,17.

**Tabela 4.** Učestalost višeplođnih trudnoća

|                            |                    |          | <b>ROP</b> | <b>Kontrolna</b> | <b>Ukupno</b> |
|----------------------------|--------------------|----------|------------|------------------|---------------|
| <b>Višeplođne trudnoće</b> | <b>jednoplodne</b> | <b>N</b> | 74         | 93               | 167           |
|                            |                    | <b>%</b> | 44.3%      | 55.7%            | 100.0%        |
|                            | <b>blizanci</b>    | <b>N</b> | 34         | 27               | 61            |
|                            |                    | <b>%</b> | 55.7%      | 44.3%            | 100.0%        |
|                            | <b>trojke</b>      | <b>N</b> | 5          | 6                | 11            |
|                            |                    | <b>%</b> | 45.5%      | 54.5%            | 100.0%        |
| <b>Ukupno</b>              | <b>N</b>           | 113      | 126        | 239              |               |
|                            | <b>%</b>           | 47.3%    | 52.7%      | 100.0%           |               |

Nešto je više dece u ROP grupi – 39 (34,5%) rođeno iz višeplođnih trudnoća, prema 33 (26,2%) dece u kontrolnoj grupi. Nema statistički značajne razlike između grupa ( $\chi^2=2,356$ ;  $p=0,308$ ).



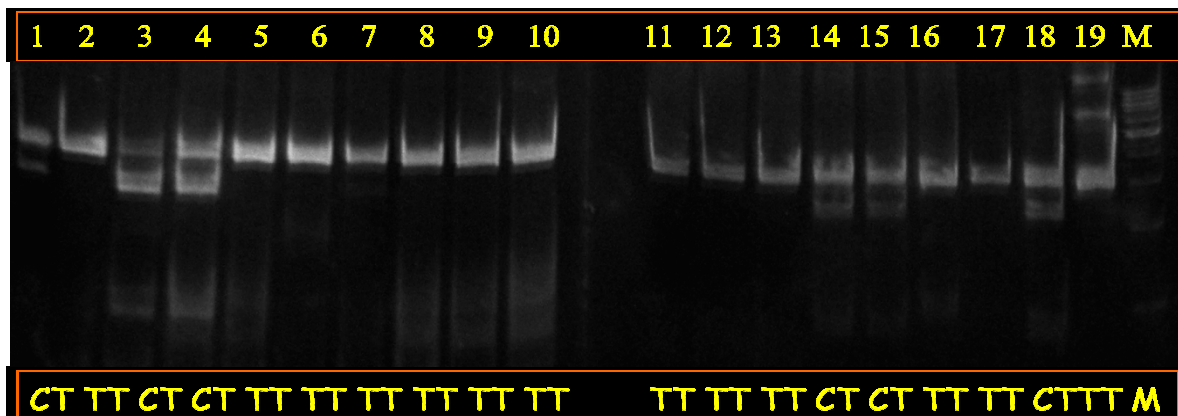
**Grafikon 1.** Prikaz faktora rizika ispitivanog uzorka

MV-mehanička ventilacija; RDS-respiratorni distress sindrom; BPD-bronhopulmonalna displazija; IVH-intraventrikularna hemoragija; NEC-nekrotični enterokolitis

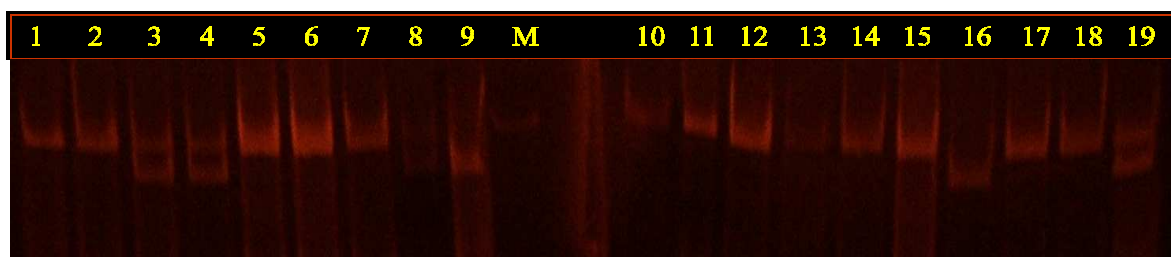
Na grafikonu 1 prikazana je učestalost kliničkih faktora rizika ispitivanog uzorka prevremeno rođene dece.

#### 4.1 REZULTATI GENETIČKIH ANALIZA

Genetsko ispitivanje polimorfizma T-786C gena za eNOS analizirano je na uzorku od 128, a polimorfizma 4a/4b 170 prevremeno rođene dece.

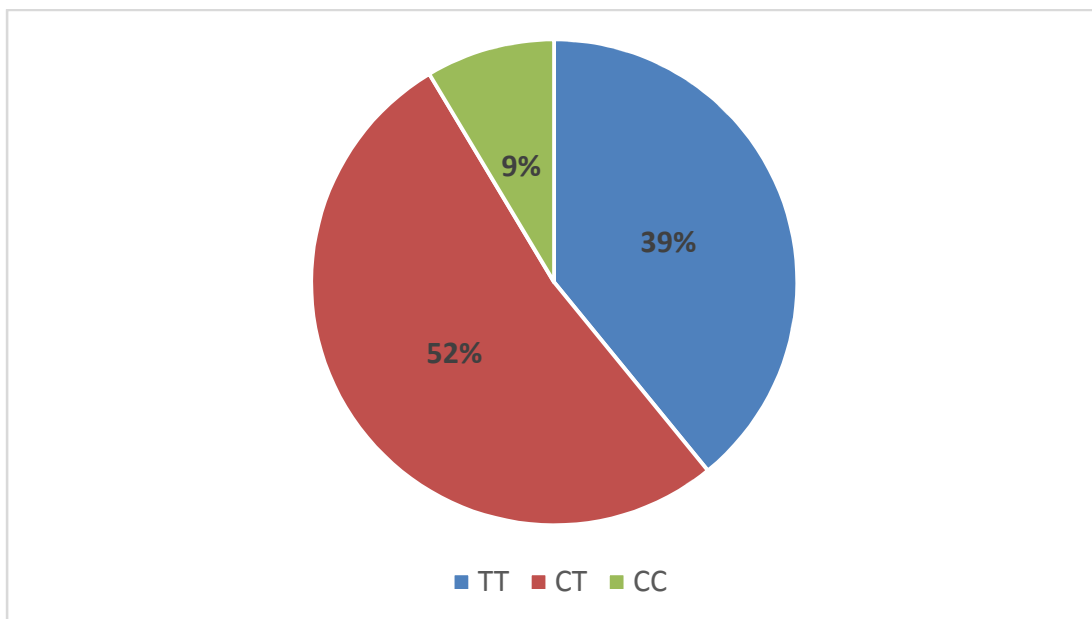


**Slika 15.** Restrikcioni polimorfizam eNOS T-786C genotipa – Izgled traka na gelu nakon restrikcije (PdiI)



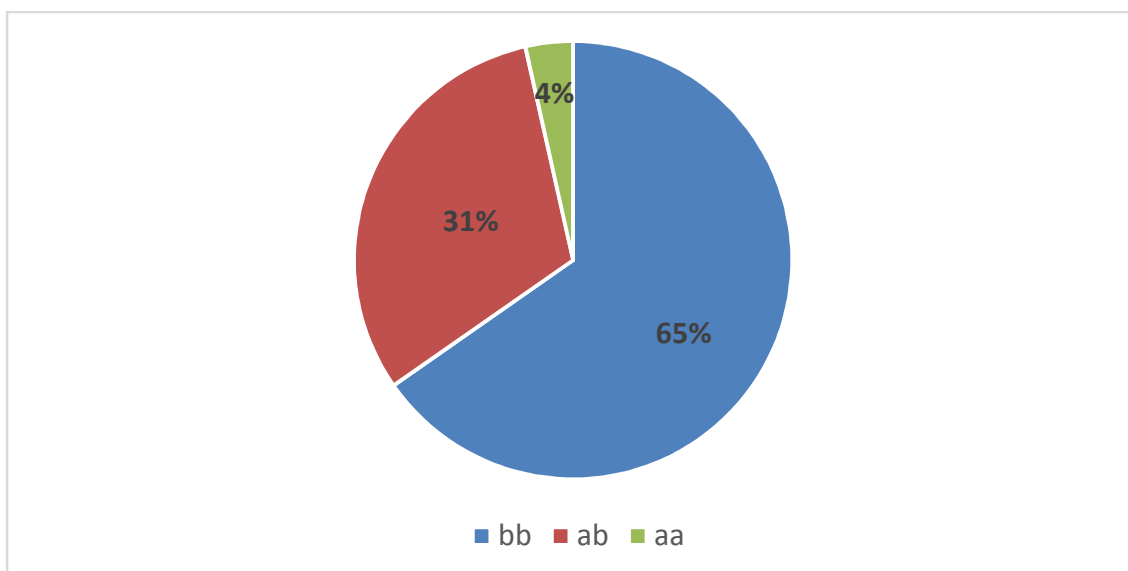
bb bb ba ba bb bb bb ba aa bb bb bb bb bb bb aa bb bb ba

**Slika 16.** Polimorfizam eNOS 4a/4b genotipa – Izgled traka na gelu



**Grafikon 2.** Učestalost eNOS T-786C genotipova na ispitivanom uzorku

Analizom polimorfizma T-786C na našem uzorku utvrđeno je da je 50 od 128 prevremeno rođene dece (39,1%) homozigotno za češći alel T (genotip TT), 67 (52,3%) su bili heterozigoti (genotip CT) i njih 11 (8,6%) homozigoti za ređi alel C (genotip CC). Učestalost alela T je 65,2%, a učestalost alela C 34,8% .



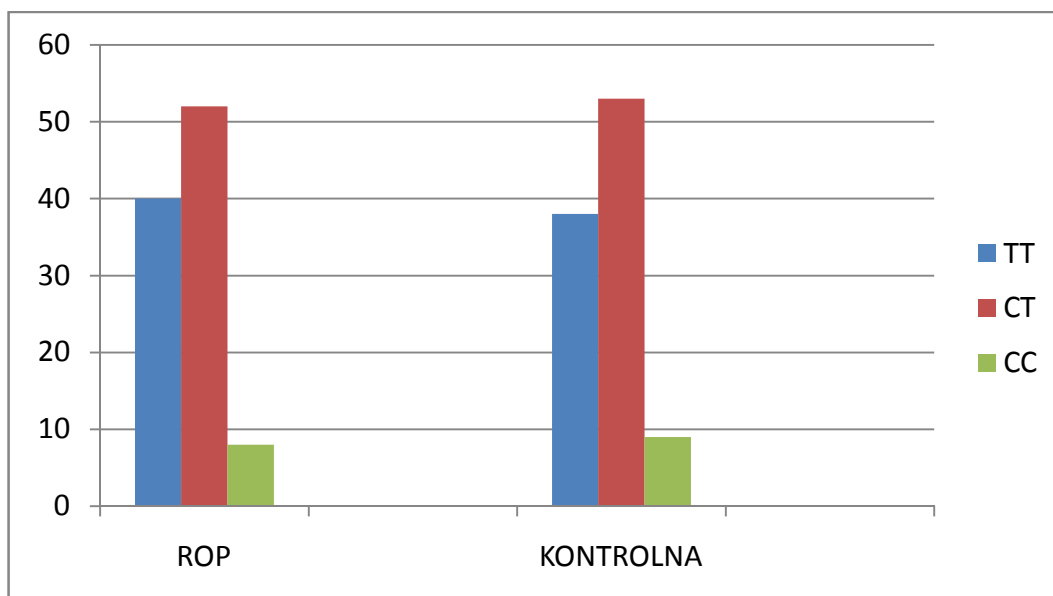
**Grafikon 3.** Učestalost eNOS 4a/4b genotipova na ispitivanom uzorku

Analizom polimorfizma 4a/4b na našem uzorku utvrđeno je da je 111 od 170 prevremeno rođena deteta (65,3%) homozigotno za češći alel 4b (genotip bb), 53 (31,2%) su bili heterozigoti (genotip ab) i njih 6 (3,5%) homozigoti za ređi alel 4a (genotip aa). Učestalost alela 4b je 0 80,9%, a učestalost alela 4a 19,1%.

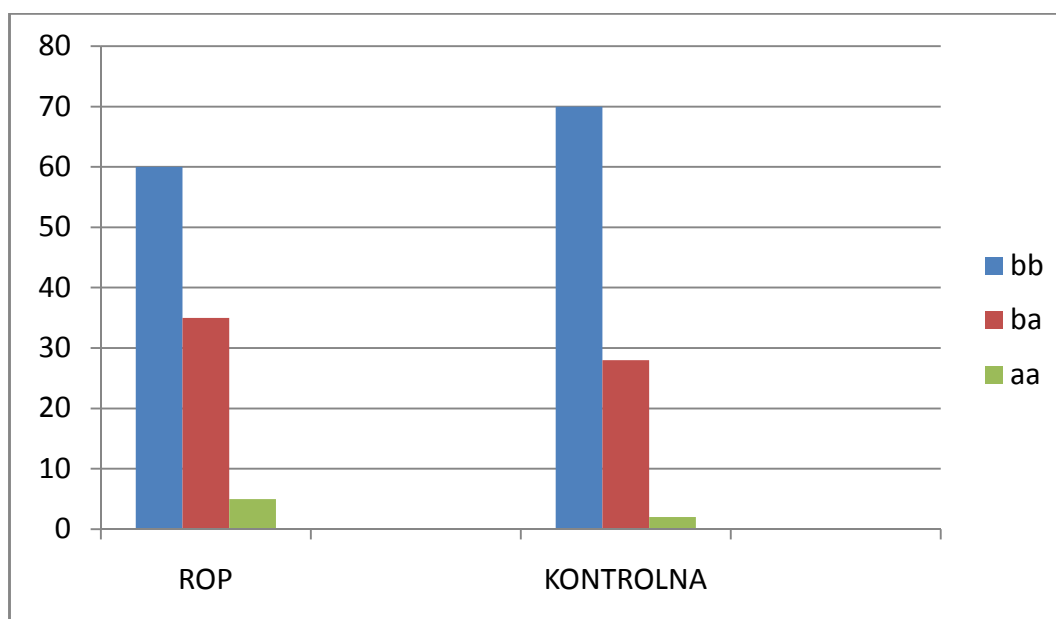
**Tabela 5.** Distribucija genotipova i alela eNOS T-786C i eNOS 4a/4b polimorfizama u ROP i kontrolnoj grupi

| eNOS gen polimorfizam | Genotip   | ROP grupa<br>n (%) | Kontrolna grupa<br>n (%) | P vrednost |
|-----------------------|-----------|--------------------|--------------------------|------------|
| <b>T-786C</b>         | <b>TT</b> | 24 (40.0)          | 26 (38.2)                | 0.978      |
|                       | <b>CT</b> | 31 (51.7)          | 36 (52.9)                |            |
|                       | <b>CC</b> | 5 (8.3)            | 6 (8.8)                  |            |
| <b>Aleli %</b>        | <b>T</b>  | 65.8               | 64.7                     | 0.850      |
|                       | <b>C</b>  | 34.2               | 35.3                     |            |
| <b>4a/4b</b>          | <b>bb</b> | 50 (60.2)          | 61 (70.1)                | 0.384      |
|                       | <b>ba</b> | 29 (34.9)          | 24 (27.6)                |            |
|                       | <b>aa</b> | 4 (4.9)            | 2 (2.3)                  |            |
| <b>Aleli %</b>        | <b>4b</b> | 77.7               | 83.9                     | 0.146      |
|                       | <b>4a</b> | 22.3               | 16.1                     |            |

Oba ispitivana genotipa kod prevremeno rođene dece su u Hardi-Veinberg ravnoteži. Učestalosti genotipova i alela polimorfizama T-786C i 4a/4b eNOS gena i njihove razlike između ROP i kontrolne grupe prikazane su u tabeli 5. Razlike u učestalostima nisu statistički značajne.



**Grafikon 4.** Prikaz učestalosti genotipova polimorfizama eNOS T-786C ROP i kontrolne grupe



**Grafikon 5.** Prikaz učestalosti genotipova polimorfizama eNOS 4a/4b ROP i kontrolne grupe

**Tabela 6.** Poređenje genotipova po dominantnom i recesivnom modelu

|                     | ROP |       | Kontrolna |       | Rezultat testiranja    |
|---------------------|-----|-------|-----------|-------|------------------------|
|                     | N   | %     | N         | %     |                        |
| <b>4bb+4ab/4aa</b>  | 79  | 95.2% | 85        | 97.7% | $X^2=0.792$<br>p=0.435 |
|                     | 4   | 4.8%  | 2         | 2.3%  |                        |
| <b>4bb/4 aa+4ab</b> | 50  | 60.2% | 61        | 70.1% | $X^2=1.827$<br>p=0.176 |
|                     | 33  | 39.8% | 26        | 29.9% |                        |
| <b>TC+TT/CC</b>     | 55  | 91.7% | 62        | 91.2% | $X^2=0.010$<br>p=0.921 |
|                     | 5   | 8.8 % | 6         | 8.8%  |                        |
| <b>TC+CC/TT</b>     | 36  | 60.0% | 42        | 61.8% | $X^2=0.042$<br>p=0.838 |
|                     | 24  | 40.0% | 26        | 38.2% |                        |

Učestalost genotipova između ROP i kontrolne grupe po dominantnom (4bb/4ab+4aa, p=0,176; TT/TC+CC, p=0,838) i recesivnom (4bb+4ab/4aa, p=0,435; TC+TT/CC, p=0,921) modelu nije pokazala značajne razlike (tabela 6).

Analizirali smo povezanost između 4a/4b eNOS polimorfizma i ROP koja zahteva terapiju kod prevremeno rođene dece logističkom regresionom analizom. Posle prilagođavanja za pol, telesnu masu, nedelju gestacije, Apgar skor i broj dana na terapiji kiseonikom, logistička regresiona analiza ne pokazuje statistički značajnu povezanost između 4a/4b genotipova i razvoja ozbiljnih oblika ROP-a kod prevremeno rođene dece ( $\beta=0,346$ , p=0,288).



**Tabela 7.** Rezultati haplotip analize

| 4a/4b | T-786C | ROP        | Kontrolna  | p vrednost |
|-------|--------|------------|------------|------------|
| 4a    | T      | 22 (17,6%) | 20 (15,0%) | 0.466      |
| 4a    | C      | 19 (15,2%) | 17 (12,8%) | 0.473      |
| 4b    | T      | 51 (40,8%) | 57 (42,9%) | 0.987      |
| 4b    | C      | 33 (26,4%) | 39 (29,3%) | 0.769      |

Rezultati haplotip analize dve ispitivane grupe nisu pokazali statističku značajnost (tabela 7).

**Tabela 8.** Klinički faktori rizika ROP i kontrolne grupe kod kojih je izvršena genetička analiza

| Faktori rizika                    | ROP grupa  | Kontrolna grupa | p vrednost |
|-----------------------------------|------------|-----------------|------------|
|                                   | n=84       | n=90            |            |
| <b>Pol M/Ž</b>                    | 44/40      | 42/48           | 0.451      |
| <b>NG</b>                         | 29.8±1.9   | 31.1±1.9        | <0.001     |
| <b>TM (g)</b>                     | 1212±234   | 1377±279        | <0.001     |
| <b>Apgar skor</b>                 | 4.7±1.7    | 6.3±1.6         | <0.001     |
| <b>Broj dana na O<sub>2</sub></b> | 25.6±18.1  | 13.99±10.0      | <0.001     |
| <b>Carski rez</b>                 | 51 (60.7%) | 52 (57.8%)      | 0.694      |
| <b>Perinatalana asfiksija</b>     | 65 (77.4%) | 39 (43.3%)      | <0.001     |
| <b>Intrauterini zastoj</b>        | 25 (29.8%) | 30 (33.3%)      | 0.613      |
| <b>MV</b>                         | 45 (53.6%) | 23 (25.6%)      | <0.001     |
| <b>RDS</b>                        | 71 (84.5%) | 54 (60%)        | <0.001     |
| <b>BPD</b>                        | 22 (26.5%) | 8 (8.9%)        | 0.002      |
| <b>Pneumonija</b>                 | 38 (45.2%) | 20 (22.2%)      | 0.001      |
| <b>Sepsa</b>                      | 34 (40.5%) | 26 (28.9%)      | 0.108      |
| <b>Anemija</b>                    | 76 (90.5%) | 65 (72.2%)      | 0.002      |
| <b>Hiperbilirubinemija</b>        | 34 (40.5%) | 42 (46.7%)      | 0.411      |
| <b>IVH</b>                        | 16 (19.0%) | 7 (7.8%)        | 0.028      |
| <b>NEC</b>                        | 13 (15.5%) | 4 (4.4%)        | 0.014      |

Simboli: srednja vrednost ± standardna devijacija

U tabeli 8 su prikazani analizirani klinički faktori rizika za razvoj ROP-a kod prevremeno rođene dece sa urađenom genetičkom analizom. Statistički značajne razlike su uočene između ROP i kontrolne grupe u srednjim vrednostima nedelje gestacije, telesne mase na rođenju, Apgar skora i broja dana na terapiji O<sub>2</sub>. Isto tako, učestalost respiratornog distres sindroma, bronho-pulmonalne displazije, intraventrikularnog krvarenja i potrebe za mehaničkom ventilacijom su statistički značajno različiti između dve analizirane grupe dece. Nije bilo razlike između analiziranih grupa po polu, načinu završetka porođaja, prisustvu intrauterinog zastoja i hiperbilirubinemiji.

**Tabela 9.** Klinički faktori rizika u zavisnosti od eNOS T-786C genotipa dece ROP i kontrolne grupe

| Faktori rizika              | T-786C    |           |           |
|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|
|                             | TT        | CT        | CC        |
| Pol M/Ž                     | 20/30     | 39/28     | 5/6       |
| NG                          | 30.5±1.8  | 30.5±1.9  | 30.4±1.4  |
| TM (g)                      | 1300±295  | 1285±255  | 1305±266  |
| Apgar skor                  | 5.7±1.8   | 5.2±1.8   | 6.1±2.2   |
| Broj dana na O <sub>2</sub> | 19.2±13.7 | 20.1±14.2 | 14.5±10.3 |
| Carski rez                  | 29/21     | 40/27     | 5/6       |
| PA                          | 27/23     | 44/23     | 5/6       |
| Intrauterini zastoj         | 19/31     | 21/46     | 3/8       |
| MV                          | 17/33     | 27/40     | 3/11      |
| RDS                         | 33/17     | 50/17     | 9/2       |
| BPD                         | 9/41      | 11/56     | 0/11      |
| Pneumonija                  | 20/30     | 23/44     | 3/8       |
| Sepsa                       | 18/32     | 26/41     | 4/7       |
| Anemija                     | 37/13     | 57/10     | 10/1      |
| Hiperbilirubinemija         | 21/29     | 25/42     | 6/5       |
| IVH                         | 5/45      | 12/55     | 0/11      |
| NEC                         | 3/47      | 6/16      | 3/11      |

Simboli: \*srednja vrednost ± standardna devijacija

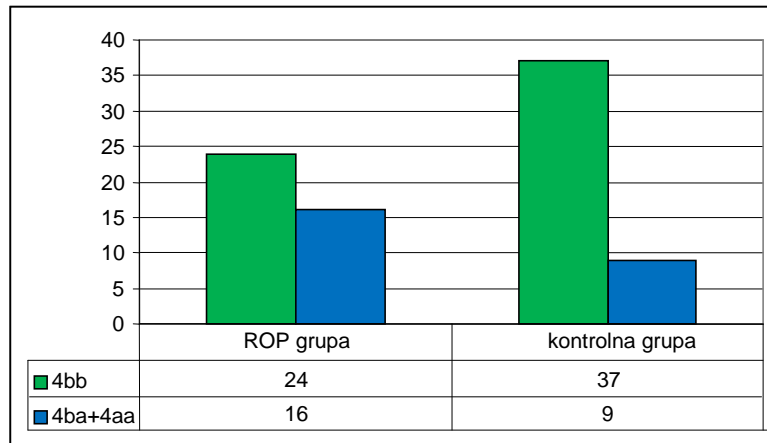
**Tabela 10.** Klinički faktori rizika u zavisnosti od eNOS 4a/4b genotipa dece ROP i kontrolne grupe

| Faktori rizika           | 4a/4b     |           |           |
|--------------------------|-----------|-----------|-----------|
|                          | bb        | Ba        | Aa        |
| Pol M/Ž                  | 50/61     | 30/23     | 4/2       |
| NG                       | 30.4±1.9  | 30.6±2.1  | 28.8±1.4  |
| TM(g)                    | 1286±268  | 1316±257  | 1220±231  |
| Apgar skor               | 5.5±1.8   | 5.6±1.9   | 5.2±1.6   |
| Broj dana O <sub>2</sub> | 20.1±16.3 | 18.5±13.9 | 27.2±18.9 |
| Carski rez               | 70/41     | 27/26     | 4/2       |
| PA                       | 69/42     | 29/24     | 5/1       |
| Inrauterini zastoj       | 37/74     | 15/38     | 1/5       |
| MV                       | 44/67     | 19/34     | 4/2       |
| RDS                      | 78/33     | 40/13     | 5/1       |
| BPD                      | 18/93     | 10/42     | 2/4       |
| Pneumonija               | 39/72     | 17/36     | 1/5       |
| Sepsa                    | 38/73     | 18/35     | 4/2       |
| Anemija                  | 92/19     | 41/12     | 6/0       |
| Hiperbilirubinemija      | 53/58     | 18/35     | 3/3       |
| IVH                      | 16/95     | 7/46      | 0/6       |
| NEC                      | 11/101    | 6/46      | 1/6       |

Simboli: \*srednja vrednost ± standardna devijacija

U tabelama 9 i 10 prikazani su klinički faktori rizika po eNOS T-786C i eNOS 4a/4b genotipovima kod dece ROP i kontrolne grupe

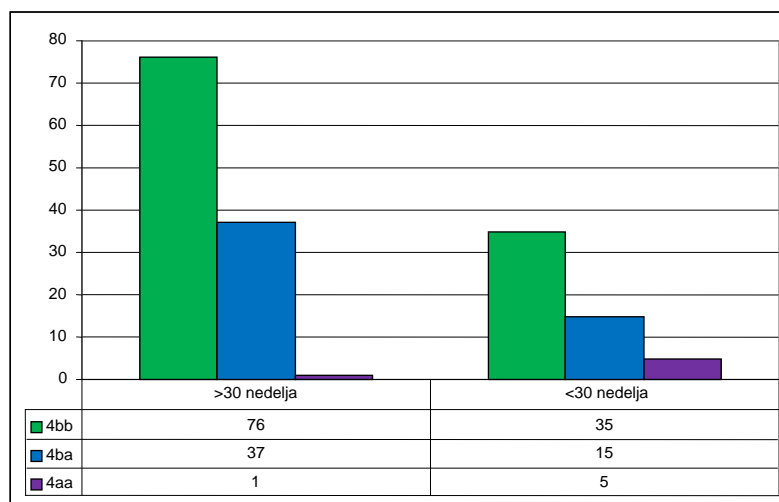
Nosioci 4aa genotipa eNOS 4a/4b polimorfizma imali su nižu nedelju gestacije u odnosu na ostale grupe genotipova (4bb i 4ba) (p=0,114). Srednje vrednosti nedelje gestacije analizirane recesivnim modelom bile su značajno niže kod dece sa 4aa genotipom (t=2,034; p=0,044). Kod dece sa 4aa genotipom uočena je niža telesna masa i Apgar skor, a veći broj dana na terapiji O<sub>2</sub> u odnosu na ostale grupe genotipova (4bb i 4ba).



**Grafikon 6.** eNOS 4a/4b učestalost genotipova kod dece ženskog pola

Statistički značajna razlika je uočena kod dece ženskog pola po dominantnom modelu (4bb/4ab+4aa). Deca ženskog pola sa ispoljenim ROP-om su češće nosioci 4ba i 4aa genotipova od dece ženskog pola u kontrolnoj grupi ( $\chi^2=4,333$ ,  $p=0,037$ ; OR 1,6849, CI 0,95, 0,962- 2,951). Bez obzira na uočenu veću učestalost 4ba i 4aa genotipova dece sa ROP-om multipla regresiona analiza nije pokazala da je 4a alel faktor rizika za razvoj teških formi ROPa kod devojčica.

Analizirali smo povezanost između 4a/4b eNOS polimorfizma i ROP koja zahteva primenu terapije kod prevremeno rođene dece. Posle prilagođavanja za pol, telesnu masu, nedelju gestacije, Apgar skor i broj dana na terapiji kiseonikom, logistička regresiona analiza ne pokazuje statistički značajnu povezanost između 4a/4b genotipova i razvoja ozbiljnih oblika ROP-a kod prevremeno rođene dece ( $\beta=0,346$ ,  $p=0,288$ ).



**Grafikon 7.** Učestalost eNOS 4a/4b genotipova u ROP i kontrolnoj grupi sa NG>30 i NG<30

Grafikon 7 pokazuje da je genotip 4aa deset puta češće prisutan u grupi dece sa nedeljom gestacije manjom od 30 u poređenju sa grupom dece kod kojih je nedelja gestacije veća od 30 (p=0,032, po recesivnom modelu (p=0,0144, OR 10,3636 CI 1,2405-86,5849) (Kvota odnos 11,3, 1,2867-99,239). Multivarijantna linearna regresiona analiza sa polom, TM i Apgar skorom kao kovarijatama nije pokazala asocijaciju 4a/4b genotipa sa vrednostima nedelje gestacije kod ispitivane prevremeno rođene dece.

## 4.2 REZULTATI ISPITIVANJA KLINIČKIH FAKTORA RIZIKA

**Tabela 11.** Klinički faktori rizika dece ROP i kontrolne grupe (239 dece)

| <b>Faktori rizika</b>             | <b>ROP grupa<br/>n=113</b> | <b>Kontrolna grupa<br/>n=126</b> | <b>p<br/>vrednost</b> |
|-----------------------------------|----------------------------|----------------------------------|-----------------------|
| <b>Pol M/Ž</b>                    | 58/55                      | 58/68                            | 0.413                 |
| <b>NG</b>                         | 29.96±1.93                 | 31.42±1.93                       | <0.001                |
| <b>TM (g)</b>                     | 1236.73±236.37             | 1400.40±298.03                   | <0.001                |
| <b>Apgar skor</b>                 | 4.73±1.70                  | 6.22±1.61                        | <0.001                |
| <b>Broj dana na O<sub>2</sub></b> | 24.28±17.30                | 13.45±10.68                      | <0.001                |
| <b>Carski rez</b>                 | 51 (60.7%)                 | 52 (57.8%)                       | 0.694                 |
| <b>PA</b>                         | 85(75.2%)                  | 51(40.5%)                        | <0.001                |
| <b>Intrauterini zastoj</b>        | 36(31.9%)                  | 47(37.3%)                        | 0.378                 |
| <b>MV</b>                         | 58(51.3%)                  | 30(23.8%)                        | <0.001                |
| <b>RDS</b>                        | 94(83.2%)                  | 69(54.8%)                        | <0.001                |
| <b>BPD</b>                        | 28(25.0%)                  | 11(8.7%)                         | 0.001                 |
| <b>Pneumonija</b>                 | 48(42.5%)                  | 29(23,0%)                        | 0.001                 |
| <b>Sepsa</b>                      | 46(40.7%)                  | 31(24.6%)                        | 0.008                 |
| <b>Anemija</b>                    | 101(89.4%)                 | 82(65.1)                         | <0.001                |
| <b>Hiperbilirubinemija</b>        | 47(41.6%)                  | 58(46.0%)                        | 0.490                 |
| <b>IVH</b>                        | 21(18.6%)                  | 11(8.7%)                         | 0.026                 |
| <b>NEC</b>                        | 19(16.8%)                  | 6(4.8%)                          | 0.003                 |

Simboli: srednja vrednost ± standardna devijacija

U tabeli 11 prikazani su ispitivani faktori rizika dece ROP i kontrolne grupe. Korišćenjem univarijantne analize na ispitivane kliničke faktore rizika nađeno je da su: NG, TM, Apgar, perinatalna asfiksija, broj dana na terapiji O<sub>2</sub>, MV, RDS, BPD, pneumonija, sepsa, anemija, IVH i NEC statistički značajno razlikuju između ROP i kontrolne grupe.

**Tabela 12.** Prikaz nedelje gestacije i telesne mase ROP i kontrolne grupe

|    |           | ROP |       | Kontrolna |       | Rezultati testiranja         |
|----|-----------|-----|-------|-----------|-------|------------------------------|
|    |           | N   | %     | N         | %     |                              |
| NG | <30       | 51  | 45.1% | 19        | 15.1% | $\chi^2 = 28.862$<br>p<0.001 |
|    | 30-32     | 48  | 42.5% | 67        | 53.2% |                              |
|    | >32       | 14  | 12.4% | 40        | 31.7% |                              |
| TM | <1000     | 18  | 15.9% | 8         | 6.3%  | $\chi^2 = 15.190$<br>p<0.001 |
|    | 1000-1500 | 83  | 73.5% | 82        | 65.1% |                              |
|    | >1500     | 12  | 10.6% | 36        | 28.6% |                              |

Iz navedenih podataka uočavamo da je najveći broj dece koji je zahtevao terapiju bio ispod 30 nedelje gestacije - 45,1%. ROP grupi pripada 12,4% dece sa nedeljom gestacije većom od 32. Što se tiče telesne mase najveći broj dece ROP grupe bio je sa TM u intervalu od 1000 do 1500g (73,5%). U grupi dece sa TM nižom od 1000g 15,9% je zahtevalo terapiju tj.pripadalo ROP grupi, a to predstavlja 69,2% dece od ukupnog broja dece u grupi sa TM nižom od 1000g.

Ukupno je 12,4% dece starije od 32 nedelje gestacije lečeno, a ROP grupi pripada 10,6% dece sa telesnom masom iznad 1500g (tabela 12). Deca ispod 32 nedelje gestacije bila su zastupljenija u grupi sa ROP - 87,6% nego u kontrolnoj grupi 68,3% (p = 0,013).

Bitno je uočiti da je 15,1% dece iz kontrolne grupe rođeno ispod 30 NG tj. nije razvilo aktivan oblik retinopatije, a da 12,4% dece starije od 32 NG pripada ROP grupi.

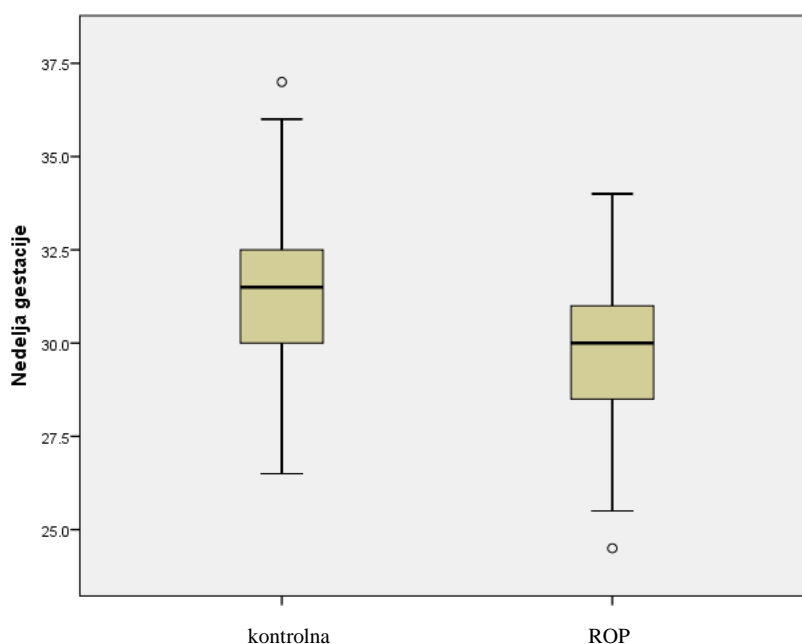
**Tabela 13.** Prikaz srednjih vrednosti NG i TM ROP, kontrolne grupe i celokupnog uzorka

|                  | NG  |             |       |         | TM  |          |     |         |
|------------------|-----|-------------|-------|---------|-----|----------|-----|---------|
|                  | N   | SD          | Min   | Maximum | N   | SD       | Min | Maximum |
| <b>ROP</b>       | 113 | 29,8 ± 1,93 | 24,50 | 34,00   | 113 | 1212±234 | 795 | 1850    |
| <b>Kontrolna</b> | 126 | 31,1±1,93   | 26,50 | 37,00   | 126 | 1377±279 | 800 | 2300    |
| <b>Ukupno</b>    | 239 | 30,7±2,06   | 24,50 | 37,00   | 239 | 1323±282 | 795 | 2300    |

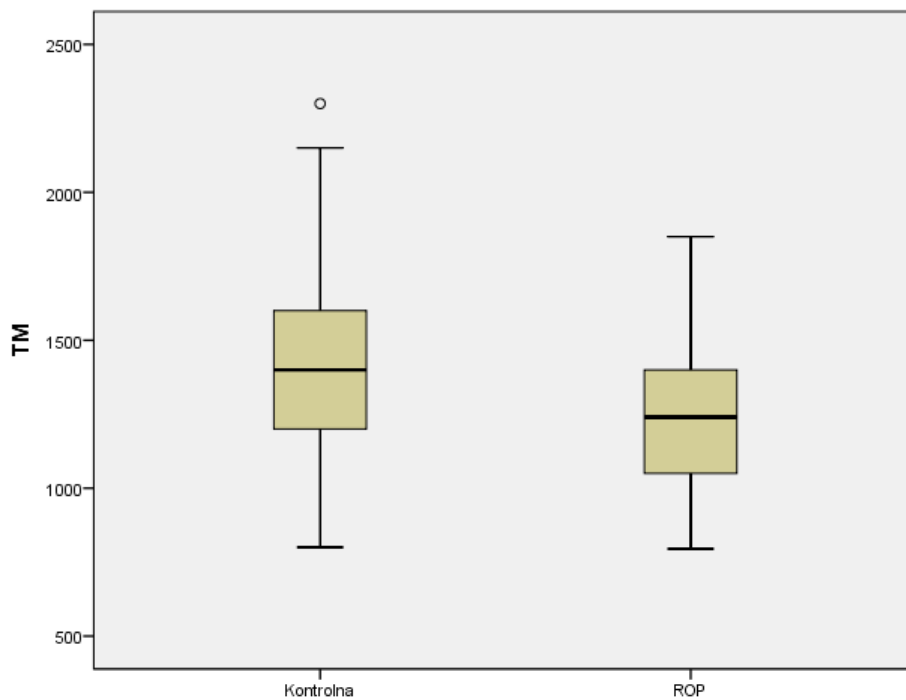
Srednja nedelja gestacije dece u ROP grupi je  $29,8 \pm 1,93$  (24,5NG do 34 NG), a u kontrolnoj grupi  $31,1 \pm 1,93$  (26,5NG do 37NG).

Prosečna telesna masa dece ROP grupe je  $1212 \pm 234$  (795g do 1850g). U kontrolnoj grupi prosečna telesna masa je  $1377 \pm 279$  (800g do 2300g).

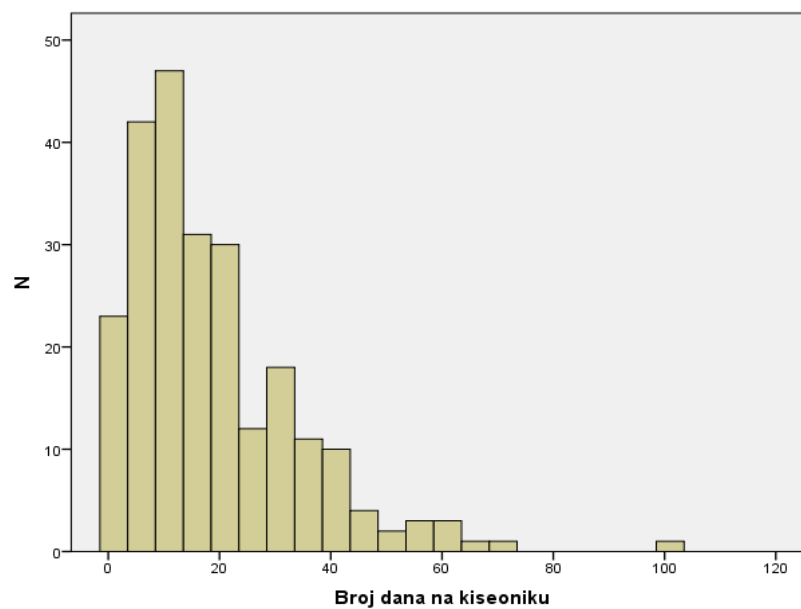
Najviša nedelja gestacije u ROP grupi je bila 34, a najveća telesna masa 1850g (tabela 13). U našem uzorku kontrolnoj grupi pripada dete rođeno u 26.5 NG, kao i dete rođeno sa TM 800g. Iz ovih podataka proizilazi da u našim uslovima moramo ostati na širokim odrednicama za skrining. Kriterijumom za skrining  $<32$  NG i  $<1500$  g na rođenju četrnaestoro dece sa aktivnim oblikom bolesti bilo bi propušteno.



**Grafikon 8.** Grafički prikaz srednje vrednosti nedelje gestacije ROP i kontrolne grupe



**Grafikon 9.** Grafički prikaz srednje vrednosti telesne mase ROP i kontrolne grupe



**Grafikon 10.** Broj dana na terapiji kiseonikom ispitivanog uzorka

Na grafikonu 10 je prikazana distribucija broja dana na kiseoniku ispitivanog uzorka.



**Tabela 14.** Prosečan broj dana na terapiji kiseonikom ROP i kontrolne grupe

|  |                  | Aritmet.<br>sredina | SD    | Perc. 25 | Perc. 75 |
|--|------------------|---------------------|-------|----------|----------|
| <b>Broj dana na terapiji O<sub>2</sub></b> | <b>ROP</b>       | 24.28 ±             | 17.30 | 11.00    | 35.00    |
|  | <b>Kontrolna</b> | 13.45 ±             | 10.68 | 5.00     | 19.00    |

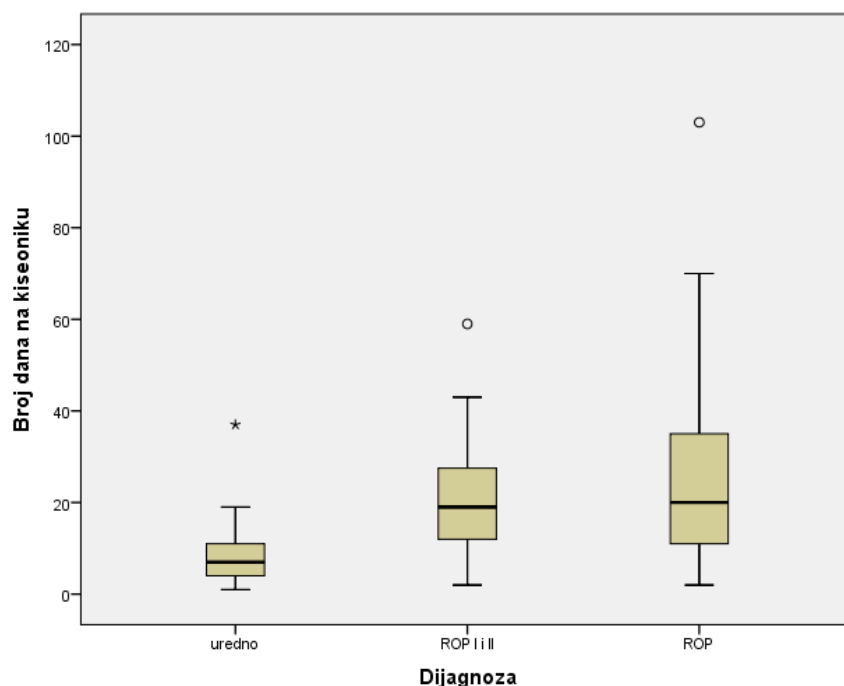
Prosečan broj dana na terapiji kiseonikom dece u ROP grupi je 24,28±17,30 dana, a dece u kontrolnoj grupi 13,4±10,68 dana. Postoji statistički značajna razlika između grupa ( $Z=-5,555$ ;  $p<0,001$ ).

**Tabela 15.** Prosečan broj dana na terapiji kiseonikom dece sa urednim, ROP I , ROP II i dece ROP grupe

|  |                   | Aritmet.<br>Sredina | SD    | Perc. 25 | Perc. 75 |
|--|-------------------|---------------------|-------|----------|----------|
| <b>Broj dana na terapiji O<sub>2</sub></b> | <b>Uredno</b>     | 8.0 ±               | 5.80  | 4.00     | 11.00    |
|  | <b>ROP I i II</b> | 20.25 ±             | 11.50 | 12.00    | 27.50    |
|  | <b>ROP</b>        | 24.28 ±             | 17.30 | 11.00    | 35.00    |

Deca čiji je oftalmološki nalaz bio potpuno uredan bila su prosečno na kiseoniku 8,01±5,80 dana. Deca sa dijagnozom ROPI i ROPII prosečno su bila na terapiji kiseonikom 20,25±11,50 dana, a deca sa aktivnim oblikom bolesti 24,28±17,30 dana. Postoji statistički značajna razlika između grupa ( $\chi^2=68,104$ ;  $p<0,001$ ).

Naknadnim poređenjima utvrđeno je da je su značajne razlike između uredan nalaz ROP I i II ( $p<0,001$ ); uredan nalaz i ROP ( $p<0,001$ ); ROP i ROP I i II ( $p=1,000$ ).



**Grafikon 11.** Broj dana na kiseoniku dece sa urednim,ROPI i ROPII nalazom i ROP grupe

**Tabela 16.** Prikaz dece sa pneumonijom ROP i kontrolne grupe u zavisnosti od broja dana na terapiji O<sub>2</sub>,NG i TM

| Pneumonija                           | N   | Aritmetička |          |          |          | Rezultati Testiranja |                     |
|--------------------------------------|-----|-------------|----------|----------|----------|----------------------|---------------------|
|                                      |     | sredina     | SD       | Perc. 25 | Percc 75 |                      |                     |
| Broj dana na terapiji O <sub>2</sub> | ROP | 48          | 26.04    | ± 16.69  | 14.50    | 33.00                | Z=-1,415<br>p=0,157 |
|                                      | K   | 29          | 20.07    | ± 9.57   | 12.00    | 26.00                |                     |
| NG                                   | ROP | 48          | 30.15    | ± 2.07   | 29.00    | 31.50                | t=-1,928<br>p=0,058 |
|                                      | K   | 29          | 31.03    | ± 1.72   | 30.00    | 31.50                |                     |
| TM                                   | ROP | 48          | 1,251.25 | ± 248.25 | 1,070.00 | 1,400.00             | t=-0,185<br>p=0,854 |
|                                      | K   | 29          | 1,261.72 | ± 236.19 | 1,100.00 | 1,480.00             |                     |

Nije uočena statistički značajna razlika između dece sa dijagnozom pneumonije u odnosu na broj dana terapije sa O<sub>2</sub>,NG i TM ROP i kontrolne grupe. grupe.

**Tabela 17.** Prikaz dece sa BPD ROP i kontrolne grupe u zavisnosti od broja dana na terapiji O<sub>2</sub>,NG i TM

| BPD                                  |     | Aritmetička |         |         |          |          | Rezultati testiranja |
|--------------------------------------|-----|-------------|---------|---------|----------|----------|----------------------|
|                                      |     | N           | sredina | SD      | Perc. 25 | Percc 75 |                      |
| Broj dana na terapiji O <sub>2</sub> | ROP | 28          | 43.57   | ±18.60  | 30.50    | 55.50    | Z=-1,812<br>p=0,070  |
|                                      | K   | 11          | 32.55   | ±12.64  | 20.00    | 42.00    |                      |
| NG                                   | ROP | 28          | 28.34   | ±1.55   | 27.50    | 29.00    | t=-1,892<br>p=0,081  |
|                                      | K   | 11          | 29.95   | ±2.66   | 28.00    | 33.00    |                      |
| TM                                   | ROP | 28          | 991.61  | ±114.79 | 900.00   | 1,085.00 | t=-0,027<br>p=0,978  |
|                                      | K   | 11          | 992.73  | ±114.64 | 850.00   | 1,080.00 |                      |

Nije uočena statistički značajna razlika između dece sa dijagnozom BPD u odnosu na broj dana terapije sa O<sub>2</sub>, NG i TM ROP i kontrolne grupe (tabela 17).

**Tabela 18.** Prikaz dece sa RDS ROP i kontrolne grupe u zavisnosti od broja dana na terapiji O<sub>2</sub>,NG i TM

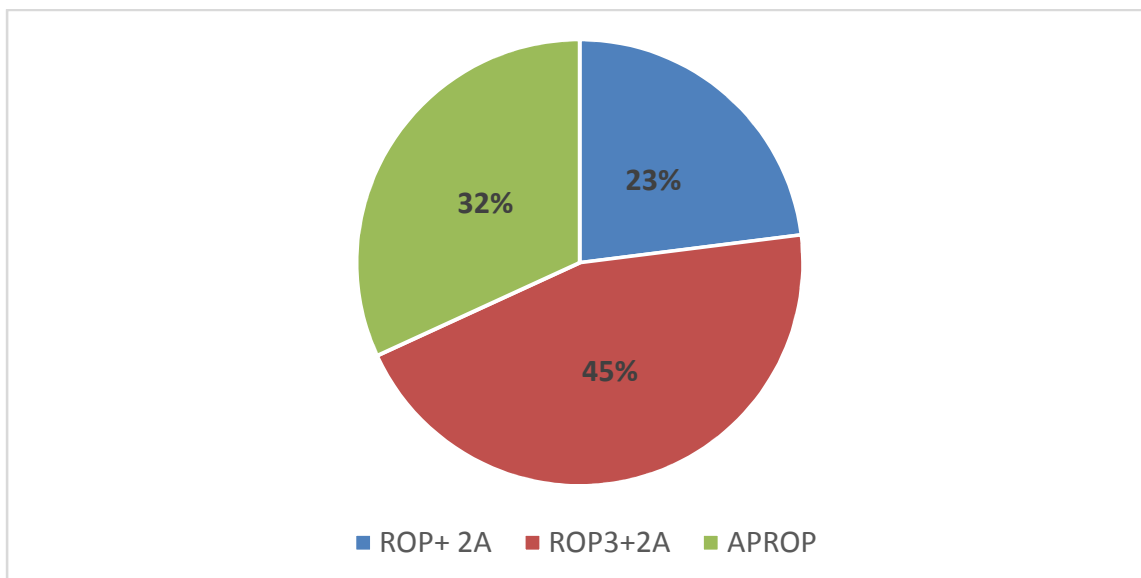
| RDS                                  |     | Aritmetička |          |         |          |          | Rezultati testiranja |
|--------------------------------------|-----|-------------|----------|---------|----------|----------|----------------------|
|                                      |     | N           | sredina  | SD      | Perc. 25 | Percc 75 |                      |
| Broj dana na terapiji O <sub>2</sub> | ROP | 94          | 26.48    | ±17.73  | 13.00    | 37.00    | Z=-2,709<br>p=0,007  |
|                                      | K   | 69          | 19.01    | ±10.90  | 11.00    | 26.00    |                      |
| NG                                   | ROP | 94          | 29.56    | ±1.77   | 28.50    | 31.00    | t=-4,249<br>p<0,001  |
|                                      | K   | 69          | 30.78    | ±1.84   | 30.00    | 32.00    |                      |
| TM                                   | ROP | 94          | 1,194.47 | ±216.87 | 1,040.00 | 1,350.00 | t=-1,848<br>p=0,067  |
|                                      | K   | 69          | 1,263.19 | ±256.87 | 1,100.00 | 1,400.00 |                      |

Nije uočena statistički značajna razlika između dece sa dijagnozom RDS u odnosu na broj dana terapije sa O<sub>2</sub> i TM ROP i kontrolne grupe. Deca ROP grupe sa DRS imala su statistički značajno nižu NG od dece kontrolne grupe (p<0.001).

**Tabela 19.** Modelovanje povezanosti kliničkih faktora rizika ROP i kontrolne grupe

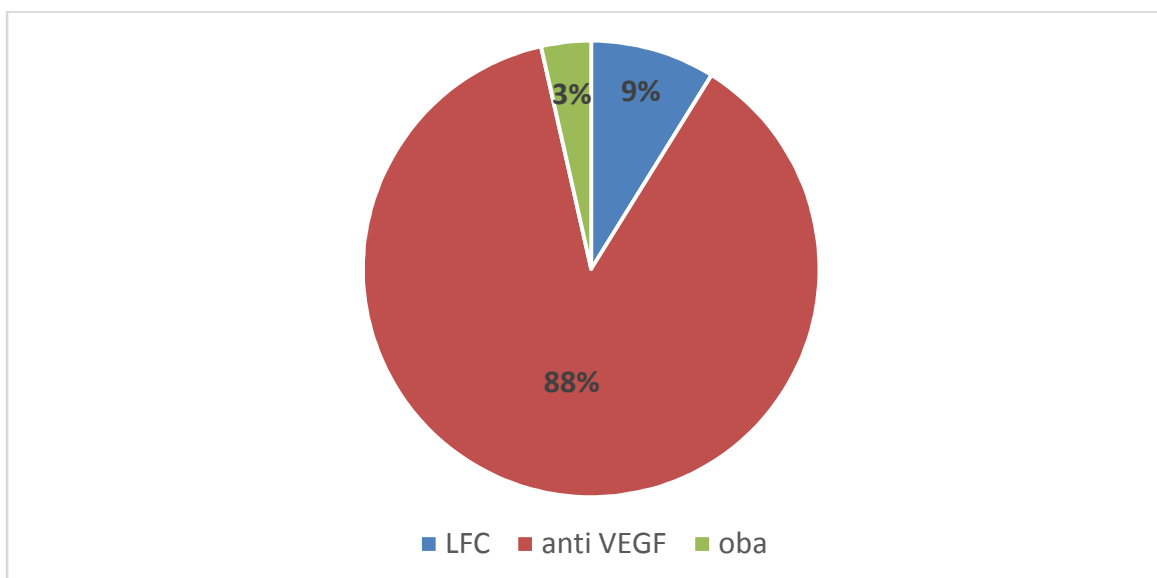
|                            | p vrednost | OR    | 95 % IP za OR |        |
|----------------------------|------------|-------|---------------|--------|
| NG                         | .014       | .767  | .620          | .948   |
| TM                         | .021       | 1.002 | 1.000         | 1.004  |
| Apgar                      | .001       | .637  | .484          | .837   |
| Br. dana na O <sub>2</sub> | .701       | 1.008 | .968          | 1.050  |
| PA                         | .695       | 1.241 | .422          | 3.646  |
| MV                         | .438       | .681  | .258          | 1.797  |
| RDS                        | .996       | 1.002 | .360          | 2.788  |
| BPD                        | 1.000      | 1.000 | .309          | 3.230  |
| Pneumonija                 | .005       | 3.484 | 1.450         | 8.371  |
| Sepsa                      | .031       | 2.800 | 1.099         | 7.136  |
| Anemija                    | .083       | 2.071 | .910          | 4.714  |
| IVH                        | .015       | 3.622 | 1.290         | 10.171 |
| NEC                        | .025       | 3.758 | 1.184         | 11.925 |
| NG                         | .008       | .772  | .638          | .934   |
| TM                         | .016       | 1.002 | 1.000         | 1.004  |
| Apgar                      | .000       | .632  | .489          | .818   |
| Pneumonija                 | .002       | 3.741 | 1.643         | 8.517  |
| Sepsa                      | .019       | 2.919 | 1.191         | 7.155  |
| Anemija                    | .069       | 2.128 | .944          | 4.799  |
| IVH                        | .011       | 3.710 | 1.347         | 10.218 |
| NEC                        | .020       | 3.868 | 1.233         | 12.128 |

Na osnovu multivarijantne analize zaključujemo da su nezavisni faktori rizika za razvoj ROP-a kod prevremeno rođene dece obuhvaćene našim ispitivanjem niska nedelja gestacije, niska telesna masa, pneumonija, sepsa, intraventrikularna hemoragija i nekrotični enterokolitis ( $p < 0,05$ ).



**Grafikon 12.** Dijagnoze pod kojim su tretirana deca ROP grupe

Deca ROP grupe lečena su ukoliko su imala dijagnoze ROP3+2A (njih 51, (45%)), AP ROP (njih 36 (32%)) i ROP+2A (njih 26 (23%)).



**Grafikon 13.** Vrste terapije dece ROP grupe

Kod 99 (88%) dece primenjena je intravitrealna aplikacija anti VEGF, njih10 (9%) lečeno je laserfotokoagulacijom (LFC) retine, a 4 (3%) dobilo je obe terapije.

**Tabela 20.** Prikaz prosečnog broja dana u kojem je data terapija

|               | <b>Aritmetička<br/>sredina</b> | <b>SD</b> | <b>Perc.25</b> | <b>Perc. 75</b> | <b>Minimum</b> | <b>Maksimum</b> |
|---------------|--------------------------------|-----------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| <b>Dan Th</b> | 42.64 ±                        | 16.19     | 33.00          | 49.00           | 20.00          | 132.00          |

Deca ROP grupe prosečno su primila terapiju u  $42,64 \pm 16,19$  danu posle rođenja. S obzirom da je srednja nedelja gestacije dece ROP grupe  $29,8 \pm 1,9$  proizilazi da su deca tretirana u 36 NG postkonceptijski, što znači da je ROP bolest koja se razvija i završava u veoma kratkom vremenskom intervalu od svega nekoliko nedelja.

## 5. DISKUSIJA

### Analiza učestalosti polimorfizama T-786 C i 4a/4b eNOS gena prevremeno rođene dece

**Tabela 21.** Podaci o učestalosti polimorfnog alela C (T-786C) u različitim populacijama (116)

| Populacija                   | T     | C     |
|------------------------------|-------|-------|
| Italija                      | 0.514 | 0.486 |
| Španija                      | 0.505 | 0.495 |
| Velika Britanija             | 0.538 | 0.462 |
| Finska                       | 0.692 | 0.308 |
| Indija                       | 0.788 | 0.212 |
| Australija                   | 0.622 | 0.378 |
| Severna Amerika              | 0.761 | 0.239 |
| Srbija                       | 0,716 | 0,284 |
| Rezultati našeg istraživanja | 0.652 | 0.348 |

Učestalost C alela u evropskim populacijama je od 29% do 49%. Najviša učestalost C alela je uočena u Španiji. Najniže učestalosti su zabeležene u Skandinavskim zemljama. U australijskoj populaciji učestalost C alela je 37,8%. Učestalost alela u beločkim van evropskim populacijama je vrlo slična učestalostima u Evropi. Najniža učestalost je u azijskoj populaciji gde je frekvencija alela C 21,2% (116,ALFRED database). Naše istraživanje je pokazalo učestalost C alela 34,8%, što je u skladu sa učestalostima u Evropi. Učestalost C alela u ROP grupi je 34,2%, a 35,3% u kontrolnoj grupi.

Učestalost CC genotipa u populaciji Kavkazoida (obuhvata sve etičke grupe) je 11%, a heterozigota 50%. U različitim etničkim evropskim grupama učestalost CC genotipa je 30%, a heterozigota 56%. U Italiji učestalost heterozigota je 49%. U populacijama Afrike i Azije dominantan je TT genotip (116,ALFRED database). U našem istraživanju učestalost CC homozigota je 8,6%, što je u skladu sa učestalošću CC genotipa kod Kavkazoida.

**Tabela 22.** Podaci o učestalosti polimorfnog alela 4a (4a/4b) u različitim populacijama (116)

| <b>Populacija</b>                   | <b>4a</b> | <b>4b</b> |
|-------------------------------------|-----------|-----------|
| <b>Italija</b>                      | 0.160     | 0.840     |
| <b>Španija</b>                      | 0.170     | 0.830     |
| <b>Grčka</b>                        | 0.148     | 0.852     |
| <b>Rusija</b>                       | 0.193     | 0.807     |
| <b>Indija</b>                       | 0.190     | 0.880     |
| <b>Australija</b>                   | 0.150     | 0.850     |
| <b>Severna Amerika</b>              | 0.112     | 0.871     |
| <b>Srbija</b>                       | 0.167     | 0.833     |
| <b>Rezultati našeg istraživanja</b> | 0,191     | 0,809     |

Učestalost 4a alela 4a/4b polimorfizma u intronu 4 u evropskim populacijama je od 10% do 27%. Najniže učestalosti polimorfnog alela je u Africi tj.u crnačkoj populaciji i iznosi 3,5% (116,ALFRED database). Naše ispitivanje je pokazalo učestalost 4a alela 19,1%. Frekvencija u našem istraživanju je u saglasnosti sa frekvencom dobijenom u Rusiji. Možemo reći da je učestalost 4a alela u našoj populaciji u skladu sa učestalostima opisanim u okruženju. Učestalost ređeg 4a alela u ROP grupi je 22,3% prema 16,1% u kontrolnoj grupi.

U našem ispitivanju učestalost heterozigota polimorfizma 4a/4b je 31% što je u saglasnosti sa opisanim rezultatima u evropskoj populaciji gde se učestalost 4a/4b genotipa kreće od 16% do 34%.

Samo dve studije su analizirale polimorfizme eNOS gena u etiologiji ROPa. Jedna studija identifikovala je minor T786-C i G894-T alele eNOS gena kao značajane faktore rizika u razvoju ROPa, i našla jaku povezanost između tih polimorfizma eNOS gena i ozbiljnosti bolesti u belaca i Afroamerikanaca (82).

Rusai i sar. na populaciji prevremeno rođene dece dobili su učestalost ređeg C alela 32% u grupi sa aktivnim oblikom ROPa (73). Učestalost C alela u grupi dece koja nisu tretirana je 33%. U ovoj studiji nije bilo statistički značajne razlike u distribuciji genotipova i alela T-786C između ROP i kontrolne grupe. U istoj studiji učestalost ređeg



4a alela je 24% u ROP grupi i 15% kontrolnoj grupi. U ovom radu uočeno je da je eNOS 4aa genotip nezavisni faktor rizika za ozbiljne stadijume ROPa.

U našem istraživanju učestalost C alela u ROP grupi je 34,2%, a 35,3% u kontrolnoj grupi, što takođe nije statistički značajno. Učestalost ređeg 4a alela u ROP grupi je 22,3% prema 16,1% u kontrolnoj grupi. Ispitivanjem genotipova i alela eNOS 4a/4b polimorfizama u našem istraživanju uočena je razlika između ROP i kontrolne grupe prevremeno rođene dece, ali ova razlika nije statistički značajna.

Statistički značajna razlika je uočena kod dece ženskog pola po dominantnom modelu (4bb/4ab+4aa). Deca ženskog pola sa ispoljenim ROP-om su češće nosioci 4ba i 4aa genotipova od dece ženskog pola u kontrolnoj grupi. Bez obzira na uočenu veću učestalost 4ba i 4aa genotipova dece sa ROP-om multipla regresiona analiza nije pokazala da je 4a alel faktor rizika za razvoj teških formi ROPa kod devojčica.

Rusai i sar. opisali su muški pol kao faktor rizika za razvoj ozbiljnih stadijuma ROPa, ali naši rezultati nisu pokazali razlike u distribuciji polova između ROP i kontrolne grupe.

Učestalost genotipova između ROP i kontrolne grupe po dominantnom (4bb/4ab+4aa, TT/TC+CC) i recesivnom (4bb+4a/4aa, TC+TT/CC) modelu takođe nije pokazalo statistički značajnu razliku.

Analizirali smo povezanost između 4a/4b eNOS polimorfizma i ROP koja zahteva terapiju kod prevremeno rođene dece. Posle prilagođavanja za pol, telesnu masu, nedelju gestacije, Apgar skor i broj dana na terapiji kiseonikom, logistička regresiona analiza ne pokazuje statistički značajnu povezanost između 4a/4b genotipova i razvoja ozbiljnih oblika ROP-a kod prevremeno rođene dece. Nosioци 4aa genotipa oba pola eNOS 4a/4b polimorfizma imali su nižu nedelju gestacije u odnosu na ostale grupe genotipova (4bb i 4ba). Ispitivana prevremeno rođena deca nosioci 4aa genotipa imaju nižu NG, TM i Apgar skor, a veći broj dana provedenih na terapiji kiseonikom u odnosu na ostale grupe genotipova (4bb i 4ba). Ispitivanjem srednje vrednosti NG statistički značajna razlika se uočava po recesivnom modelu tj., nosioci 4aa genotipa imaju značajno niže srednje vrednosti NG nego nosioci 4bb i 4ba genotipa. Multivarijantna linearna regresiona analiza sa polom, TM i Apgar skorom kao kovarijatama nije pokazala asocijaciju 4a/4b genotipa sa vrednostima NG kod ispitivane prevremeno rođene dece.

Naši rezultati pokazuju da su gotovo svi otkriveni 4aa genotipovi (5 od 6) bili prisutni u grupi dece sa nedeljom gestacije ispod 30. U literaturi ovaj polimorfizam nije ispitivan kao faktor rizika za prevremeni spontani porođaj. Nedavne studije pokazuju značajne vezu između eNOS (Glu298Asp) polimorfizma i idiopatskih rekurentnih spontanih pobačaja i nalaze znatno veću frekvencu mutanat alela u spontano abortiranom fetusnom materijalu (117). Gibson i sar. objavili su da su polimorfizmi azot oksida povezani sa prematuritetom i sugeriše da oni mogu doprineti riziku za spontani prevremeni porođaj (118).

U našoj populaciji ispitivanje učestalosti polimorfizama eNOS gena rađeno je na adultnim pacijentima (119). Analizom polimorfizma T-786C dobijene su sledeće učestalosti - TT genotipa 48,5%, CT genotipa 47,0%, CC genotipa 4,5% . Učestalost ređeg C alela je 28,0%. Analizom polimorfizma 4a/4b dobijene su učestalosti – genotipa bb 70,5%, heterozigota ba 25,7% i homozigota aa 3,8%. Učestalost ređeg 4a alela je 16,7%.

Genski polimorfizmi mogu uticati na ekspresiju i stabilnost genskih produkata koji normalno doprinose angiogenezi retine, poput VEGFa i eNOS. Objavljeni podaci u različitim populacijama opisuju oprečne rezultate pri analizi genskih polimorfizama u VEGF genu. Neki od njih podržavaju hipotezu da je VEGF igra ključnu ulogu u angiogenezi i da je povezan sa progresijom ROP-a u poodmakloj fazi (110,111). Neki autori nisu pronašli nikakvu vezu između polimorfizama VEGF gena sa razvojem ROP-a. Ispitivani su polimorfizmi C-634G, C-405G i C-936G VEGF gena (51,112,113). Iako nije uočena povezenost ispitivanih genotipova i alela polimorfizama za VEGF gen sa težim stepenom ROPa, sugerisano je da je angiogeneza kompleksan process i da genetički faktori deluju zajedno se faktorima okoline. Primećeno je da teži stepen ROP-a kod neke dece progredira, a kod neke sa sličnim kliničkim nalazima spontano povlači. Bizzarro i sar. navode da genetski faktori imaju udela 70,1 % u nastaku retinopatije prevremeno rođene dece (57).

Polimorfizmi eNOS gena su dokazani kao faktori rizika za retinopatije sa sličnom patogenezom kao ROP – dijabetična retinopatija i senilna degeneracija makule. Objavljeni podaci ukazuju da su genski polimorfizmi T-786C, 4b/4a, Glu298Asp (114) i C774T (115) u eNOS genu faktori rizika za dijabetičnu retinopatiju. Mogu biti korisni

kao markeri povećane podložnosti za tešku dijabetičku nefropatiju i retinopatiju (114,115). Povezani su sa dijabetičkom retinopatijom kod dijabetesa tipa 1 i sa brojnim kardiovaskularnim bolestima – ateroskleroza koronarnih arterija, esencijalna hipertenzija i poremećajima cerebralne cirkulacije (43,44,74,75).

Bruks je u svojoj studiji pokazao da je kiseonikom indukovana vazoobliteracija u retini redukovana primenom NOS inhibitora ili ciljanim ometanjem eNOS gena na modelu miša, ukazujući na štetanu ulogu NO u prvoj fazi ROPa (120). Bošamp je utvrdio da inhibicija NOS pogoršala retinalnu vazoobliteraciju tokom izlaganja hiperoksiji na modelu pacova (121).

Vazoobliterativna prva faza ROPa dovodi do hipoksije retine, koja prethodi drugoj fazi koju karakteriše abnormalna vazoproliferacija. Dokazi sugerišu da NO može da inhibira angiogenezu pod nekim okolnostima, međutim, podaci su kontroverzni. Mišiji implant i modeli pilećih horialantoičnih membrana se mogu koristiti za inhibiciju angiogeneze pomoću NO-donor S-nitrozo-N acetil glutationa (122). Ando je koristio eNOS genetski modifikovane miševe sa ishemijskom retinopatijom i detektovao značajano smanjenje neovaskularizacije (123). Campochiaro je utvrdio da NO u niskim koncentracijama aktivira ekspresiju VEGFa, koji onda indukuje neoangiogenezu (124).

Tsukada i Hoffmann pokazali su jaku vezu između eNOS 4a/4b polimorfizma i koncentracije NO u plazmi kod zdravih ispitanika (125,126). Li je u istraživanju došao do zaključka da su NO metabolički nivoi bili manji kod onih koji nose 4a alel (127). Pokazano je da se nuklearni proteini mogu vezivati za 27 - bp ponavljajuću sekvencu i tako smanjiti transkripciju gena. Smanjena produkcija NO može pogoršati vazoobliteraciju krvnih sudova retine tokom prve faze ROPa (120), a zatim neoangiogenezu u drugoj fazi (124). Takođe je moguće da eventualna povezanost između polimorfizma eNOS gena i težine ROP nije u direktnoj vezi sa koncentracijom NO. eNOS gen se nalazi u blizini drugih gena, npr T - ćelijski antigen receptora konstantnog beta – lanaca, koji je dokazano snažno povezan sa podložnošću za mikrovaskularne komplikacije kao što je retinopatija kod dijabetesa tip 1 (128). Stoga je moguće da su teži oblici ROPa rezultat neravnoteže sa drugim genskim mutacijama.

U multifaktorijskom oboljenju kao što je ROP, ekspresija fenotipa zavisi od interakcije mnogih gena i uticaja okoline. Da bi se predvideo razvoj ozbiljnih stadijuma ROPa neophodno je da se analizira više gena na većem uzorku dece sa ROPom.

## **Analiza kliničkih faktora rizika**

### *Nedelja gestacije i telesna masa kao faktori rizika*

Niska nedelja gestacije (NG) i niska telesna masa (TM) su preduslovi za razvoj retinopatije i u literaturi prihvaćeni faktori rizika (13,23,24,25,108,129). Vaskularizacija retine se završava u 42 NG. Prevremenim rođenjem grubo se narušava vaskulogeneza i menjaju uslovi njenog daljeg razvoja. Niska TM je direktno posledica prevremenog rođenja.

Da je prevremeno rođenje usvojen i dominantan faktor rizika za razvoj težeg stepena ROPa ukazuje i rad autora sa Novog Zelanda. U radu se navodi da se rizik za teški stepen ROP-a znatno povećava sa nezrelošću tj. deca rođena pre 25 NG su u riziku dvadeset puta većem da razviju teži stepen retinopatije u odnosu na decu rođenu posle 28 NG (129).

Srednja vrednost nedelje gestacije dece ROP grupe u našem istraživanju je  $29,96 \pm 1,93$  dok je u kontrolnoj grupi  $31,42 \pm 1,93$  što se statistički značajno razlikuje ( $p < 0,001$ ). Srednja vrednost nedelje gestacije dece ROPI i ROPII je  $30,09 \pm 1,50$ . Nije bilo statistički značajne razlike u srednjoj vrednosti NG između grupe ROPI i ROPII u poređenju sa ROP grupom ( $p = 0,955$ ). Ovaj podatak ukazuje na činjenicu da i pored niske NG neka deca ne razviju teži stepen ROPa.

Uočava se da je učestalost ROP-a najveća u grupi ispod 30 NG (45,1%), visoka u grupi 30-32NG (42,5%), a da se smanjuje sa zrelošću ali je prisutna i u grupi iznad 32 NG (12,5%). Činjenica da se ROP u našoj sredini javlja i kod dece sa NG većom od 32 ukazuje na prisustvo drugih faktora rizika i na oprez prilikom selekcije dece za oftalmološki skrining.

Srednja vrednost telesne mase dece ROP grupe je  $1236,73 \pm 236,37$ , a dece u kontrolnoj grupi  $1400,40 \pm 298,03$ , što se statistički značajno razlikuje ( $p < 0,001$ ). Prosečna telesna masa dece sa ROPI i ROPII nalazom je  $1206,96 \pm 207,01$ . Nije nađena statistički značajna razlika između ROPI i ROPII grupe u poređenju sa ROP grupom ( $p = 1,000$ ). Deca sa ROPI i ROPII nalazom pripadaju kontrolnoj grupi, ali zahtevaju izuzetan oprez u toku trajanja oftalmološkog skrininga, jer mogu preći u ozbiljnije stadijume bolesti koji zahtevaju terapiju.

Najveći broj dece sa aktivnim oblikom bolesti je u grupi od 1000-1500g (73,5%). Broj dece sa aktivnim oblikom bolesti se smanjuje sa porastom telesne mase (iznad 1500g) što je i očekivano. U našem uzorku 10,6% dece TM preko 1500g i 12,4% dece sa  $NG > 32$  razvilo je oblike ROP-a koji su zahtevali terapiju. U svetu nema jedinstvenog stava oko kriterijuma za skrining i oni se razlikuju od zemlje do zemlje. Direktno su vezani za nivo i razvijenost neonatalne nege kao i za dužinu i koncentraciju primenjenog terapijskog  $O_2$ . Kriterijumom za skrining koji se bazira na  $NG < 32$  i  $TM < 1500g$  12,4% dece sa aktivnim oblikom bolesti bilo bi propušteno. U našoj zemlji i ranije su testirani kriterijumi za skrining sa ciljem da se iz skrininga isključe deca kojoj nije potreban pregled, a u isto vreme da se ne propuste deca sa aktivnim stadijumom bolesti kojima je neophodna terapija (86). Zaključeno je da i dalje moramo ostati na širokim kriterijumima za skrining ( $NG < 36$  i  $TM < 2000g$ ), što potvrđujemo i ovim istraživanjem. I drugi autori skreću pažnju na rizik da se propusti aktivan stadijum bolesti koji zahteva terapiju kod dece rođene sa  $TM > 1500g$  i  $NG > 32$  (24).

U našem istraživanju uočena je niska učestalost bolesti u grupi ispod 1000 g. Od ukupnog broja dece ROP grupe 15,9% ima  $TM < 1000g$ . Objašnjenje je u visokom stepenu preživljavanja prevremeno rođene dece ispod 1000g u visoko razvijenim zemljama (SAD, Australija, Velika Britanija), tako da je u radovima koji dolaze iz tih područja najveća učestalost bolesti u grupi ispod 1000g. U velikoj multicentričnoj CRYO-ROP studiji prosečna TM na rođenju je bila 831g, a u ETROP studiji 740g. (130). Učestalost bolesti koju smo mi dobili u grupi ispod 1000g (15,9%) nalazimo u radovima koji dolaze iz srednje razvijenih zemalja (108,131). Ova razlika je rezultat primene napredne tehnologiji i nauke bogatih zemalja iz koje proizilazi bolja neonatalna nega i zdravstvena zaštita na visokom nivou. To rezultuje visokim stepenom preživljavanja dece izuzetno niske telesne mase. U srednje razvijenim zemljama sredstva koja se izdvajaju su nedovoljna i bez

mogućnosti pružanja visokog stepena neonatalne nege. To kao rezultat ima manje preživljavanje dece ispod 1000g.

I mi smo primenom multiple regresione analize, u skladu sa literaturom, pokazali da nezrelost tj. niska nedelja gestacije i niska telesna masa na rođenju predstavljaju nezavistan faktor rizika za razvoj težih stadijuma ROP-a.

#### *Pol kao faktor rizika*

Muški pol je više udružen kako sa blažim oblicima ROP-a koji ne zahtevaju terapiju (ROPI, ROPII), tako i sa teškim oblicima ROP-a gde je terapija neophodna (22,23,30,73,129,132). Rusai K. opisao je muški pol kao faktor rizika za razvoj teške ROP (73), mada postoje podaci koji ukazuje da pol ne predstavlja faktor rizika (131).

U našem uzorku u ROP grupi bilo je 58 (51,3%) dečaka i 55 (48,7%) devojčica, a u kontrolnoj 58 (46,0%) dečaka i 68 (54,0%) devojčica. Naši rezultati nisu pokazali razlike u distribuciji polova između ROP i kontrolne grupe ( $\chi^2=0,669$ ;  $p=0,413$ ).

#### *Način završetka porođaja i višeploidne trudnoće kao faktor rizika*

Rad Mansonija i sar. ukazuje da je prirodan porođaj nezavistan faktor rizika za razvoj težeg oblika ROP-a koji zahteva terapiju kod dece ispod 1000g (133). Predlaže da se uvede dodatni oftalmološki nadzor za prevremeno rođenu decu sa izuzetno malom telesnom masom, rođenu prirodnim putem. Ova studija ne opisuje da je rođenje prirodnim putem značajno povezano sa drugim posledicama prematuriteta (intraventrikularnim krvarenjem, bronhodisplazijom, nekrotizirajućim enterokolitisom).

U našem uzorku u ROP grupi 56,6% dece je rođeno carskim rezom, 43,4% prirodnim putem, dok je u kontrolnoj grupi 57,9% dece rođeno carskim rezom, a 42,1% prirodnim putem. Nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti rađanja prirodnim putem i carskim rezom između ROP i kontrolne grupe ( $p=0,839$ ), niti je multiplom regresionom analizom prirodan porođaj izdvojen kao nezavistan faktor rizika.

Višeploidne trudnoće same po sebi su faktor rizika za prevremeni porođaj. S druge strane deca iz višeploidnih trudnoća pre sazrevaju i zrelija su u odnosu na NG (134). Višeploidne trudnoće se navode u literaturi kao faktor rizika za teže oblike ROPa (30).

U našem istraživanju učestalost dece rođene iz višeplođnih trudnoća u ROP grupi je 34,5%, a u kontrolnoj grupi dece 26,2%. Nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti između ROP i kontrolne grupe ( $\chi^2 = 2,356$ ;  $p = 0,308$ ).

#### *Perinatalna asfiksija kao faktor rizika*

Perinatalna asfiksija je mnogo češća i ozbiljnija kod prevremeno rođene dece u odnosu na decu rođenu u terminu. U proceni asfiksije najčešće se pozivamo na Apgar skor. Prevremeno rođena deca imaju lošiji tonus i reflekse što je povezano sa njihovom neuro-muskularnom nezrelošću. Boja kože po rođenju je lividna, imaju iregularne respiracije i bradikardična su. Zbog svega navedenog Apgar skor je najčešće nizak, a samim tim dijagnoza perinatalne asfiksije česta. Apgar skor dece u ROP grupi u našem istraživanju bio je  $4,73 \pm 1,70$  prema  $6,22 \pm 1,61$  dece u kontrolnoj grupi, što je statistički značajno ( $p < 0,001$ ).

Asfiksija predstavlja podlogu za razvoj drugih teških stanja, a može ukazati i na intrauterinu patnju ploda. Neki autori ukazuju da intrauterina asfiksija ima bitnu ulogu u patogenezi ROP-a (135). U literaturi se asfiksija tretira kao značajan faktor rizika za razvoj težih oblika ROPa. (134,136).

U našem istraživanju deca sa perinatalnom asfiksijom imala su statistički značajno nižu NG ( $t = -8,973$   $p < 0,001$ ) i nižu TM ( $t = -12,432$   $p < 0,001$ ). Perinatalna asfiksija je visoko statistički češće bila prisutna u ROP grupi ( $p < 0,001$ ), ali mutipla regresiona analiza nije pokazala da predstavlja nezavistan faktor rizika za razvoj ROP-a.

#### *Intrauterini zastoj rasta kao faktor rizika*

Brojni podaci iz literature navode da deca mala za gestacijsku nedelju (SGA- Small for Gestational Age), u poređenju sa decom odgovarajuće gestacijske zrelosti (AGA-Appropriate for Gestational Age) imaju veći rizik za razvoj ROPa (129,137,138,139). Razlog za povećan rizik od ROPa objašnjava se kombinacijom više faktora, kao što su intrauterina hronična hipoksija, izmenjen nivo prostanoida, faktora rasta, endotelina i nedostatak antioksidanata (30). Deca rođena sa TM ispod 3 percentila

su u četiri puta većem riziku da razviju ROP u odnosu na decu rođenu sa TM između 25 i 75 percentila (139).

U našem istraživanju analizirali smo prisustvo intrauterinog zastoja rasta u ROP i kontrolnoj grupi tj. učestalost ROPa u dece male za gestacijsku zrelost u odnosu na decu odgovarajuće gestacijske zrelosti. Nije uočena statistički značajna razlika između ROP i kontrolne grupe ( $p=0,378$ ). U literaturi postoje radovi koji su u saglasnosti sa našim rezultatom i navode da su faktori rizika za razvoj ROP-a slični između dece u grupi SGA i AGA (140).

### *Terapija kiseonikom kao faktor rizika*

Primena kiseonika u terapijske svrhe kao faktora rizika je poznata od vremena otkrića retrolentalne fibroplazije i epidemije slepila prevremeno rođene dece. Do danas se nedovoljno zna koliko je  $O_2$  potrebno dati prevremeno rođenoj deci koja intrauterino rastu sa zasićenošću arterijske krvi 70-80% (141,142). Do 1950 god. primena kiseonika bila je neograničena (period "prve epidemije" ROP-a), ali ni u tim uslovima neka deca nisu razvila ROP. U periodu 1950-1960 god. primena kiseonika je bila ograničena na <40%, jer je prekomerna upotreba kiseonika dovedena u vezu sa slepilom. Tako ograničenje oksigenoterapije rezultiralo je smanjenjem učestalosti ROP-a, ali ga nije isključilo. Na tako ograničenoj oksigenoterapiji povećao su se mortalitet i morbiditet prevremeno rođene dece. Period osamdesetih godina prošlog veka ("druga epidemija") povezan je sa većim preživljavanjem dece ispod 1000g. Win Tin je objavio članak u kome navodi se da je kiseonik u poslednjih 50 godina u neonatologiji primenjivan više nego i jedan drugi lek (141). Primena i doziranje kiseonika predstavlja veliki izazov u neonatologiji i danas.

Ola D. sugeriše da su potrebna nova istraživanja koja bi dala odgovor i preporuke za korišćenje kiseonika kod najekstremnije prevremeno rođene dece (23-27 NG). Ovi autori ukazuju da izlaganja hiperoksiji po rođenju dovode do oksidativnog stresa koji može uticati na apoptozu i rast ćelija. To ima dugoročne posledice na rast i razvoj celog organizma (142).

Rad Wang i sar. ispitivao je reanimaciju dece rođene od 23 do 32 NG sa različitim koncentracijama kiseonika. Jedna grupa reanimirana je sobnim vazduhom, a



druga sa 100% kiseonika. Njuhov zaključak je da se sobnim vazduhom nije ostvarila željena saturacija, te se ne preporučuje u reanimaciji prevremeno rođene dece. Dobijena saturacija kiseonika u trećem minutu života je 55% u grupi koja je reanimirana sobnim vazduhom prema 87% u grupi koja je reanimirana korišćenjem 100% kiseonika (143).

Askie i sar. su na osnovu procene ograničene u odnosu na liberalnu ekspoziciju kiseonika za sprečavanje mortaliteta i morbiditeta prevremeno rođene dece male telesne mase zaključili da prevremeno rođena deca ili deca sa niskom TM često zahtevaju suplementaciju kiseonikom. Najteži zadatak neonatologa je da se obezbedi adekvatna suplementacija tj. da se ne naudi u neograničenoj primeni. Rezervisana primena smanjuje rizik ali su potrebna dalja istraživanja za odgovorom koji je najbolji nivo suplementacije (144).

Američka akademija pedijatara ukazuje na održavanje optimalnog pritiska kiseonika od 50 do 80 mmHg, odnosno od 6,7 do 10,7 kPa (145). Optimalni pritisak kiseonika nije jednostavno postići. Praćenje vrednosti iz uzoraka periferne krvi i iz arterijskih linija nije kontinuirano. Ranije su se koristili transkutani monitori, a danas pulsni oksimetri. Pulsni oksimetri rade na osnovu saturacije O<sub>2</sub>, a nisu najprecizniji u proceni pritiska O<sub>2</sub>. Ukazuje se i na razlike u senzitivnosti između proizvođača. Značajno je da ne samo hiperoksija i dužina davanja O<sub>2</sub>, već i epizode hipoksije i hiperoksije tj. fluktuacije mogu biti ozbiljan faktor rizika za razvoj retinopatije. Savetuju se što manja kolebanja u saturaciji O<sub>2</sub> i postepeno odvikavanje od oksigenoterapije (146). Vrednosti saturacije O<sub>2</sub> kod prevremeno rođene dece <32 NG u najvećem broju radova je 89-94%. Ukazuje se na značajno smanjenje incidence ROPa koji zahteva terapiju nakon uvođenja kontrolisanog i alarmom limitiranog praćenja saturacije O<sub>2</sub> (146).

U radovima se broj dana na oksigenoterapiji i broj dana na mehaničkoj ventilaciji smatraju faktorima rizika za razvoj ROP-a (134,136,141,142,147,148,149).

Prema radu Browna i sar. postoji snažna povezanost ROP s primenom kiseonika, bolestima respiratornog sistema koje zahtevaju terapiju i IVH (150). Kada su razmatrani porođajna težina, terapija kiseonikom i IVH, deca kojima je bilo potrebno više od 28 dana na mehaničkoj ventilaciji imala su 4,07 puta veću verovatnoću da će se kod njih razviti ROP stadijuma 3 ili 4 od dece koja su kraće bila izložena mehaničkoj ventilaciji. Ovi podaci potvrđuju snažnu povezanost ROP-a sa bronhopulmonalnom displazijom,

niskom težinom na rođenju i IVH i sugerišu da ključna komponenta među tim međusobno povezanim varijablama može biti vreme provedeno na mehaničkoj ventilaciji (150).

I najnovija istraživanja Enomotoa ukazuju da je dužina primene kiseonika, trajanje primene pozitivnog pritiska kiseonika i maksimalni udeo  $FiO_2$  imaju značajnu udruženost s težim oblicima ROPa (29).

U opsežnim studijama Benefits of Oxygen Saturation Targeting (BOOST) II sprovedenim u Engleskoj, Australiji i Novom Zelandu poređena je saturacija kiseonikom u dve grupe prevremeno rođene dece. Deca sa saturacijom kiseonika od 85% do 89% u poređenju sa decom na saturaciji kiseonikom od 90% do 95% imala su veću smrtnost, veći rizik od enterokolitisa i manje ozbiljnih formi ROP-a. Nakon dve godine oftalmološkog praćenja dece ustanovljeno je da je broj ozbiljnih oštećenja vida u obe grupe bio sličan. Na osnovu BOST II studije saturacija kiseonika bi trebalo da bude iznad 90%. Ova saturacija dovodi do ozbiljnijih formi ROP-a, ali u isto vreme obezbeđuje veći procenat preživljavanja dece (151).

U našem radu pratili smo broj dana na  $O_2$  i primenu mehaničke ventilacije u grupi sa ROP-om i kontrolnoj grupi. Prosečan broj dana na  $O_2$  u ROP grupi bio je  $24,28 \pm 17,30$  dana, a u kontrolnoj grupi  $13,45 \pm 10,68$  dana. Te srednje vrednosti se visoko statistički značajno razlikuju ( $p < 0,001$ ). Posmatrajući dužinu primene kiseonika samo u kontrolnoj grupi uočavamo da su deca sa urednim oftalmološkim nalazom bila u proseku na terapiji kiseonikom  $8,01 \pm 5,80$  dana, a deca sa oblicima ROPa koja nisu zahtevala terapiju (ROPI i ROPII)  $20,25 \pm 11,50$  dana, što predstavlja visoko statistički značajnu razliku u okviru iste grupe  $p < 0,001$ . Nije bilo statistički značajne razlike između grupe dece sa dijagnozom ROPI i ROPII (20,25 dana na  $O_2$ ) i ROP grupe (24,28 dana na  $O_2$ ) ( $p = 1,000$ ). Iz poslednjeg rezultata možemo zaključiti da su značajni i drugi faktori rizika, jer su deca kontrolne grupe sa početnim oblicima retinopatije (ROPI i ROPII) koji su regresirali i nisu zahtevali lečenje provela značajan broj dana na oksigenoterapiji koji se statistički nije razlikovao od broja dana na oksigenoterapiji ROP grupe. Iz gore navedenih podataka možemo zaključiti da je monitoring terapijske primene kiseonika u našim uslovima dobro regulisan što je pokazala i multipla regresiona analiza.

Mehanička ventilacija je bila primenjena kod 65,9% dece u ROP, a kod 34,1% dece u kontrolnoj grupi što predstavlja statistički značajnu razliku ( $p < 0.001$ ).

U našem istraživanju primenom multiple regresione analize broj dana provedenih na terapiji O<sub>2</sub> i primena mehaničke ventilacije nisu izdvojeni kao nezavistani faktori rizika za razvoj težih oblika ROP-a.

#### *Respiratorne bolesti kao faktor rizika*

Respiratorne bolesti su često udružene sa retinopatijom i u direktnoj vezi sa prevremenim rođenjem. Respiratorni distress sindrom (DRS), bronhopulmonalna displazija (BPD), pneumonija i hemoragije pluća su stanja praćena krizama apnee i potrebama za davanjem terapijskog kiseonika, a često i mehaničkom ventilacijom. Respiratorne bolesti su praćene poremećajem gasne razmene i hipoksijom. Ovakva stanja zahtevaju često dugotrajnu primenu kiseonika koja nosi povećani rizik od hiperoksije. Mnogi rizik faktori opšteg zdravstvenog stanja deluju preko mehanizama koji za osnovu imaju hipoksiju i hiperoksiju tj. metaboličke poremećaje kiseonika. Loša distribucija kiseonika, neadekvatna dostava, nemogućnost preuzimanja ili inhibitorni moment viška kiseonika na nestabilne enzimske sisteme doprinose pojačavanju veze ishemija – proliferacija na nivou retine (152).

Respiratorni distress sindrom (RDS) je usko vezan sa prevremenim rođenjem. primarni razlog RDS je deficit surfaktanta. Uloga surfaktanta je da smanji površinski napon u alveolama i suprostavi se njihovom kolabiranju. U literaturi se RDS navodi kao značajan faktor rizika za razvoj težih oblika ROPa. (136,147,153).

U našem uzorku učestalost RDS je velika u obe grupe. U ROP grupi RDS je imalo 83,2% dece, a u kontrolnoj grupi 54,8%. Ispitivanje je pokazalo da je razlika učestalosti visoko statistički značanja ( $p < 0.001$ ), ali multipla regresiona analiza nije pokazala da je RDS nezavistan faktor rizika.

Prisustvo bronhopulmonalne displazije u ovom istraživanju statistički značajno češće uočeno u ROP grupi 25% u odnosu na 8,7% kod dece kontrolne grupe ( $p < 0,001$ ), ali BPD nije izdvojena kao nezavistan faktor rizika.

Naše ispitivanje učestalosti pneumonije u ROP i kontrolnoj grupi je pokazalo statistički značajnu razliku ( $p=0.001$ ). Multiplom regresionom analizom je potvrđeno da pneumonija predstavlja nezavistan faktor rizika za razvoj ROP-a.

#### *Sepsa kao faktor rizika*

Kod dece male telesne mase i prevremeno rođene dece infekcije su česte navode mnogi autori (17,32,52,69,82,93). Tolsma i sar. analiziral su ranu i kasnu bakterijemiju kod prevremeno rođene dece (30). Deca su podeljena prema prisustvu - rane (postnatalna prva nedelja) ili kasne (od 2 do 4 nedelje) bakterijemije, kao i oni na sa definitivne (kulturom potvrđenom) bakterijemijom i pretpostavljene (antibiotici korišteni više od 72 h uprkos negativnoj krvnoj kulturi) bakterijemije. Došlo se do zaključka da je definitivna bakterijemija nezavistan faktor rizika za teže oblike ROPa i plus bolest, dok je pretpostavljena kasna bakterijemija povezana sa težim oblicima ROP.

Chen i sar. su objavili da su gestacijska starost  $<26$  nedelja, izloženost kiseoniku duže od 28 dana i neonatalna sepsa istaknuti faktori rizika za ROP (154). Rizik za ROP povezan za primenu  $O_2$  je bio izraženiji kod dece gestacijske starosti od 23 do 25 nedelja, dok ROP povezan sa rizikom za infekciju bio veći kod dece rođene od 28 do 29 nedelje gestacije. Neonatalna sepsa kao zajednički činilac sva tri faktora rizika bila je prisutna više nego što bi se moglo očekivati pod aditivnim i multiplikativnim modelom interakcije. Ova studija pokazuje da neonatalna sepsa, izloženost kiseoniku i niska nedelja gestacije ne samo da su nezavisno povezani sa značajno povećanim rizikom za razvoj ROP-a, već interaguju aditivno i u tom slučaju njihov efekat je multiplikovan (154).

U našem radu sepsa je prisutna kod 40,7% dece u ROP grupi i 24,6% dece u kontrolnoj grupi. Ispitivanje je pokazalo da je razlika u učestalosti statistički značajna ( $p=0,008$ ), a multipla regresiona analiza je izdvojila sepsu kao nezavistan faktor rizika za razvoj ROP-a.

### *Anemija i hiperbilirubinemija kao faktor rizika*

U normalnim uslovima hipoksija stimuliše stvaranje eritropoetina, što dovodi do porasta stvaranja eritrocita. Međutim, kada se sa stanja hipoksije prelazi na stanje normoksije, količina kiseonika transportovanog u tkiva povećava se iznad normale, zaustavlja se lučenje eritropoetina i stvaranje eritrocita, što kasnije prouzrokuje anemiju i smanjenu dopremu kiseonika ka tkivima (31). Ovaj proces je izraženiji u hiperoksiji.

U radu Englerta i sar. anemija nije potvrđena da predstavlja nezavisan faktor rizika za teže oblike ROPa, ali je broj transfuzija pokazao korelaciju sa težinom ROP-a (155). U ROP grupi 89,4% dece je anemično, a u kontrolnoj grupi njih 65,1%. Ispitivanje je pokazalo da je razlika u učestalosti visoko statistički značajna ( $p < 0,001$ ), ali multipla regresiona analiza nije ukazala da anemija predstavlja nezavistan faktor rizika.

Bilirubin se u svetlu proučavanja retinopatije prematuriteta posmatra kao antioksidativna supstanca, a hiperbilirubinemija neki smatraju da može imati protektivno dejstvo. Rad Romea i sar. nije potvrdio da bilirubin može imati ulogu u prevenciji ROP-a (156). Rad Milnera i sar. takođe pokazuje da visok bilirubin ne štiti od razvoja retinopatije već da može biti faktor rizika za razvoj ROP-a (157).

U našem uzorku hiperbilirubinemija je evidentirana kod 41,6% dece ROP grupe i 46,0% dece kontrolne grupe. Ispitivanje je pokazalo da je razlika u učestalosti nije statistički značajna ( $p = 0,490$ ).

### *Intraventrikularna hemoragija kao faktor rizika*

ROP i intraventrikularno krvarenje (IVH) su ozbiljne komplikacije kod prevremeno rođene dece. Incidenca ROP-a i IVH su pokazale da koreliraju obrnuto sa gestacijskom starošću i masom na rođenju. Nezreli i nerazvijeni sistemi zaštite objašnjavaju osetljivost krvne mreže centralnog nervnog sistema (CNS) i krvne mreže retine. Oštećenje struktura CNS-a posle krvarenja dovodi do smanjenja funkcije vida nezvano za postojanje ROP-a (atrofija optičkog nerva i oštećenje centra za vid) (158).

Rezultati istraživanja Javiera i sar. pokazali su da postoji značajna razlika u učestalosti kod IVH gradusa 3 ili 4 u različitim kategorijama u zavisnosti od težine na porođaju, zajedno sa ROPom stadijum 3 plus i 4 u odnosu na kontrolnu grupu (159). U

ROP grupi 51,1% imalo je IVH gradus 3 ili 4 u odnosu na 14,9% u kontrolnoj grupi ( $p < 0,001$ ). U literaturi postoje brojni radovi koji ukazuju na značajnu povezanost IVH sa aktivnim oblikom ROP-a (134,136,150,159). Incidenca IVH u literaturi varira od 20-60% u zavisnosti od stepena IVH i zemlje u kojoj je vršeno ispitivanje (141,150,158,159). Povezanost između težih oblika ROP-a i ozbiljnosti IVH pokazana je u radu Wattsa i sar. (159). Uz poboljšanje neonatalne nege i smanjenje učestalosti teških IVH, čini se da postoji slabljenje ranije uočene povezanosti između teške IVH i ozbiljnih oblika ROP-a. Međutim, prisutnost čak i blagog gradusa IVH može biti značajan faktor rizika za pojavu ROP-a u stadijumu 3 (159). Ima autora Markova A. i sar. koji nisu našli značajnu vezu između IVH i ROP-a (149).

U našem radu u ROP grupi intraventrikularnu hemoragiju težeg stepena (III i IV) imalo je 18,6% dece, a u kontrolnoj grupi 8,7% dece. Ispitivanje je pokazalo da je razlika u učestalosti statistički značajna ( $p < 0,026$ ), a multipla regresiona analiza je izdvojila IVH kao nezavistan faktor rizika za razvoj ROP-a.

#### *Nekrotični enterokolitis kao faktor rizika*

NEC kao faktor rizika za razvoj ROP-a uočen je od strane više autora (153,160,161). Istraživanje Ann Hellstrom ukazuje na nizak nivo Insulinu sličnog faktora rasta (IGF -I) kod dece sa teškim oblikom ROP-a (161). Nivo IGF-I korelira sa telesnom masom i nedeljom gestacije. Posle prevremenog rođenja vrednosti IGF-I opadaju zbog prekida sa izvorom koji je u placenti i amnionskoj tečnosti. Nedostatak ili niske vrednosti IGF-I u ranom neonatalnom periodu se povezuju sa nedovoljnim vaskularnim rastom i proliferacijom u toku ROPa. Ako je IGF-I posle rođenja dovoljan, krvni sudovi se uredno razvijaju i ne dolazi do razvoja retinopatije. Hellstrom i sar. su ukazali na značajnost IGF-I kao faktora rizika za razvoj ROP-a. Niske vrednosti IGF-I nađene su kod NEC, BPD i IVH. Do istog zaključka došli su i Smith i sar. (152). Danas se sve više razmatra davanje IGFI u cilju prevencije ROPa u zemljama gde oftalmološki skrining i terapija nisu dostupni.

Ima autora koji nisu našli vezu između ROP-a i NEC-a (162,163).

Istraživanje Forda i sar. o ulozi nekrotičnog enterokolitisa sprovedeno je na pacijentima korišćenjem metoda skrininga i medicinske dokumentacije (164). Analizirani

su nedelja gestacije, telesna masa, faza ROP-a u vreme postavljanja dijagnoze, najviši stepen ROP-a postignut pre regresije, lečenje laserfotokoagulacijom i dijagnoza NEC-a. U zaključku ističu da je ROP kompleksna bolest sa mnogo faktora rizika koji još nisu u potpunosti shvaćeni. Ovi podaci ukazuju na to da NEC može povećati rizik od pojave uznapredovalih oblika bolesti. Uloga NEC-a u progresiji ROP ka težim stadijumima traži dalje istraživanje (164).

U našem istraživanju NEC se javio kao komorbiditet kod 16,8% lečene dece, naspram 4,8% u grupi nelečene dece. Ispitivanje je pokazalo da je razlika u učestalosti statistički značajna ( $p=0,003$ ). Multipla regresiona analiza je ukazala da je NEC nezavistan faktor rizika za razvoj ROPa.

#### *Vreme davanja terapije*

Pojavom krvnih sudova na papili optičkog nerva u 16 NG intrauterino započinje samostalna vaskularizacija retine i završava se u 36 NG u nazalnom delu, a u 40-42 NG u temporalnom delu retine. Preвременim rođenjem grubo se menjaju i remete faktori koji utiču na dalji razvoj vaskularizacije retine što rezultuje razvojem ROP-a u periodu 32-42 postkonceptijske nedelje (10,13,165).

U našem radu praćeno je vreme tj. dan u kome su deca ROP grupe dobila terapiju. Prosečna vrednost je  $42,64 \pm 16,19$  dan, što odgovara 6,1 nedelja hronološki. Prosečna NG na rođenju ROP grupe je  $29,96 \pm 1,93$  NG iz čega proizilazi da su deca prosečno tretirana u 36 NG postkonceptijski.

Srednja nedelja gestacije odgovara srednjoj nedelji gestacije u kojoj su deca u ETROP i CRYO-ROP studiji razvila retinopatiju, ali je hronološka zrelost dece u tim studijama viša - 10,6 i 9,6 nedelja (88,93). To se objašnjava nižom nedeljom gestacije dece u tim studijama, a samim tim i dužim vremenskim periodom za razvoj ROP-a.

Deca ROP grupe lečena su ukoliko su imala dijagnoze ROP3+2A njih 45,1%, AP ROP njih 31,9% i ROP+2A njih 23,0%. Uočavamo da je skoro trećina lečene dece imala dijagnozu najagresivnijeg oblika retinopatije – AP ROP koji zahteva uregantan tretman .

Kod 87,6% dece primenjena je intravitrealna aplikacija anti VEGF, njih 8,9% tretirano je laserfotokoagulacijom (LFC) retine, a 3,5% dobilo je obe terapije. Uočavamo

da je anti VEGF terapija kod nas, kao i u svetu, skoro potisnula LFC kao metoda u lečenju aktivnih oblika ROP-a. Sama metoda je lakša kako za pacijenta, tako i za oftalmologa. Rezultati su za sada obećavajući. Potrebna su dalja praćenja dece o anatomskim i funkcionalnim rezultatima terapije.

Jedan od glavnih ciljeva Svetske zdravstvene organizacije –WHO, u projektu “Vid za sve do 2020” jeste i sprečavanje preventabilnog slepila (166).

Rezultati ovog istraživanja sugerišu potrebu za intenzivnom edukacijom i podizanjem svesti društva da retinopatija prevremeno rođene dece nije problem porodice i oftalmologa već šire društvene zajednice. Najveći uspeh Nacionalnih instituta u razvijenim zemljama sveta je formiranje baza evidencije premturane retinopatije i njenog tretmana. Odnos prema rešavanju premturane retinopatije merilo je zdravstvene kulture jedne zemlje i korespondira sa naporima koje ulažemo ka pridruživanju svetskim standardima.



## 6. ZAKLJUČCI

U ispitivanom uzorku od 239 prevremeno rođene dece kod kojih je sproveden skrining na ROP, bilo je 116 (48,5%) dečaka i 126 (51,5%) devojčica, prosečne telesne mase  $1323 \pm 282$  g na rođenju i nedelje gestacije  $30,74 \pm 2,06$ . Srednja vrednost Apgar skora je  $5,51 \pm 1,81$ , a prosečan broj dana na terapiji kiseonikom je  $18,57 \pm 15,17$ .

Ispitivanjem eNOS T-786C polimorfizama utvrđeno je:

1. da je učestalost homozigota TT 39,1%, heterozigota CT 52,3% i homozigota za ređi alel C, tj. CC genotipa 8,6%. Učestalost alela C u ispitivanoj grupi prevremeno rođene dece je 34,8 %
2. da je učestalost homozigota TT u ROP grupi 40,0%, heterozigota CT 51,7% i homozigota za ređi alel C tj. CC genotipa 8,3%. U kontrolnoj grupi učestalost TT genotipa je 38,2%, CT genotipa 52,9% i CC genotipa 8,8%. Učestalost alela C u ROP grupi je 34,2 % prema 35,3 % u kontrolnoj grupi.

Ispitivanjem eNOS 4a/4b polimorfizama utvrđeno je:

3. da je učestalost homozigota 4bb 65,3%, heterozigota 4ab 31,2% i homozigota za ređi alel 4a, tj. 4aa genotip 3,5%. Učestalost alela 4a u ispitivanoj grupi prevremeno rođene dece je 19,1 %.
4. da je u ROP grupi učestalost homozigota 4bb 60,2%, heterozigota 4ba genotipa 34,9% i homozigota 4aa genotipa 4,9%. U kontrolnoj grupi učestalost 4bb genotipa je 70,1%, 4ba genotipa 27,6% i 4aa genotipa 2,3%. Učestalost 4a alela u ROP grupi je 22,3% prema 16,1% u kontrolnoj grupi.
5. Nije ispoljena značajna razlika u učestalosti genotipova i alela eNOS T-786C i eNOS 4a/4b polimorfizama između ROP i kontrolne grupe.
6. Kod devojčica u ROP grupi učestalost 4ba i 4aa genotipova je statistički značajno veća, u odnosu na kontrolnu grupu. Međutim, logistička regresiona analiza sa polom,

NG, TM, Apgar skorom i brojem dana na terapiji kiseonikom kao kovarijatama nije pokazala da je 4a alel faktor rizika za razvoj teških formi ROPa kod devojčica.

7. Ispitivana prevremeno rođena deca nosioci 4aa genotipa imaju nižu NG, TM i Apgar skor a veći broj dana provedenih na O<sub>2</sub> u odnosu na ostale grupe genotipova (4bb i 4ba). Ispitivanjem srednje vrednosti NG statistički značajna razlika se uočava po recesivnom modelu tj., nosioci 4aa genotipa imaju značajno niže vrednosti NG nego nosioci 4bb i 4ba genotipa.
8. Multivarijantna linearna regresiona analiza sa polom, TM i Apgar skorom kao kovarijatama nije pokazala asocijaciju 4a/4b genotipa sa vrednostima NG kod ispitivane prevremeno rođene dece.
9. Univarijantna analiza kliničkih faktora rizika između dve grupe prevremeno rođene dece pokazala je da su NG, TM, Apgar, perinatalna asfiksija, br.dana na O<sub>2</sub>, MV, RDS, BPD, pneumonija, sepsa, anemija, IVH i NEC statistički značajno češće ispoljeni u ROP grupi.
10. Na osnovu multivarijantne analize zaključujemo da su nezavisni faktori rizika za razvoj ROP-a kod prevremeno rođene dece obuhvaćene našim ispitivanjem niska nedelja gestacije, niska telesna masa, sepsa, pneumonija, intraventrikularna hemoragija i nekrotični enterokolitis.
11. Rezultati ovog istraživanja sugerišu potrebu za intenzivnom edukacijom i podizanjem svesti društva da retinopatija prevremeno rođene dece nije problem porodice i oftalmologa već šire društvene zajednice.

## 7. LITERATURA

1. Quiram PA, Capone A Jr. Current understanding and management of retinopathy of prematurity. *Curr Opin Ophthalmol.* 2007;18:228-34.
2. Ashton N. The pathogenesis of retrolental fibroplasia. *Ophthalmology.* 1979;86(10):1695-9.
3. Kinsey VE, Arnold HJ, Kalina RE, Stern L, Stahlman M, Odell G, et al. PaO<sub>2</sub> levels and retrolental fibroplasia: a report of the cooperative study. *Pediatrics.* 1977;60:655-68.
4. Phelps DL, Rosenbaum AL. The role of tocopherol in oxygen-induced retinopathy: kitten model. *Pediatrics.* 1977 Jun;59 (Suppl)(6Pt 2):998-1005.
5. Kremer I, Kissun R, et al. Oxygen-induced retinopathy in newborn kittens. A model for ischemic vasoproliferative retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1987;28(1):126-30.
6. Penn JS. Oxygen-induced retinopathy in the rat: possible contribution of peroxidation reactions. *Doc Ophthalmol.* 1990;74(3):179-86.
7. Gibson DL, Sheps SB, Schechter MT, et al. Retinopathy of prematurity; a new epidemic? *Pediatrics.* 1989; 83(4):486-92.
8. Phelps DL. Retinopathy of prematurity; an estimate of vision loss in the United States- 1979. *Pediatrics.* 1981 Jun;67(6):924-5.
9. Blencowe H, Lawn JE, Vazquez T, Fielder A, Gilbert C. Preterm-associated visual impairment and estimates of retinopathy of prematurity at regional and global levels for 2010. *Pediatr Res.* 2013 Dec;74 Suppl 1:35-49.
10. Oros A. Patogeneza premature retinopatije: klinički seminari. Beograd: Institut za neonatologiju; 2007. str. 75-84.

11. Fielder AR, Robinson J. Oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993;34(1):3-5.
12. Flynn JT. The premature retina: a model for the in vivo study of molecular genetics? *Eye (Lond)*; 1992;6 (Pt2):165-6.
13. Oros A. Prematurna retinopatija. Beograd: Zadužbina Andrejević; 2003.
14. Kimura H, Esumi H. Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Biochim pol.* 2003;50(1):49-59.
15. International Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity. *Arch Ophthalmol.* 2005;123(7):991-9.
16. Hardy RJ, Palmer EA, Dobson V et al. Risk analysis of prethreshold ROP. *Arch Ophthalmol.* 2003;121:1699–701.
17. Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. Multicenter Trial of Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity: ophthalmological outcomes at 10 years. *Arch Ophthalmol.* 2001 Aug;119(8):1110-8.
18. Hunter DG, Repka MX. Diode laser photocoagulation for threshold retinopathy of prematurity. A randomized study. *Ophthalmology.* 1993;100:238-44.
19. Oros A. Razvoj vida kod prevremeno rođene dece: klinički seminari. Beograd: Institut za neonatologiju; 2013. str. 119-27.
20. An International Committee for Classification of Retinopathy of Prematurity. The international classification of retinopathy of prematurity revisited. *Arch Ophthalmol.* 2005;123(7):991-9.
21. Gilbert C, Fielder A, Gordillo L, Quinn G, Semiglia R, Visintin P et al. Characteristics of Infants With Severe Retinopathy of Prematurity in Countries With Low, Moderate, and High Levels of Development: Implications for Screening Programs. *Pediatrics.* 2005;115: 518-25.

22. Wallace DK, Kylstra JA, Phillips SJ, Hall JG. Poor postnatal weight gain: a risk factor for severe retinopathy of prematurity. *J AAPOS*. 2000;4:343-7.
23. Knežević S, Stojanović N, Oros A, Savić D, Simović A, Knežević J. Analysis of risk factors in the development of retinopathy of prematurity. *Srp Arh Celok Lek*. 2011; 139(7-8):433-8.
24. Olujić M, Oros A, Bregun Doronjski A, Velisavljev Filipović G. Factors given by birth and oxygenotherapy in relation to development of Retinopathy of Prematurity. *Med Pregl*. 2012;65(7-8):326-30.
25. Pierce LM, Raab EL, Holzman IR, Ginsburg RN, Brodie SE, Stroustrup A. Importance of birth weight as a risk factor for severe retinopathy of prematurity when gestational age is 30 or more weeks. *Am J Ophthalmol*. 2014 Jun;157(6):1227-30.e2.
26. Park SH, Yum HR, Kim S, Lee YC. Retinopathy of prematurity in Korean infants with birthweight greater than 1500 g. *Br J Ophthalmol*. 2015 Oct 19. pii: bjophthalmol-2015-306960.
27. Muller H, Weiss C, Kuntz S, Akkoyun I, Schaible T. Are there predictor for proliferative retinopathy of prematurity and is supplemental oxygen a useful conservative treatment option? An analysis of our own patients. *Klin Pediatr*. 2005;217(2):53-60.
28. Enomoto H, Miki A, Matsumiya W, Honda S. Evaluation of Oxygen Supplementation Status as a Risk Factor Associated with the Development of Severe Retinopathy of Prematurity. *Ophthalmologica*. 2015;234(3):135-8.
29. Tolsma KW, Allred EN, Chen ML, Duker J, Leviton A, Dammann O. Neonatal bacteremia and retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol*. 2011 Dec;129(12):1555-63.
30. Kim TI, Sohn J, Pi SY, Yoon YH. Postnatal risk factors of retinopathy of prematurity. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2004;18:130-4.

31. Brown MS, Baron AE, France EK, Hamman RF. Association between higher cumulative doses of recombinant erythropoietin and risk for retinopathy of prematurity. *J.AAPOS*. 2006 Apr;10:143-9.
32. Dai AI, Demiryürek S, Aksoy SN, Perk P, Saygili O, Güngör K. Maternal Iron Deficiency Anemia as a Risk Factor for the Development of Retinopathy of Prematurity. *Pediatr Neurol*. 2015 Aug;53(2):146-50.
33. Wu WC, Ong FS, Kuo JZ, Lai CC, Wang NC, Chen KJ et al. Retinopathy of prematurity and maternal age. *Retina*. 2010 Feb;30(2):327-31.
34. Kuveljić J, Đurić T, Jovanović I, Živković M, Stanković A. Osnove primene analize DNK u medicine. *Srce i krvni sudovi*. 2013;32(2): 104-9nh.
35. Rogers MS, D'Amato RJ. The effect of genetic diversity on angiogenesis. *Exp Cell Res*. 2006;312:561–74.
36. Holmström G, van Wijngaarden P, Coster DJ, Williams KA. Genetic susceptibility to retinopathy of prematurity: the evidence from clinical and experimental animal studies. *Br J Ophthalmol*. 2007 Dec;91(12):1704-8.
37. Hartnett ME, Cotten CM. Genomics in the neonatal nursery: Focus on ROP. *Seminars in Perinatology*. 2015;39(8), 604-10.
38. Vannay AV, Dunai G, Banyasz I, Szabo M, Vamos R, Treszl A et al. Association of genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor and risk of proliferative retinopathy of prematurity. *Pediatr Res*. 2005;57:396-8.
39. Cooke RW, Drury JA, Mountford R, et al. Genetic polymorphisms and retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:1712–1715.1715
40. Shastry BS. SNPs: impact on gene function and phenotype. *Methods Mol Biol*. 2009;578:3-22.

41. Haider MZ, Devarajan LV, Al-Essa M, et al. A C597→A polymorphism in the Norrie disease gene is associated with advanced retinopathy of prematurity in premature Kuwaiti infants. *J Biomed Sci.* 2002;9:365-70.
42. Kim JH, Yu YS, Kim J, Park SS. Mutations of the Norrie gene in Korean ROP infants. *Korean J Ophthalmol.* 2002;16:93-6.
43. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension.* 1998 Jul;32(1):3–8.
44. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, et al. T-786→C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation.* 1999 Jun;99(22):2864–70.
45. Mohamed S, Schaa K, Cooper ME, Ahrens E, Alvarado A, Colaizy T, et al. Genetic contributions to the development of retinopathy of prematurity. *Pediatr Res.* 2009;65:193-7.
46. Sonmez K, Drenser KA, Capone A Jr, Trese MT. Vitreous levels of stromal cell-derived factor 1 and vascular endothelial growth factor in patients with retinopathy of prematurity. *Ophthalmology.* 2008;115:1065-70.
47. Young TL, Anthony DC, Pierce E, Foley E, Smith LE. Histopathology and vascular endothelial growth factor in untreated and diode laser-treated retinopathy of prematurity. *J AAPOS.* 1997 Jun;1(2):105–10.
48. Lashkari K, Hirose T, Yazdany J, et al. Vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor levels are differentially elevated in patients with advanced retinopathy of prematurity. *Am J Pathol.* 2000;156(4):1337–44.
49. Umeda N, Ozaki H, Hayashi H, Miyajima-Uchida H, Oshima K. Colocalization of Tie2 angiopoietin 2 and vascular endothelial growth factor in fibrovascular membrane from patients with retinopathy of prematurity. *Ophthalmic Res.* 2003 Jul-Aug;35(4):217–23.

50. Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine*. 2000;12:1232-5.
51. Malik MA, Shukla S, Azad SV, Kaur J. Vascular endothelial growth factor (VEGF-634G/C) polymorphism and retinopathy of prematurity: a meta-analysis. *Saudi J Ophthalmol*. 2014 Oct;28(4):299–303.
52. Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, Obermayer-Pietsch B, Pilger E. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J Vas Res*. 2000;37:443-8.
53. Liu P, Wu D, Zhou W, Li Y, Lian C, Yang Y, et al. Association of VEGF gene polymorphisms with advanced retinopathy of prematurity: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2012 Dec;39(12):10731-7.
54. Awata T, Kurihara S, Takata N, Neda T, Iizuka H, Ohkubo T, et al. Functional VEGF C-634G polymorphism is associated with development of diabetic macular edema and correlated with macular retinal thickness in type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;333:679-85.
55. Churchill AJ, Carter JG, Lovell HC, Ramsden C, Turner SJ, Yeung A, et al. VEGF polymorphisms are associated with neovascular age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet*. 2006 Oct;15(19):2955–61.
56. Malik MA, Shukla S, Srivastava A, Kaur J. Genetic Susceptibility to Retinopathy of Prematurity: A Paradigm for Preterm Disease Traits. *DJO*. 2014;25(1):40-4.
57. Bizzarro MJ, Hussain N, Jonsson B, Feng R, Ment LR, Gruen JR, et al.. Genetic susceptibility to retinopathy of prematurity. *Pediatrics*. 2006;118:1858-63.
58. Haider MZ, Devarajan LV, Al-Essa M, Kumar H. Angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism in Kuwaiti children with retinopathy of prematurity. *Biol Neonate*. 2002;82:84-8.



59. Nikopoulos K, Gilissen C, Hoischen A, van Nouhuys CE, Boonstra FN, Blokland EA, et al. Next generation sequencing of a 40 Mb linkage interval reveals TSPAN 12 mutations in patients with familial exudative vitreoretinopathy. *Am J Hum Genet.* 2010 Feb;86:240-7.
60. Poulter JA, Ali M, Gilmour DF, Rice A, Kondo H, Hayashi K et al. Mutations in TSPAN 12 cause autosomal-dominant familial exudative vitreoretinopathy. *Am J Hum Genet.* 2010 Feb;86:248-53.
61. Shastry BS, Pendergast SD, Hartzler MK, Liu X, Trese M. Identification of missense mutations in the Norrie disease gene associated with retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol.* 1997;115:651-5.
62. Dickinson JL, Sale MM, Passmore A, FitzGerald LM, Wheatley CM, Burdon KP, et al. Mutations in the NDP gene: contribution to Norrie disease, familial exudative vitreoretinopathy and retinopathy of prematurity. *Clin Exp Ophthalmol.* 2006 Sep-Oct;34:682-8.
63. Mintz-Hittner HA, Miyashiro MJ, Knight-Nanan DM, O'Malley RE, Marlar RA. Vitreoretinal findings similar to retinopathy of prematurity in infants with compound heterozygous protein S deficiency. *Ophthalmol.* 1999;106:1525-30.
64. Hiraoka M, Beristein DM, Trese MT, Shastry BS. Insertion and deletion mutations in the dinucleotide repeat region of the Norrie disease gene in patients with advanced retinopathy of prematurity. *J Hum Genet.* 2001;46:178-81.
65. Talks SJ, Ebenezer N, Hykin P, Adams G, Yang F, Schulenberg E, et al. De novo mutation in the 5'-regulatory region of the Norrie disease gene in retinopathy of prematurity. *J Med Genet.* 2001;38:e46.
66. Hutcheson KA, Paluru PC, Bernstein SL, Koh J, Rappaport EF, Leach RA, et al. Norrie disease gene sequence variants in an ethnically diverse population with retinopathy of prematurity. *Mol Vis.* 2005;11:501-8.

67. MacDonald MLE, Goldberg YP, MacFarlane J, Samuels ME, Trese MT, Shastry BS. Genetic variants of frizzled-4 gene in familial exudative vitreoretinopathy and advanced retinopathy of prematurity. *Clin Genet*. 2005 Apr;67(4):363-6.
68. Berger W. Molecular dissection of Norrie disease. *Acta Anat (Basel)*. 1998;162:95–100.
69. Xu Q, Wang Y, Dabdoub A, Smallwood PM, Williams J, Woods C, et al. Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4 a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell*. 2004 Mar;116(6):883-95.
70. Robitaille J, MacDonald ML, Kaykas A, Sheldahl LC, Zeisler J, Dubé MP, et al. Mutant frizzled-4 disrupts retinal angiogenesis in familial exudative vitreoretinopathy. *Nat Genet*. 2002 Oct;32:326-30.
71. Toomes C, Bottomley HM, Jackson RM, Towns KV, Scott S, Mackey DA, et al. Mutations in LRP5 or FZD4 underlie the common familial exudative vitreoretinopathy locus on chromosome 11q. *Am J Hum Genet*. 2004 Apr;74:721-30.
72. Ziche M, Morbidelli L. Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol*. 2000; 50:139-48.
73. Rusai K, Vannay A, Szebeni B, Borgulya G, Fekete A, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene T-786C and 27-bp repeat gene polymorphisms in retinopathy of prematurity. *Mol Vis*. 2008 Feb;14:286-90.
74. Syllos RW, Sandrim VC, Lisboa HR, Tres GS, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase genotype and haplotype are not associated with diabetic retinopathy in diabetes type 2 patients. *Nitric Oxide*. 2006;15:417–22.
75. Taverna MJ, Sola A, Guyot-Argenton C, Pacher N, Bruzzo F, Chevalier A, et al. eNOS4 polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase predicts risk for severe diabetic retinopathy. *Diabet Med*. 2002 Mar;19(3):240-5.

76. Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, Takemoto F, Hara S, Yamada A, et al. Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Apr;245(1):190-3.
77. Hoffmann IS, Tavares-Mordwinkin R, Castejon AM, Alfieri AB, Cubeddu LX. Endothelial nitric oxide synthase polymorphism, nitric oxide production, salt sensitivity and cardiovascular risk factors in Hispanics. *J Hum Hypertens.* 2005;19:233–40.
78. Li R, Lyn D, Lapu-Bula R, Oduwole A, Igho-Pemu P, Lankford B, et al. Relation of endothelial nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide level, endothelial function, and blood pressure in African Americans. *Am J Hypertens.* 2004;17:560–7.
79. Brooks SE, Gu X, Samuel S, Marcus DM, Bartoli M, Huang PL, et al. Reduced severity of oxygen-induced retinopathy in eNOS-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:222–8.
80. Campochiaro PA. Retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol.* 2000;184:301–10.
81. Hibberd ML, Millward BA, Wong FS, Demaine AG. T-cell receptor constant beta chain polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes. *Diabet Med.* 1992;9:929–33.
82. Yanamandra K, Napper D, Pramanik A, Bocchini JA Jr, Dhanireddy R. Endothelial nitric oxide synthase genotypes in the etiology of retinopathy of prematurity in premature infants. *Ophthalmic Genet.* 2010 Dec;31(4):173-7.
83. Section of Ophthalmology. American Academy of Pediatric Ophthalmology and Strabismus. Screening examination of premature infants for retinopathy of prematurity. *Pediatrics.* 2006 Feb;117(2):572-6.
84. Oros A. Značaj skrininga premature retinopatije: klinički seminari. Beograd: Institut za neonatologiju; 2007. str. 29-41.

85. Hutchinson AK, Saunders RA, O'Neil JW, Lovering A, Wilson ME. Timing of initial screening examination in retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol.* 1998;116:608-12.
86. Olujić M, Oros A, Bregun Doronjski A, Velisavljev Filipović G. Testiranje kriterijuma za skrining premature retinopatije. *Med Pregl.* 2012;65(9-10):409-14.
87. American Academy of Pediatrics, Section on Ophthalmology. Screening examination of premature infants for retinopathy of prematurity. *Pediatrics.* 2001;108:809-11.
88. Reynolds JD, Dobson V, Quinn GE, Fielder AR, Palmer EA, Saunders RA, et al. CRYO-ROP and LIGHT-ROP Cooperative Study Groups. Evidence-based screening criteria for retinopathy of prematurity: natural history data from the CRYO-ROP and LIGHT-ROP studies. *Arch Ophthalmol.* 2002 Nov;120:1470-6.
89. Knežević S, Stojanović N, Oros A, Knežević J. The importance of timely ophthalmologic examination in preterm infants at risk of retinopathy occurrence. *Vojnosanit Pregl.* 2012;69(9):765-70.
90. Laser ROP Study Group. Laser therapy for retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol.* 1994;112:154-6.
91. Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. Multicenter trial of cryotherapy for retinopathy of prematurity: ophthalmological outcomes at 10 years. *Arch Ophthalmol.* 2001 Aug;119(8):1110-8.
92. Good WV. Early treatment for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 2004;102:233-50.
93. Good WV. Final results of the Early Treatment of Retinopathy of Prematurity (ETROP) randomized trial. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 2004;102:233-50.
94. Allegaert K, de Coen K, Devlieger H. Threshold retinopathy at threshold of viability: the EpiBel study. *Br J Ophthalmol.* 2004;88:239-42.

95. Mintz-Hittner HA, Kuffel RR. Intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) for treatment of stage 3 retinopathy of prematurity in zone I or posterior zone II. *Retina*. 2008;28(6):831-8.
96. Kong L, Mintz-Hittner HA, Penland RL, Kretzer FL, Chévez-Barrios P. Intravitreal bevacizumab as anti-vascular endothelial growth factor therapy for retinopathy of prematurity: a morphologic study. *Arch Ophthalmol*. 2008;126:1161-3.
97. Quiroz-Mercado H, Martinez-Castellanos MA, Hernandez-Rojas ML, Salazar-Teran N, Chan RV. Antiangiogenic therapy with intravitreal bevacizumab for retinopathy of prematurity. *Retina*. 2008 Mar;28(3):19-25.
98. Mintz-Hittner HA, Best LM. Antivascular endothelial growth factor for retinopathy of prematurity. *Curr Opin Pediatr*. 2009 Apr;21(2):182-7.
99. Mintz-Hittner HA. Avastin as monotherapy for retinopathy of prematurity. *J AAPOS*. 2010 Feb;14(1):2-3.
100. Mintz-Hittner HA, Kennedy KA, Chuang AZ. Efficacy of intravitreal bevacizumab for stage 3+ retinopathy of prematurity. *N Engl J Med*. 2011;364(7): 603-15.
101. Kusaka S, Shima C, Wada K, Arahori H, Shimojyo H, Sato T, et al. Efficacy of intravitreal injection of bevacizumab for severe retinopathy of prematurity: a pilot study. *Br J Ophthalmol*. 2008 Nov;92(11):1450–5.
102. Oros A, Dedović-Bjelajac D, Pantelić J. Current Treatment of Retinopathy of Prematurity. Proceedings of the 2nd Congress of Ophthalmologists of B&H with International participation; 2012 May 25-27; Banja Luka, Bosnia and Herzegovina. Intech;p 115-9 .
103. Wu WC, Yeh PT, Chen SN, Yang CM, Lai CC, Kuo HK. Effects and complications of bevacizumab use in patients with retinopathy of prematurity. *Ophthalmology*. 2011 Jan;118(1):176-83.

104. Darlow BA, Ells AL, Gilbert CE, Gole GA, Quinn GE. Are we there yet? Bevacizumab therapy for retinopathy of prematurity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2013 Mar;98(2):F170-4
105. Kuprjanowicz L, Kubasik-Kładna K, Modrzejewska M. Outcomes of surgical management of retinopathy of prematurity. *Klin Oczna.* 2014;116(2):138-41.
106. Chowers I, Banin E, Hemo Y, Porat R, Falk H, Keshet E, Pe'er J, Panet A. Gene transfer by viral vectors into blood vessels in a rat model of retinopathy of prematurity. *Br J Ophthalmol.* 2001;85:991-5.
107. Papile L, Burstein J, Burstein R, Koffler H. Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage. A study of infants with birth weights less than 1,500 gm. *J Pediatr.* 1978;92:529-34.
108. Bomsel F. Radiologic study of hyaline membrane disease: 110 cases. *J Radiol Electrol Med Nucl.* 1970 May;51(5):259-68. [Article in French] Bomsel F.
109. Bell MJ, Ternberg JL, Feigin RD, et al. Neonatal necrotizing enterocolitis: therapeutic decisions based upon clinical staging. *Ann Surg.* 1978;187:1-7.
110. Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, et al. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001 Feb;98(5):2604-9.
111. Sase K, Michel T. Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets. *Life Sci.* 1995;57:2049-55.
112. Dunai G, Vásárhelyi B, Szabó M, Hajdú J, Mészáros G, Tulassay T, et al. Published genetic variants in retinopathy of prematurity: random forest analysis suggests a negligible contribution to risk and severity. *Curr Eye Res.* 2008;33(5):501-5.

113. Kalmeh ZA, Azarpira N, Mosallaei M, Hosseini H, Malekpour Z. Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor and risk for retinopathy of prematurity in South of Iran. *Mol Biol Rep.* 2013;40(7):4613-8.
114. Ezzidi I, Mtiraoui N, Mohamed MB, Mahjoub T, Kacem M, Almawi WY. Association of endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp, 4b/a, and -786T>C gene variants with diabetic nephropathy. *J Diabetes Complications.* 2008;22(5):331-8.
115. Taverna MJ, Elgrably F, Selmi H, Selam JL, Slama G. The T-786C and C774T endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms independently affect the onset pattern of severe diabetic retinopathy. *Nitric Oxide.* 2005;13(1):88-92.
116. The ALlele FREquency Database. A resource of gene frequency data on human populations supported by the U. S. National Science Foundation.
117. Yalcintepe S, Ozdemir O, Hacivelioglu SO, Akurut C, Koc E, Uludag A, et al. Multiple inherited thrombophilic gene polymorphisms in spontaneous abortions in Turkish population. *Int J Mol Cell Med.* 2015;4(2):120-7.
118. Gibson CS, MacLennan AH, Dekker GA, Goldwater PN, Dambrosia JM, Munroe DJ, et al. Genetic polymorphisms and spontaneous preterm birth. *Obstet Gynecol.* 2007;109:384-91.
119. Bunjevacki V, Maksimovic N, Jekic B, Milic V, Lukovic Lj, Novakovic, et al. Polymorphisms of the eNOS gene are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2015 Mar 26.
120. Brooks SE, Gu X, Samuel S, Marcus DM, Bartoli M, Huang PL, et al. Reduced severity of oxygen-induced retinopathy in eNOS-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:222–8.
121. Beauchamp MH, Sennlaub F, Speranza G, Gobeil F Jr, Checchin D, Kermorvant-Duchemin E, et al. Redox-dependent effects of nitric oxide on microvascular integrity in oxygen-induced retinopathy. *Free Radic Biol Med.* 2004;37:1885–94.

122. Powell JA, Mohamed SN, Kerr JS, Mousa SA. Antiangiogenesis efficacy of nitric oxide donors. *J Cell Biochem.* 2000;80:104–14.
123. Ando A, Yang A, Mori K, Yamada H, Yamada E, Takahashi K, et al. Nitric oxide is proangiogenic in the retina and choroid. *J Cell Physiol.* 2002;191:116–24.
124. Campochiaro PA. Retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol.* 2000;184:301–10.
125. Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, Takemoto F, Hara S, Yamada A, et al. Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;245:190–3.
126. Hoffmann IS, Tavares-Mordwinkin R, Castejon AM, Alfieri AB, Cubeddu LX. Endothelial nitric oxide synthase polymorphism, nitric oxide production, salt sensitivity and cardiovascular risk factors in Hispanics. *J Hum Hypertens.* 2005;19:233–40.
127. Li R, Lyn D, Lapu-Bula R, Oduwole A, Igho-Pemu P, Lankford B, et al. Relation of endothelial nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide level, endothelial function, and blood pressure in African Americans. *Am J Hypertens.* 2004;17:560–7.
128. Hibberd ML, Millward BA, Wong FS, Demaine AG. T-cell receptor constant beta chain polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes. *Diabet Med.* 1992;9:929–33.
129. Darlow B, Hutchinson J, Henderson-Smart D, Donoghue D, Simpson J, Evans N. Prenatal risk factors for severe retinopathy of prematurity among very preterm infants of the Australian and New Zealand Neonatal Network. *Pediatrics.* 2005;115(4):990-6.
130. Good WV, Hardy RJ, Dobson V, Palmer EA, Phelps DL, Quintos M, Tung B; Early Treatment for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. The incidence and course of retinopathy of prematurity: findings from the early treatment for retinopathy of prematurity study. *Pediatrics.* 2005 Jul;116(1):15-23.



131. Fortes Filho JB, Bonomo PP, Maia M, Procianoy RS. Weight gain measured at 6 weeks after birth as a predictor for severe retinopathy of prematurity: study with 317 very low birth weight preterm babies. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009 Jun;247(6):831-6.
132. Slidsborg C, Olesen HB, Jensen PK, Jensen H, Nissen KR, Greisen G, et al. Treatment for retinopathy of prematurity in Denmark in a ten-year period (1996-2005): is the incidence increasing? *Pediatrics*. 2008;121:97-105.
133. Manzoni P, Farina D, Maestri A, Giovannozzi C, Leonessa ML, Arisio R, et al. Mode of delivery and threshold retinopathy of prematurity in pre-term ELBW neonates. *Acta Paediatr*. 2007 Feb;96(2):221-6.
134. Pinheiro AM, da Silva WA, Bessa CG, Cunha HM, Ferreira MA, Gomes AH. Incidence and risk factors of retinopathy of prematurity in University Hospital Onofre Lopes, Natal (RN)-Brazil. *Arq Bras Oftalmol*. 2009 Jul-Aug;72(4):451-6.
135. Lubetzky R, Stolovitch C, Dollberg S, Mimouni FB, Salomon M, Mandel D. Nucleated red blood cells in preterm infants with retinopathy of prematurity. *Pediatrics*. 2005 Nov;116(5):e619-22.
136. Shah VA, Yeo CL, Ling YL, Ho LY. Incidence, risk factors of retinopathy of prematurity among very low birth weight infants in Singapore. *Ann Acad Med Singapore*. 2005 Mar;34(2):169-78.
137. Hoogerwerf A, Schalijs-Delfos NE, van Schooneveld MJ, Termote JU. Incidence of retinopathy of prematurity over the last decade in the Central Netherlands. *Neonatology*. 2010;98(2):137-42.
138. Windsor RL, Windsor LK. Understanding retinopathy of prematurity. *Vision Improvement Journal*. 2002;7:4.
139. Regev R, Lusky A, Dolfen T, Litmanovitz I, Arnon S, Reichman B. Excess mortality and morbidity among small-for-gestational-age premature infants: a population-based study. *J Pediatr*. 2003;143:186-91.

140. Fortes Filho JB, Valiatti FB, Eckert GU, Costa MC, Silveira RC, Procianoy RS. Is being small for gestational age a risk factor for retinopathy of prematurity? A study with 345 very low birth weight preterm infants. *J Pediatr (Rio J)*. 2009 Jan-Feb;85(1):48-54.
141. Tin W. Optimal oxygen saturation for preterm babies. Do we really know? *Biol Neonate*. 2004;85:319-25.
142. Saugstad OD. Is oxygen more toxic than currently believed? *Pediatrics*. 2001 Nov;108(5):1203-5.
143. Wang CL, Anderson C, Leone TA, Rich W, Govindaswami B, Finer NN. Resuscitation of preterm neonates by using room air or 100% oxygen. *Pediatrics*. 2008;121:1083-9.
144. Askie LM, Henderson-Smart DJ, Ko H. Restricted versus liberal oxygen exposure for preventing morbidity and mortality in preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009 Jan 21;(1):CD001077.
145. American Academy of Pediatrics and American College of Obstetricians and Gynaecologists. Clinical considerations in the use of oxygen. In: *Guidelines for Perinatal Care*. RK Freeman, RL Poland, JC Hauth, GB Merenstein, eds. 1992;212-6.
146. Saugstad OD. Oxygen and retinopathy of prematurity. *J Perinatol*. 2006;26:46-50.
147. Bourla DH, Gonzales CR, Valijan S, Yu F, Mango CW, Schwartz SD. Association of systemic risk factors with the progression of laser-treated retinopathy of prematurity to retinal detachment. *Retina*. 2008 Mar;28(3 Suppl):58-64.
148. Romagnoli C. Risk factors and growth factors in ROP. *Early Hum Dev*. 2009;(10 Suppl):79-82.
149. Markova A, Jurcukova M, Dort J, Huml P, Dortova E, Horakova N. Evaluation of risk factors for retinopathy of prematurity genesis, ocular errors, and psychometric

development in 9rematurely born children in West Bohemia: twelve years longitudinal study. *Cesk Slov Oftalmol.* 2009;65:24–8.

150. Brown DR, Biglan AW, Stretavski MM. Retinopathy of prematurity: the relationship with intraventricular hemorrhage and bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus.* 1990 Sep-Oct;27(5):268-71.
151. The BOOST-II Australia and United Kingdom Collaborative Groups. Outcomes of Two Trials of Oxygen-Saturation Targets in Preterm Infants. *N Engl J Med.* 2016;374:749-60.
152. Smith LE. Pathogenesis of retinopathy of prematurity. *Semin Neonatol.* 2003 Dec;8(6):469-73.
153. The Italian ROP Study Group. Italian multicentre study on retinopathy of prematurity. *Eur J Pediatr.* 1997 Dec;156(12):939-43.
154. Chen M, Citil A, McCabe F, Leicht KM, Fiascone J, Dammann CE, et al. Infection, oxygen, and immaturity: interacting risk factors for retinopathy of prematurity. *Neonatology.* 2011;99(2):125-32.
155. Englert JA, Saunders RA, Purohit D, Hulsey TC, Ebeling M. The effect of anemia on retinopathy of prematurity in extremely low birth weight infants. *J Perinatol.* 2001 Jan-Feb;21 (1):21-6.
156. Romeo MG, Tina LG, Scuderi A, Di Pietro M, Caracciolo M, Distefano G. [Variations of blood bilirubin levels in the newborn with and without retinopathy of prematurity (ROP)]. *Pediatr Med Chir.* 1994 Jan-Feb;16(1):59-62.
157. Milner JD, Aly HZ, Ward LB, El-Mohandes A. Does elevated peak bilirubin protect from retinopathy of prematurity in very low birthweight infants. *J Perinatol.* 2003;23:208-11.
158. Procianoy RS, Garcia-Prats JA, Hittner HM, Adams JM, Rudolph AJ. An association between retinopathy of prematurity and intraventricular hemorrhage in very low birth weight infants. *Acta Paediatr Scand.* 1981 Jul;70(4):473-7.

159. De Paz JE, Aghai Z, Konduru GG. Severe intraventricular hemorrhage, a marker of severe retinopathy of prematurity. *Pediatric Research*. 1999; 45: 194A–194A.
160. Watts P, Adams GG, Thomas RM, Bunce C. Intraventricular haemorrhage and stage 3 retinopathy of prematurity, *Br J Ophthalmol*. 2000 Jun;84(6):596-9.
161. Hellström A, Engström E, Hård AL, Albertsson-Wikland K, Carlsson B, Niklasson A, Löfqvist C, Svensson E, Holm S, Ewald U, Holmström G, Smith LE. Postnatal serum insulin-like growth factor I deficiency is associated with retinopathy of prematurity and other complications of premature birth. *Pediatrics*. 2003 Nov;112(5):1016-20.
162. Lad EM, Hernandez-Boussard T, Morton JM, Moshfeghi DM. Incidence of retinopathy of prematurity in the United States: 1997 through 2005. *Am J Ophthalmol*. 2009 Sep;148(3):451-8.
163. Seiberth V, Linderkamp O. Risk factors in retinopathy of prematurity. a multivariate statistical analysis. *Ophthalmologica*. 2000;214(2):131-5.
164. Ford GS, Davis RM, Cheeseman E, Wee D. Evaluating necrotizing enterocolitis as a potential risk factor for advanced-stage retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(13):3150.
165. Vataavuk Z, Benčić G, Andrijević Derk B, Mandić Z. Suvremeni pristup liječenju retinopatije nedonoščadi. Suvremeni dijagnostičko-terapijski postupci u oftalmologiji. 2008;78:113-6.
166. Gilbert CE, Foster A. Childhood blindness in context of VISION 2020: the right to sight. *Bull WHO*. 2001;79:227-32.

## **SPISAK SKRAĆENICA**

ROP – Retinopathy of prematurity- prematurna retinopatija

RLF – Retrolentalna fibroplazija

OIR – Oxygen induced retinopathy, kiseonikom indukovana retinopatija

ICROP – International Classification for Rethinopathy of Prematurity, internacionalna klasifikacija retinopatije prematuriteta

AP ROP – Agresivni oblik retinopatije prematuriteta

VNTR – Variable Number Tandem Repeats-polimorfizmi broja uzastopnih ponovaka

SNP – Single Nucleotide Polimorphysm, polimorfizmi pojedinačnog nukleotida

I/D – Inserciono/delecioni polimorfizmi

GWAS – Genome Wide association Studies ,studije asocijacije celog genoma

NO – Azot monoksid

HIF – 1 Hipoksija indukovani faktor 1

PKB – Protein kinaza B

VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor, vaskularni endotelni faktor rasta

eNOS – Endothelial Nitric Oxide Synthase, endotelna azot oksid sintetaza

nNOS – neuralna azot oksid sintetaza

iNOS – inducibilna azot oksid sintetaza

cGMP – ciklični guanozin-monofosfat

NG – Nedelja gestacije

TM – Telesna masa

CRYO ROP – Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity, Krioterapija ROPa

NDP – Norrie disease

iRNK – Informaciona ribonukleinska kiselina

5'-UTR- 5' – untranslated region

3'-UTR- 3' – untranslated region

IGF1 – Insulin-like Growth Factor 1, Insulinu sličan hormon rasta 1

ACE – Angiotensin Converting Enzyme, angiotenzin konvertujući enzim

RAS – Renin angiotenzin sistem

FEVR – Familijarna eksudativna vitreoretinopatija

LFC – Laser fotokoagulacija

ETROP Study – The Early Treatment for Retinopathy of Prematurity, rani tretman retinopatije prematuriteta, studija

IVB – Intravitrealno bevacizumab

DNK – Dezoksiribonukleinska kiselina

BEAT ROP – Bevacizumab Eliminates the Angiogenic Threat of Retinopathy of Prematurity

CPAP – Kontinuirani pozitivni pritisak na kraju inspirijuma

AS – Apgar skor

AGA – Appropriate for Gestational Age, deca odgovarajuća za gestacijsku starost

SGA – Smal for Gestational Age, deca mala za gestacijsku starost

LGA – Larg for Gestational Age, deca velika za gestacijsku starost

PA – Perinatalna asfiksija

RDS – Respiratorni distres sindrom

BPD – Bronhopulmonalna displazija

IVH – Intraventrikularna hemoragija

NEC – Nekrotični enterokolitis

WHO - Svetska zdravstvena organizacija

## BIOGRAFIJA AUTORA

Pantelić Jelica rođena je 12.06.1970. godine u Bihaću. Osnovnu i srednju prirodno matematičku školu završila je u Priboju 1989. godine.

Medicinski fakultet u Beogradu je upisala iste godine i stekla diplomu doktora medicine 25.5.1995. godine, sa prosečnom ocenom 9.00 (devet) i ocenom na diplomskom ispitu 10 (deset).

Obavezan lekarski staž obavljala je od jula 1995.god. do jula 1996.god. u DZ Voždovac i Kliničkom Centru Srbije, a jula 1996. godine položila stručni ispit.

Specijalizaciju iz oftalmologije na Medicinskom fakultetu u Beogradu upisala je 1996. godine, a specijalistički ispit položila sa odličnom ocenom 29.01.2001. godine.

Na Klinici za očne bolesti, Kliničkog Centra Srbije je zaposlena na neodređeno vreme od avgusta 2000 godine. Kao lekar specijalista oftalmolog od 2000-2006. godine je radila na odeljenju za uveite. Od 2006. godine radi na dečijem odeljenju Očne klinike. U svakodnevnom kliničkom radu bavi se dijagnostikom, medikamentnom, laser i hirurškom terapijom oboljenja oka u dečijem uzrastu. Na hitnim dežurstvima zbrinjava povrede oka.

Završila je školu ultrazvuka (primena ultrazvuka u oftalmologiji) u Kragujevcu, 2001.godine, a zatim se praktično usavršavala u ovoj oblasti na Klinici za očne bolesti KCS. Završila je kurs fakoemulzifikacije 2004. godine.

Na Medicinskom fakultetu u Beogradu, odsek oftalmologija, magistrirala je 5. 9. 2008. godine sa temom "Vrsta i obim zahvaćenosti krvnih sudova mrežnjače u Behcetovoj bolesti".

U evropski projekat uvođenja novih antiglaukomnih lekova u dečijem uzrastu bila je uključena i referisala na završnom sastanku u Pragu 2008. godine.



Učestvovala je i referisala na osnivačkom skupu projekta Ministarstva zdravlja “Prematurna retinopatija“ održanog u Novom Sadu 2007. godine. Član je tima za prematurnu retinopatiju pri Ministarstvu zdravlja.

Završila je obuku za pregled i terapiju aktivnih oblika retinopatije prematuriteta 2009. godine.

Od januara 2010. godine obavlja skrining na ROP u jedinicama intenzivne i poluintenzivne nege KGA KCS.

Na Medicinskom fakultetu u Beogradu 2011. godine prijavljuje temu za izradu doktorske disertacije pod nazivom: “Ispitivanje polimorfizama eNOS gena kao faktora rizika za razvoj retinopatije prevremeno rođene dece”, čiji je mentor prof. dr Ivan Stefanović, a komentor doc. dr Tatjana Damnjanović, koja je odobrena od strane Nastavno-naučnog veća, novembra 2012. godine.

Aktivno učestvuje na domaćim i međunarodnim naučnim skupovima. Do sada je objavila 3 rada u domaćim i inostranim časopisima, i prezentovala više radova na sekcijama i kongresima oftalmologa u zemlji i inostranstvu.

Od maja 2015. godine načelnik je dečijeg odeljenja Klinike za očne bolesti KCS.

Član je Udruženja oftalmologa Srbije i Srpskog lekarskog društva.

Udata je i majka dvoje dece.

Prilog 1.

## Izjava o autorstvu

Potpisani-a Jelena Tahirović

broj upisa \_\_\_\_\_

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Ispitivanje polimorfizama eNOS gena kao faktora rizika za razvoj retinopatije prerano rođene dece

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

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

Jelena Tahirović

Prilog 2.

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Jelica Pantelić

Broj upisa \_\_\_\_\_

Studijski program \_\_\_\_\_

Naslov rada Ispitivanje polimorfizama ekso gena kao faktora rizika za razvoj zetihepatije prve vrste zodehe dece

Mentor Prof. dr Ivan Stefanović

Potpisani Jelica Pantelić

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

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

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

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

Jelica Pantelić

### Prilog 3.

## Izjava o korišćenju

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

Ispitivanje polimorfizama eNOS gena kao faktora rizika za razvoj hipertenzije prerazmerno ređene dece

koja je moje autorsko delo.

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

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

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

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

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

Jelena Marković