

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA MURKOVIČ
MAGISTRSKA NALOGA
MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA MURKOVIČ

**POGOSTOST POLIMORFIZMOV KANDIDATNIH GENOV
PRI BOLNIKI S PERIFERNO ARTERIJSKO BOLEZNIJO**

**FREQUENCY OF POLYMORPHISMS IN CANDIDATE
GENES IN PATIENTS WITH PERIPHERAL ARTERIAL
DISEASE**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Kliničnem oddelku za žilne bolezni Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, pod mentorstvom doc. dr. Mojce Božič Mijovski, univ. dipl. biol., spec. med. biokem..

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem doc. dr. Mojci Božič Mijovski za mentorstvo, strokovno usmerjanje, nasvete in vzpodbudne besede.

Posebno zahvalo namenjam družini in vsem bližnjim, ki so mi tekom študija stali ob strani in me podpirali.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Mojce Božič Mijovski, univ. dipl. biol., spec. med. biokem..

Ljubljana, 2017

Maja Murkovič

Predsednik komisije: prof. dr. Darko Černe

Mentorica: doc. dr. Mojca Božič Mijovski

Član komisije: doc. dr. Bojan Doljak

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	I
KAZALO SLIK.....	II
KAZALO PREGLEDNIC.....	II
POVZETEK	IV
KLJUČNE BESEDE	V
ABSTRACT	VI
KEY WORDS	VII
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VIII
1 UVOD.....	1
1.1 PERIFERNA ARTERIJSKA BOLEZEN	1
1.1.1 Epidemiologija in dejavniki tveganja.....	2
1.1.2 Patofiziologija	3
1.1.3 Diagnostika.....	4
1.1.4 Zdravljenje	5
1.2 GENETSKI KAZALNIKI PAB IN USPEŠNOSTI PTA.....	7
1.2.1 NR4A2	8
1.2.2 PECAM-1.....	9
1.2.3 IL-6.....	10
1.2.4 KROMOSOM 12	11
2 NAMEN DELA.....	12
3 PREISKOVANCI, MATERIALI IN METODE.....	13
3.1 PREISKOVANCI	13
3.1.1 Raziskava A.....	13
3.1.2 Raziskava B.....	13
3.2 ODVZEM KRVI IN OSAMITEV DNA	14
3.3 DOLOČITEV GENOTIPOV	14
3.3.1 Oprema in pripomočki	15
3.3.2 Reagenti za pripravo reakcijske mešanice	16
3.3.3 Potek dela.....	17
3.3.4 Vrednotenje rezultatov	18
3.4 STATISTIČNE METODE	19
4 REZULTATI	21
4.1 RAZISKAVA A	21
4.1.1 Opis preiskovancev	21

4.1.2 Hardy-Weinbergovo ravnotežje	21
4.1.3 Povezava med polimorfizmi in PAB oz. srčno-žilnimi dogodki	24
4.1.4 Povezava med haplotipi <i>NR4A2</i> in <i>PECAM1</i> ter PAB oz. srčno-žilnimi dogodki.....	26
4.2 RAZISKAVA B.....	28
4.2.1 Opis preiskovancev	28
4.2.2 Hardy-Weinbergovo ravnotežje	29
4.2.3 Povezava med polimorfizmi in restenozo po PTA.....	30
4.2.4 Povezava med haplotipi <i>NR4A2</i> in <i>PECAM1</i> ter restenozo po PTA	32
5. RAZPRAVA.....	34
5.1.1 RAZISKAVA A.....	34
5.1.2 RAZISKAVA B	36
6. SKLEP	39
7. PRILOGA.....	41
7.1 PRIMERJAVA RELATIVNE POGOSTOSTI GENOTIPOV Z ZDRAVIMI EVROPSKIMI PROSTOVOLJCI.....	41
7. LITERATURA	42

KAZALO SLIK

Slika 1: Prehodnost arterije pri zdravih posameznikih ter bolnikih s PAB.	1
Slika 2: Proces ateroskleroze.....	4
Slika 3: Merjenje GI (prirejeno po TASC II).	5
Slika 4: Perkutana transluminalna angioplastika.....	6
Slika 5: Mesto gena <i>NR4A2</i> na kromosomu 2.....	8
Slika 6: Haplotipi <i>NR4A2</i>	9
Slika 7: Mesto gena <i>PECAM1</i> na kromosomu 17.....	10
Slika 8: Mesto gena <i>IL6</i> na kromosomu 7.....	11
Slika 9: Mesto polimorfizma rs10861032 na kromosomu 12.	11
Slika 10: Fluorescenca reporterskega barvila pri alelni diskriminaciji.	15
Slika 11: Primer vrednotenja rezultatov alelne diskriminacije za polimorfizem rs668 v genu <i>PECAM1</i>	19

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Fontainova in Ruthefordova klasifikacija ishemije uda pri PAB.....	2
Preglednica 2: Mesto vezave TaqMan sond za določen polimorfizem.	16
Preglednica 3: Sestava reakcijske mešanice.	17
Preglednica 4: Pogoji reakcije pomnoževanja in alelne diskriminacije.	18

Preglednica 5: Opis vključenih bolnikov (prikazane so povprečne vrednosti in standardizirani odkloni ter p-vrednost).....	21
Preglednica 6: Opažena in pričakovana absolutna pogostost genotipov za posamezni polimorfizem.	23
Preglednica 7: Absolutna in relativna (%) pogostost genotipov v posamezni skupini preiskovancev.	25
Preglednica 8: Razmerje obetov (RO) in 95IZ za polimorfizem rs10861032 na kromosomu 12.	26
Preglednica 9: Pogostost haplotipov NR4A2.	27
Preglednica 10: Pogostost haplotipov PECAM1.....	27
Preglednica 11: Razmerje obetov (RO) in 95IZ za haplotipe PECAM1.....	28
Preglednica 12: Opis vključenih bolnikov (prikazane so povprečne vrednosti in standardizirani odkloni ter p-vrednost).	29
Preglednica 13: Opažena in pričakovana absolutna pogostost genotipov za posamezni polimorfizem.	30
Preglednica 14: Absolutna in relativna (%) pogostost genotipov v posamezni skupini preiskovancev.	31
Preglednica 15: Pogostost haplotipov NR4A2.	32
Preglednica 16: Pogostost haplotipov PECAM1.....	33
Preglednica 17: Relativna pogostost genotipov.	41

POVZETEK

Za periferno arterijsko bolezen (PAB) je značilna nezadostna oskrba perifernih tkiv z oksigenirano krvjo, ki jo v večini primerov povzroča ateroskleroza. Običajno so prizadete arterije spodnjih okončin. Kot posledica nezadostne prekrvavitve se pri bolnikih pojavi krčevita bolečina v mišicah nog. Ker je PAB v večini primerov posledica generalizirane ateroskleroze imajo ti bolniki večje tveganje za druge srčno-žilne dogodke. Za diagnosticiranje bolezni se uporablja meritev gleženjskega indeksa (GI).

V primeru napredovale PAB (kritična ishemija uda ali moteča krčevita bolečina) je potrebno opraviti revaskularizacijske posege. Za zdravljenje krajših zožitev se uporablja perkutana transluminalna angioplastika (PTA), ki je kljub dobri primarni uspešnosti omejena z razvojem restenoze.

Na razvoj PAB vplivajo dejavniki tveganja in genetska predispozicija. Dokazano je, da se GI v veliki meri deduje, vendar še ni znano za katere genske spremembe gre.

Namen naloge je bil ugotoviti povezavo med polimorfizmi rs12803, rs146608 in rs13428968 v genu *NR4A2*, rs668 in rs12953 v genu *PECAMI*, rs10499563 v genu *IL6* ter rs10861032 na kromosomu 12 in PAB, srčno-žilnimi dogodki ter restenozo po PTA. V ta namen smo zastavili dve raziskavi. V raziskavo A smo vključili 662 bolnikov s PAB in 615 bolnikov brez PAB, v raziskavo B pa 182 bolnikov z opravljeno PTA. Pri vseh bolnikih smo z reakcijo PCR v realnem času pomnožili odseke DNA, kjer se nahajajo polimorfizmi ter z alelno diskriminacijo določili genotipe.

V nalogi smo ugotovili, da preučevani polimorfizmi niso pogostejši pri bolnikih s PAB v primerjavi z vrstniki brez bolezni. Pri razdelitvi bolnikov na tiste, ki so utrpeli srčno-žilni dogodek in tiste brez dogodka pa smo odkrili, da so s pogostostjo srčno-žilnih dogodkov šibko povezani polimorfizmi rs668 v genu *PECAMI*, rs10499563 v genu *IL6* in rs10861032 na kromosomu 12 ter haplotip 4 v *PECAMI*. Pri rs668 je bil genotip GG povezan z 1,5-krat večjim tveganjem za večji dogodek, pri rs10499563 je bil genotip TT povezan z 1,6-krat večjim tveganjem za manjši dogodek, pri rs10861032 je bil genotip CC povezan z 2,4-krat večjim tveganjem za kakršnikoli oz. z 2,6-krat večjim tveganjem za manjši dogodek, pri haplotipih *PECAMI* pa je bil haplotip 4 povezan z 2,9-krat večjim tveganjem za kakršnikoli oz. z 3,9-krat večjim tveganjem za manjši dogodek. Za polimorfizme rs12803, rs146608 in rs13428968 v genu *NR4A2* nismo ugotovili povezave s pogostostjo srčno-žilnih dogodkov.

Z restenozo po PTA sta bila šibko povezana polimorfizma rs668 v genu *PECAMI* in rs10499563 v genu *IL6*. Pri polimorfizmu rs668 je bil genotip GG povezan z 1,9-krat manjšim tveganjem, pri polimorfizmu rs10499563 pa je bil genotip TT povezan z 2,3-krat večjim tveganjem. Za polimorfizme rs12803, rs146608 in rs13428968 v genu *NR4A2*, rs12953 v genu *PECAMI* in rs10861032 na kromosomu 12 nismo dokazali povezave z restenozo po PTA.

Odsotnost povezave nekaterih polimorfizmov kandidatnih genov s PAB, srčno-žilnimi dogodki in restenozo bi lahko bila posledica značilnosti preiskovancev, njihovega števila ali pa dejanske odsotnosti povezave. Na omenjene procese vplivajo številni dejavniki tveganja. Za ugotovitev povezave polimorfizmov kot neodvisnih dejavnikov tveganja bi bilo potrebno pri statistični analizi podatkov upoštevati tudi te dejavnike. Glede na to, da smo našli le šibke povezave, bi bilo potrebno ugotovitve potrditi na večji skupini preiskovancev. Smiselno bi bilo preučiti tudi povezavo medsebojne interakcije polimorfizmov z razvojem PAB, srčno-žilnih dogodkov in restenoze.

KLJUČNE BESEDE

Periferna arterijska bolezen, srčno-žilni dogodki, restenoza, polimorfizmi.

ABSTRACT

Peripheral arterial disease (PAD) is characterized by insufficient delivery of oxygenated blood to the peripheral tissues, which in most cases is caused by atherosclerosis. PAD usually affects arteries of the lower limbs. As a result of insufficient blood circulation, patients develop cramping pain in the leg muscles. These patients have a greater risk for other cardio-vascular events, because PAD is in most cases a consequence of generalized atherosclerosis. The measurement of the ankle-brachial index (ABI) is used for the diagnosis of the disease.

In the case of advanced PAD (critical limb ischemia or disturbing cramping pain), revascularization should be performed. Percutaneous transluminal angioplasty (PTA) is used to treat shorter narrowing, which despite its good primary performance is limited by the development of restenosis.

The development of PAD is influenced by risk factors and genetic predisposition. It has been proven that ABI is largely inherited, but it is not yet known for which genetic changes.

We aimed to investigate the association between polymorphisms rs12803, rs146608 and rs13428968 of the *NR4A2* gene, rs668 and rs12953 of the *PECAMI* gene, rs10499563 of the *IL6* gene and rs10861032 on chromosome 12 and PAD, cardio-vascular events and restenosis after PTA. To this end, we have set two surveys. In study A we enrolled 662 patients with PAD and 615 patients without PAD, while in study B there were 182 PTA patients. DNA sections, where polymorphisms are located, were multiplied with real-time PCR and genotypes were determined by allelic discrimination.

We found that the studied polymorphisms are not more frequent in patients with PAD compared to peers without disease. In the patients distribution to those who suffered a cardio-vascular event and those without an event, we found that the polymorphisms rs668 of the *PECAMI* gene, rs10499563 of the *IL6* gene, rs10861032 on chromosome 12 and the haplotype 4 in *PECAMI* are weakly associated with frequency of cardio-vascular events. GG genotype in polymorphism rs668 was associated with a 1.5-fold higher risk for a major event, TT genotype in rs10499563 was associated with a 1.6-fold higher risk for a minor event, CC genotype in rs10861032 was associated with a 2.4-fold higher risk for any event or with 2.6-fold higher risk for a minor event, and haplotype 4 in *PECAMI* was associated with a 2.9-fold higher risk for any or a 3.9-fold higher risk for a minor event. Polymorphisms

rs12803, rs146608 and rs13428968 of the *NR4A2* gene was not associated with the frequency of cardio-vascular events.

With restenosis after PTA was weakly associated polymorphisms rs668 of the *PECAM1* gene and rs10499563 of the *IL6* gene. GG genotype in polymorphism rs668 was associated with a 1.9-fold lower risk, and TT genotype in polymorphism rs10499563 was associated with a 2.3-fold higher risk. Polymorphisms rs12803, rs146608 and rs13428968 of the *NR4A2* gene, rs12953 of the *PECAM1* gene and rs10861032 on chromosome 12 was not associated with restenosis after PTA.

The absence of association of some polymorphisms in candidate genes with PAD, cardio-vascular events and restenosis could be a consequence of the actual absence of association or the characteristics of the subjects. These processes are influenced by many risk factors. To determine the association of polymorphisms as independent risk factors, these factors should also be taken into account in statistical data processing. Considering that only weak links were found, findings should be confirmed on a larger group of subjects. It would also be meaningful to investigate the association between the interaction of polymorphisms with the development of PAD, cardio-vascular events and restenosis.

KEY WORDS

Peripheral arterial disease, cardio-vascular events, restenosis, polymorphisms.

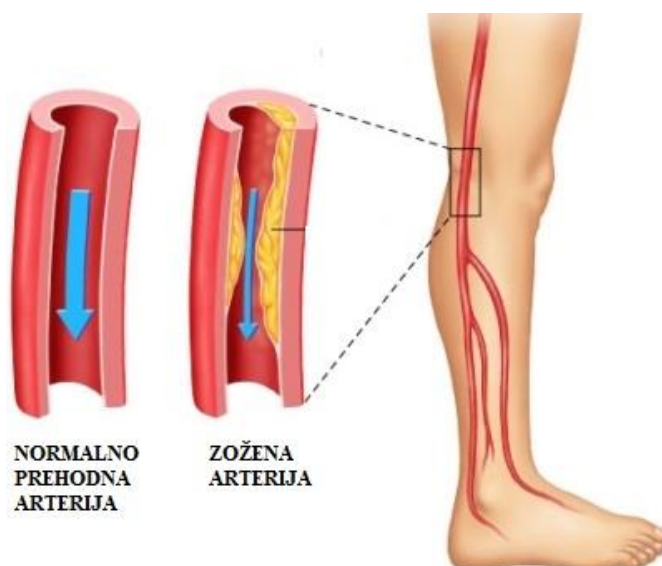
SEZNAM OKRAJŠAV

AKS	akutni koronarni sindrom
CRP	C-reaktivni protein
dNTP	deoksinukleozid-trifosfati
GI	gleženjski indeks
GMC	gladkomišične celice
IL-6	interlevkin-6
LDL	lipoprotein nizke gostote
MI	miokardni infarkt
NR4A2	jedrnemu receptorju podoben protein 1
PAB	periferna arterijska bolezen
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PECAM-1	trombocitna endotelijska adhezijska molekula 1
PKA	perkutana koronarna angioplastika
PTA	perkutana transluminalna angioplastika
RO	razmerje obetov
95IZ	95-odstotni interval zaupanja

1 UVOD

1.1 PERIFERNA ARTERIJSKA BOLEZEN

Periferna arterijska bolezen (PAB) je eden izmed najpogostejših vzrokov obolevnosti in umrljivosti v razvitem svetu (1). Definirana je kot delna ali popolna odpoved arterijskega krvnega obtoka za preskrbo perifernih tkiv z oksigenirano krvjo. Najpogostejši vzrok za razvoj bolezni je ateroskleroza, ki zmanjša prehodnost arterij (*slika 1*). Kljub temu pa se lahko razvije tudi kot posledica katerekoli bolezni, ki povzroča zožitev (stenozo) ali zaporo (okluzijo) arterije: zagozditev arterije, strdek, embolija, fibromuskularna displazija, disekcija, poškodba, vaskulitis, vazospazm,... Običajno so prizadete arterije spodnjih okončin.



Slika 1: Prehodnost arterije pri zdravih posameznikih ter bolnikih s PAB.

Zmanjšanje pretoka krvi skozi arterije v zgodnjih fazah bolezni ne povzroča opaznih simptomov (asimptomatska PAB). Prvi opazni znak nezadostne prekrvavitve spodnjih okončin je krčem podobna ishemična bolečina v mišicah nog med hojo, ki običajno hitro preneha v mirovanju (t.i. intermitentna klavdikacija). Sprva je razdalja, ki jo bolnik lahko prehodi brez bolečin, daljša, z napredovanjem bolezni pa se ta razdalja krajša. V napredovali stopnji bolezni je ishemična bolečina prisotna že v mirovanju (kritična ishemija). Nadaljnje napredovanje bolezni vodi v ishemične razjede, gangreno in izgubo tkiva. Ker je PAB v večini primerov znak generalizirane ateroskleroze, imajo ti bolniki večje tveganje za

srčno-žilne dogodke, kot so ishemična možganska kap, akutni koronarni sindrom (AKS) in srčna smrt (2).

Za opredelitev stopnje PAB se uporabljata Fontainova in Ruthefordova klasifikacija (*preglednica 1*), ki temeljita na simptomih in kliničnih meritvah (3).

Preglednica 1: Fontainova in Ruthefordova klasifikacija ishemije uda pri PAB.

Fontainova klasifikacija		Ruthefordova klasifikacija	
Stadij I	Asimptomatska (brez simptomov)	0	Asimptomatska (brez simptomov)
Stadij II	Intermitentna klavdikacija (ishemična bolečina med hojo)	1	Blaga klavdikacija
Ila	Blaga klavdikacija (dolga klavdikacijska razdalja > 200 m)	2	Zmerna klavdikacija
Ilb	Zmerna do huda klavdikacija (kratka klavdikacijska razdalja < 200 m)	3	Huda klavdikacija
Stadij III	Ishemična bolečina v mirovanju	4	Ishemična bolečina v mirovanju
Stadij IV	Razjeda in/ali gangrena	5	Majhna izguba tkiva
		6	Obsežna izguba tkiva

Pri bolnikih se poleg bolečine v mišicah pojavijo tudi druge spremembe na nogah: bleda ali modrikasta barva kože, zmanjšana rast dlak in nohtov, hladna in svetlikajoča koža, slabo celjenje ran ter šibek stopalni pulz ali njegova odsotnost (4).

1.1.1 Epidemiologija in dejavniki tveganja

PAB je v 21. stoletju postala globalni zdravstveni problem. Leta 2010 je po svetu z boleznijo živelo 202 milijonov ljudi; v Evropi in Severni Ameriki približno 27 milijonov. Med letoma 2000 in 2010 je število obolelih zaradi podaljšane pričakovane življenjske dobe in spremenjenega življenjskega sloga narastlo; v srednje razvitih in nerazvitih regijah za 29 odstotkov, v visoko razvitih regijah pa za 13 odstotkov (5). V razvitih državah ima asimptomatsko PAB 15-20 odstotkov prebivalcev, ki so starejši od 55 let, intermitentno klavdikacijo 5 odstotkov, kritično ishemijo pa 0,1 odstotka (6).

Glavni dejavniki tveganja za razvoj PAB so kajenje, hiperlipidemija, hipertenzija in sladkorna bolezen. Posamezniki s temi dejavniki tveganja pogosteje razvijejo PAB, napredovanje bolezni je pri njih hitrejše ter imajo večje tveganja za druge srčno-žilne dogodke in zgodnjo smrtnost.

Drugi dejavniki tvegana so rasa (pogostejša pri temnopoltih ljudeh), kronična ledvična bolezen, metabolični sindrom ter povišane vrednosti C-reaktivnega proteina (CRP), β_2 -mikroglobulina, cistatina C, lipoproteina(a) in homocisteina (7).

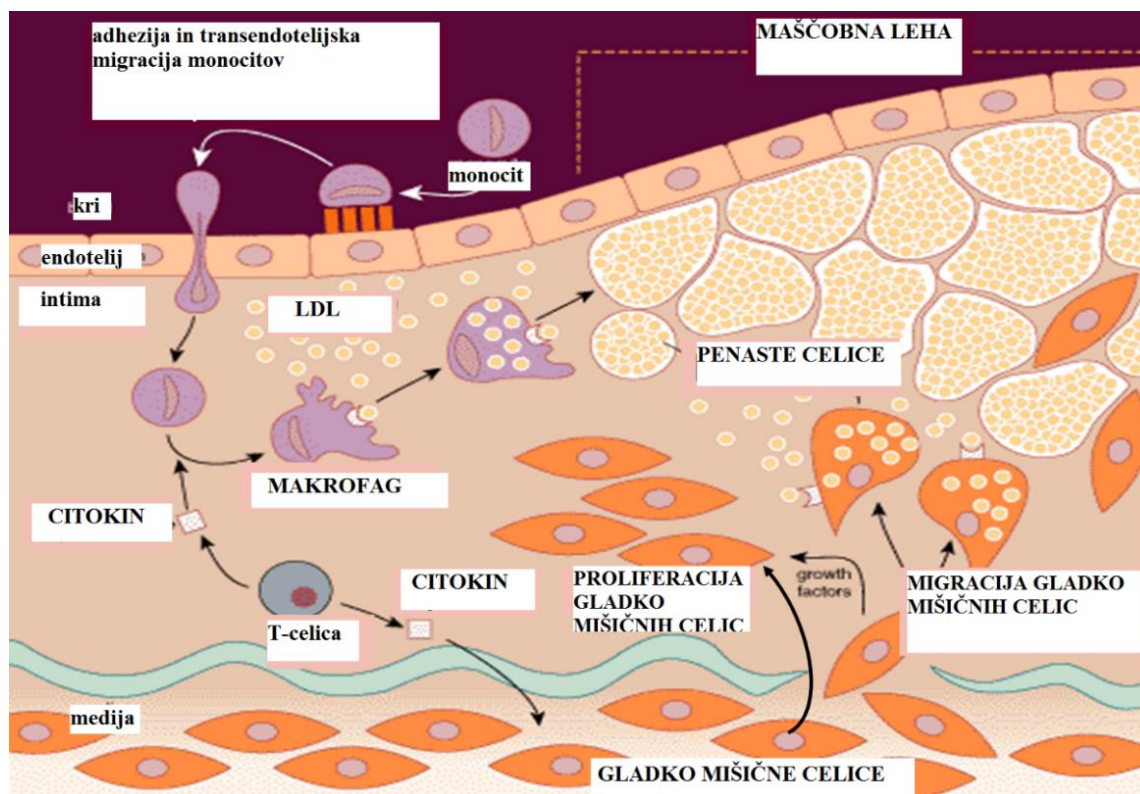
1.1.2 Patofiziologija

Ateroskleroza perifernih arterij je kronično in počasi razvijajoče stanje, ki postopoma oži svetlino arterije in tako onemogoča njihovo normalno prekrvavitev (8). Aterosklerozo lahko s poškodbo žilnega endotelija ter spodbujanjem vnetja v steni arterije povzročijo hipertenzija (fizična poškodba endotelija), hiperlipidemija (spodbujanje vnetja), sladkorna bolezen (glikirani produkti delujejo toksično na endotelij in spodbujajo vnetje), hiperhomocisteinemija (previsoke vrednosti delujejo toksično na endotelij), kajenje ali onesnažen zrak (nastajanje radikalov), virusi,...

V normalnih pogojih žilni endotelij preprečuje nekontrolirano prehajanje snovi iz krvnega obtoka v žilno steno. Zaradi poškodbe pa se tesni stiki med endotelijskimi celicami razrahljajo, kar omogoča pospešeno prehajanje snovi v subendotelijski del žilne stene. Za razvoj ateroskleroze je pomembno predvsem prehajanje lipoproteinov nizke gostote (LDL), iz katerih zaradi oksidacijske modifikacije nastanejo oksidirani LDL.

Endotelijske celice kot vnetni odgovor na poškodbo ter prisotnost oksidiranih LDL v subendotelijskem prostoru na svoji površini izpostavijo adhezijske molekule. Te povzročijo povečano adhezijo monocitov in limfocitov T iz krvnega obtoka na endotelij ter njihovo transendotelijsko migracijo. Po prehodu v subendotelijski prostor se monociti pod vplivom citokinov preobrazijo v makrofage. Makrofagi fagocitirajo oksidirane LDL in tako nastanejo penaste celice. Skupek penastih celic tvori maščobno leho.

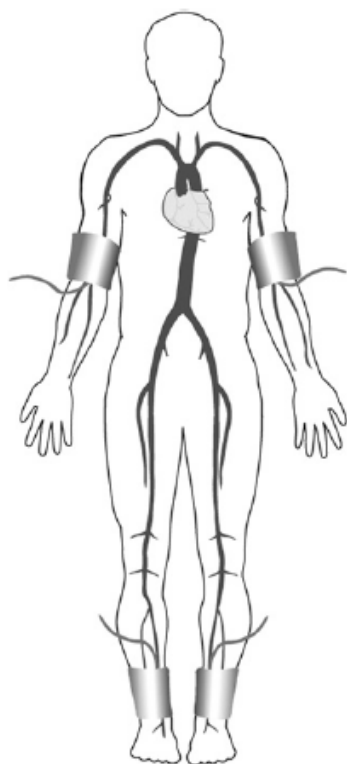
Gladkomišične celice (GMC) se pod vplivom citokinov in rastnih dejavnikov začnejo razmnoževati ter premikati iz medije v intimo. V intimo izločajo kolagen, elastin in proteoglikane, kar prispeva k rasti aterosklerotične spremembe na žilni steni. Poleg tega pa GMC, prav tako kot makrofagi, fagocitirajo oksidirane LDL. Potek ateroskleroze je prikazan na *sliki 2* (9,10).



Slika 2: Proces ateroskleroze.

1.1.3 Diagnostika

Za izboljšanje kakovosti bolnikovega življenja in zmanjšanje tveganja za resne sekundarne srčno-žilne dogodke ter smrtnost je pomembno zgodnje odkrivanje in zdravljenje PAB. Primarni neinvazivni test za odkrivanje in diagnosticiranje PAB je merjenje gleženjskega indeksa (GI). Pri merjenju GI se ležečemu preiskovancu manšete sfigmomanometra namestijo tik nad gležnja ter na nadlahti. Z uporabo doplerskega detektorja se izmeri sistolični tlak posteriorne in anteriorne tibialne arterije gležnja ter sistolični tlak obeh nadlahti. Višji sistolični tlak vsakega gležnja se primerja z višjim sistoličnim tlakom nadlahti (desne ali leve roke), kot je prikazano na *sliki 3*. To razmerje imenujemo GI.



DESNI GI = razmerje med

Višji sistolični tlak desnega gležnja (posteriome ali anteriome tibialne arterije)

Višji sistolični tlak nadlahti (desne ali leve roke)

LEVI GI = razmerje med

Višji sistolični tlak levega gležnja (posteriome ali anteriome tibialne arterije)

Višji sistolični tlak nadlahti (desne ali leve roke)

Slika 3: Merjenje GI (prirejeno po TASC II).

Pri zdravih osebah je v ležečem položaju sistolični tlak gležnja enak ali malo večji od nadlahtnega. Vrednosti 0,91 – 1,30 so opredeljene kot normalni rezultati. Pri bolnikih s PAB pa je prisotna zožitev ali zapora arterije spodnjih okončin, ki povzroči znižanje sistoličnega tlaka gležnja. Vrednosti nižje od 0,90 so dokaz za prisotnost PAB. Resnost PAB in vrednost GI sta povezani; nižji GI predstavlja večjo zožitev oziroma zaporo arterije.

Večina bolnikov s PAB nima simptomov, ki so značilni za bolezen. Evropsko združenje za kardiologijo zaradi tega priporoča merjenje GI tudi pri vseh osebah, ki so starejše od 50 let in imajo srčno-žilne dejavnike tveganja (predvsem kajenje ter sladkorna bolezen) ali so starejše od 70 let, ne glede na dejavnike tveganja (11-13).

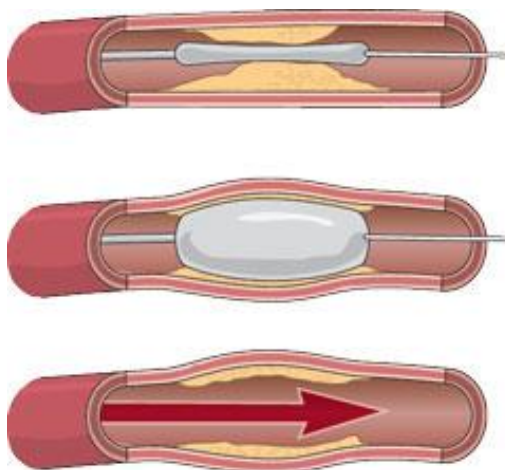
1.1.4 Zdravljenje

V začetnih stopnjah PAB skušamo s spremembo življenjskega sloga in uporabo zdravil upočasniti napredovanje bolezni ter preprečiti srčno-žilne dogodke. Sprememba življenjskega sloga vključuje zdravo prehrano, redno telesno vadbo in prenehanje kajenja. Pri bolnikih s sladkorno boleznijo, zvišanim krvnim tlakom in/ali povečano vrednostjo maščob v krvi je potrebno z zdravili vzdrževati ustrezne vrednosti glikiranega hemoglobina,

krvnega tlaka ter krvnih maščob. Za preprečevanje srčno-žilnih dogodkov pa se poleg vsega naštetega uporabljajo tudi antiagregacijska zdravila.

Pri bolnikih s kritično ishemijo uda in bolnikih, ki jim klavdikacijski simptomi močno poslabšajo kakovost življenja je potrebno opraviti revaskularizacijske posege. Za zdravljenje krajših arterijskih zožitev in zapor se uporablja perkutana transluminalna angioplastika (PTA), za zdravljenje daljših ali močno kalcificiranih arterijskih zapor pa klasična kirurška revaskularizacija. Kadar se pri bolnikih pojavi obsežna globoka nekroza tkiva je potrebno ud amputirati (14,15).

Pri PTA se balonski kateter na mestu zožitve oziroma zapore napihne pod visokim tlakom, kar razširi arterijo in omogoči njeno normalno prekrvavitev (*slika 4*).



Slika 4: Perkutana transluminalna angioplastika.

PTA je uveljavljena metoda, katere glavni prednosti sta nizka stopnja zapletov (0,5 – 4 %) in visoka stopnja tehnične uspešnosti (90 %). Med najpogostejše zaplete sodijo nastanek podplutbe in strdka ter razširitev in razpok žile. Dolgoročni uspeh PTA je kljub dobri primarni uspešnosti omejen z razvojem restenoze, ki se pojavi pri do 60 odstotkih bolnikov v prvih 12 mesecih po posegu. Pri restenozni gre za ponovno zožitev arterije na mestu posega. Najpogostejši dejavniki za razvoj restenoze po PTA so funkcionalne značilnosti arterije, dolžina in število sprememb na arterijah, stopnja in napredovanje PAB ter druge bolezni (predvsem sladkorna bolezen in kronična ledvična bolezen).

Med balonskim razširjanem nastanejo na arterijski steni poškodbe. Akuten odziv na te poškodbe vključuje adhezijo trombocitov in levkocitov, ki reagirajo s poškodovano arterijsko steno. Aktivirani trombociti sproščajo molekule, ki stimulirajo nastanek strdka na

mestu poškodbe. Pretiran akuten odziv lahko privede do nastanka tromboze. Vnetne molekule in strižne napetosti med posegom povzročijo migracijo in proliferacijo GMC. V mesecih po PTA lahko restenozo povzroči hiperplazija GMC v žilni steni (16-19).

1.2 GENETSKI KAZALNIKI PAB IN USPEŠNOSTI PTA

Povezava dednih dejavnikov z GI je bila opisana v raziskavi na 184 parih eno in dvojajčnih dvojčkov. Ugotovljeno je bilo ujemanje v vrednosti GI znotraj parov dvojčkov, ki je bilo statistično pomembno večje pri enojajčnih dvojčkih. Opažena variabilnost v vrednosti GI je bila v 48 odstotkih posledica dodatnih genetskih vplivov, ostalo pa posledica življenjskih navad (kajenje in gibanje). S tem se je pričelo iskanje genetskih kazalnikov, s katerimi bi lahko prepoznali posameznike z večjim tveganjem za PAB (20). Ker so bile pri bolnikih dokazane povišane vrednosti vnetnih molekul v plazmi, se je večina raziskav osredotočila na preučevanje genetskih variant, ki vplivajo na vrednosti teh molekul. V nekaterih raziskavah je bila ugotovljena povezava med polimorfizmi genov z zapisom za vnetne molekule (*IL6*, *SELE*, *ICAM1*) in PAB (21,22). Glede na znano vlogo ateroskleroze pri PAB so se raziskave usmerile tudi v preučevanje genov, ki vplivajo na metabolizem lipidov, endotelijsko funkcijo in trombozo, vendar ni bil odkrit primeren kazalnik (23).

Restenozo lahko v mesecih po PTA povzroči hiperplazija GMC v žilni steni, ki je regulirana s pro-vnetnimi mediatorji. Ugotovljena je bila povezava med pogostostjo restenoz oziroma reokluzij in polimorfizmi genov za *NR4A2*, *IL6* ter *IL1 β* (24-26).

Pri bolnikih z opravljeno perkutano koronarno angioplastiko (PKA) so z analizo celotnega genoma na kromosomu 12 odkrili regijo 12q23.3 kot potencialni dovzetnostni lokus za razvoj restenoze. Na tej kromosomski regiji se nahajata polimorfizma rs10861032 in rs9804922. Vendar pa vloga teh dveh polimorfizmov pri razvoju restenoze po PTA še ni znana (27).

Preučevani so bili tudi polimorfizmi, ki z vplivom na koagulacijske faktorje in trombocite povzročajo protrombotično stanje, kar lahko prispeva k večjemu tveganju za razvoj restenoze oziroma reokluzije. Vendar pa genotipizacija polimorfizmov protrombotičnih genov pri bolnikih po opravljeni femoropoplitealni PTA ni pokazala povezave z nastankom restenoze oziroma reokluzije (19).

1.2.1 NR4A2

Jedrnemu receptorju podoben protein 1 (NR4A2 oz. NURR1; ang. Nuclear receptor related protein 1), skupaj z NR4A1 in NR4A3 spada v NR4A podskupino jedrnih receptorjev. Nedavne študije so poudarile vlogo receptorjev NR4A kot pomembnih regulatorjev vnetnega odgovora. Vnetni dražljaji hitro inducirajo izražanje receptorjev NR4A, kar kaže na to, da so potrebni za začetek vnetja. Vendar pa imajo receptorji NR4A protivnetne lastnosti in so tako vključeni v negativni povratni mehanizem za vzdrževanje vnetnega ravnotežja (28).

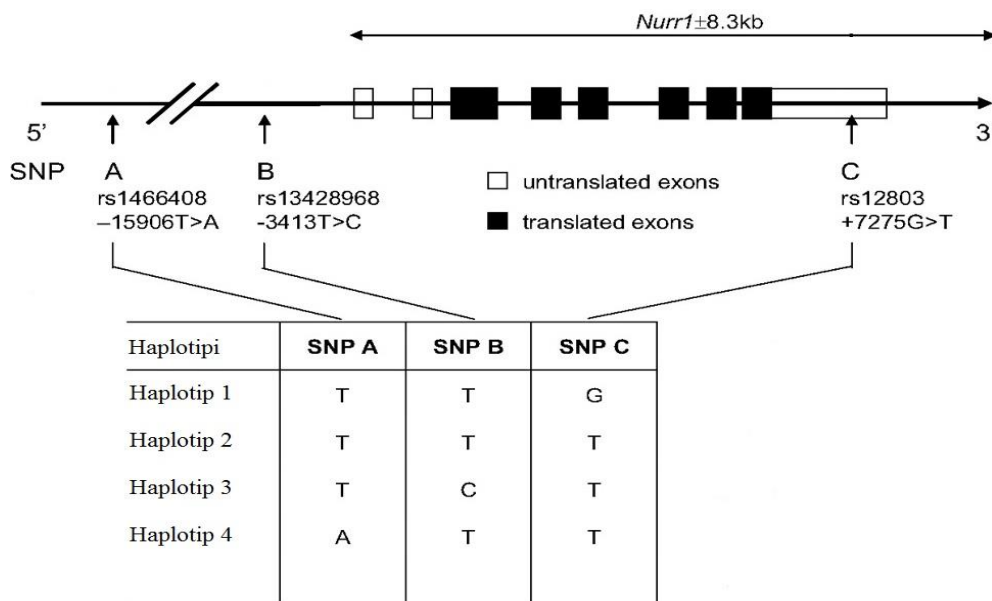
Ugotovljeno je bilo, da se NR4A2 ne izraža v zdravih arterijah. V aterosklerotičnih lezijah se kot odgovor na dražljaje izraža v jedru makrofagov in GMC. V makrofagih zmanjša vnetni odgovor ter privzem oksidiranih LDL, v GMC pa zavira njihovo proliferacijo ter vnetni odgovor (24, 29).

NR4A2 kodira gen *NR4A2*, ki se nahaja blizu sredine dolgega kraka kromosoma 2 (2q24.1) (slika 5) (30).



Slika 5: Mesto gena *NR4A2* na kromosomu 2.

V povezavi s srčno-žilnimi boleznimi so bili preučevani polimorfizmi rs1466408 (SNP A), rs13428968 (SNP B) in rs12803 (SNP C), pri katerih gre za zamenjavo nukleotida na mestu -15906, -3413 in +7275. Kombinacija različnih alelov na teh mestih tvori 4 haplotipe (slika 6).



Slika 6: Haplotipi NR4A2.

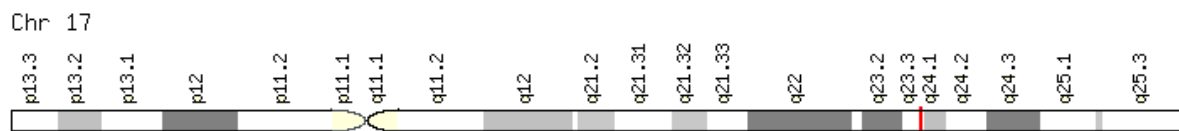
V študiji preučevanja povezanosti haplotipov *NR4A2* na srčno-žilne bolezni ni bilo ugotovljene povezave med haplotipi in GI, koronarnimi dogodki ter debelino intime in medije. Ugotovljena pa je bila povezava med haplotipom 2 ter aortno in koronarno kalcifikacijo (31). V drugi študiji je bila ugotovljena tudi povezava med haplotipoma 2 in 3 ter razvojem restenoze po femoropoplitalni PTA (32).

1.2.2 PECAM-1

Trombocitna endotelijska adhezijska molekula 1 (PECAM-1; ang. Platelet and endothelial cell adhesion molecule 1) ima pomembno vlogo pri mnogih vnetnih procesih, vključno z razvojem ateroskleroze in s tem PAB. V začetni stopnji aterogeneze sta pomembni adhezija in transendotelijska migracija levkocitov, ki sta regulirani z različnimi adhezijskimi molekulami. Ena izmed teh adhezijskih molekul je tudi PECAM-1.

PECAM-1, poznan tudi kot CD31, je 130 kDa glikoprotein, ki pripada imunoglobulinski naddružini. Sestavljen je iz 6 zunajceličnih imunoglobulinu podobnih domen (kodirane z eksoni 3-8), transmembranske domene (kodirana z eksonom 9) ter citoplazemskega repa (kodiran z eksoni 10-16). Izraža se na endotelijskih celicah in na površini trombocitov, monocitov, nevtrofilcev, limfocitov ter tkivnih bazofilcev. PECAM-1 je signalna molekula, ki vpliva na funkcijo trombocitov, angiogenezo, vaskulogenezo, regulacijo integrinov, aktivacijo T in B celic ter migracijo levkocitov skozi endotelij (33).

Gen *PECAMI* se nahaja blizu konca dolgega kraka kromosoma 17 (17q23.3) (slika 7). Do sedaj je bilo odkritih 11 različnih polimorfizmov gena, od katerih 3 kodirajo aminokislinsko substitucijo v molekuli PECAM-1 (34).



Slika 7: Mesto gena *PECAMI* na kromosomu 17.

Polimorfizma rs668 in rs12953 se nahajata v eksonu 3 in 8 zunajcelične domene, ki je odgovorna za vezavo PECAM-1 z drugimi molekulami. Polimorfizem rs668 v eksonu 3 na mestu +373 vključuje zamenjavo C z G (C373G), zaradi česar pride do zamenjave levcina z valinom na mestu 125 (Leu125Val). Polimorfizem rs12953 v eksonu 8 na mestu +1688 pa vključuje zamenjavo G z A (G1688A), zaradi česar pride do zamenjave serina z asparaginom na mestu 563 (Ser563Asn) (35,36). Polimorfizma sta v literaturi večinoma opisana v povezavi s srčno-žilnimi boleznimi, vendar se rezultati različnih raziskav med seboj ne ujemajo (36-43).

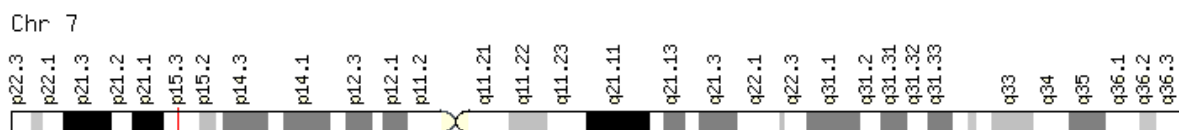
1.2.3 IL-6

Interlevkin-6 (IL-6) je 26 kDa citokin, ki ima pro in protivnetne lastnosti. V arterijski steni ga sintetizirajo makrofagi, GMC in endotelijske celice. Njegova najpomembnejša funkcija pri sistemskem vnetnem odgovoru in s tem verjetno tudi pri srčno-žilnih boleznih je reguliranje akutnega vnetnega odgovora. Preko stimulacije hepatocitov sproži sintezo proteinov akutne faze (CRP, β 2-fibrinogena, haptoglobina,...).

IL-6 ima neposredne pro in protiaterogene učinke na procese, povezane z nastankom in napredovanjem ateroskleroze. Z aktivacijo endotelijskih celic in trombocitov ter stimulacijo proliferacije GMC in privzema lipidov v makrofagih spodbuja aterosklerozo. Z zniževanjem plazemskih vrednosti LDL preko regulacije izražanja gena za LDL receptor pa zavira aterosklerozo (44-46).

Kljub svojim protivnetnim lastnostim pa na srčno-žilni sistem na splošno deluje škodljivo. Dokazano je bilo, da so povišane vrednosti IL-6 povezane z 2 do 3-krat večjim tveganjem za srčno-žilne bolezni. Prisotne so tudi pri bolnikih s PAB in se z napredovanjem bolezni višajo (47).

Gen *IL6* se nahaja na kratkem kraku kromosoma 7 (7p15.3) (slika 8) (48).



Slika 8: Mesto gena *IL6* na kromosomu 7.

Pri polimorfizmu rs10499563 gre za zamenjavo T s C na mestu -6331. Z genotipizacijo polimorfizma je bila ugotovljena povezava med koncentracijo IL-6 ter genotipom. Pri bolnikih, ki so jim opravili obvod koronarnih arterij sicer ni bilo pomembne povezave. Kljub temu pa so imeli bolniki z genotipom TT višje plazemske vrednosti IL-6 v primerjavi z bolniki z genotipom CC. Pri bolnikih po intenzivni parodontalni terapiji pa je bila ugotovljena pomembna povezava med genotipom in serumsko vrednostjo IL-6. Po 24 urah in 7 dneh od posega so pri bolnikih z genotipom TT izmerili pomembno višje vrednosti IL-6 v primerjavi z bolniki z genotipom CC. Tudi pri zdravih posameznikih iz severne Evrope je bil genotip TT povezan z višjimi vrednostmi IL-6 (49).

1.2.4 KROMOSOM 12

Kot dejavnik tveganja za razvoj restenoze po PKA je bila na kromosomu 12 odkrita regija 12q23.3 (slika 9), kjer se nahaja polimorfizem rs10861032.



Slika 9: Mesto polimorfizma rs10861032 na kromosomu 12.

Za ta polimorfizem ni znano kateremu genu pripada. Kot možni geni so opisani *STAB2*, *NT5DC3* in *C12orf42*. *STAB2* kodira velik transmembranski receptorski protein, ki z vplivom na angiogenezo, migracijo limfocitov in celično adhezijo lahko spodbuja razvoj restenoze in srčno-žilnih dogodkov. *NT5DC3* kodira protein, ki je vključen v celično proliferacijo in s tem prav tako vpliva na razvoj restenoze. Za protein, ki ga kodira *STAB2* pa ni znana vloga v organizmu (27,50). Pri polimorfizmu rs10861032 je bil z večjim tveganjem za razvoj restenoze po PKA povezan alel C (27).

2 NAMEN DELA

Namen naloge je ugotoviti ali so polimorfizmi rs12803, rs146608 in rs13428968 v genu *NR4A2*, rs668 in rs12953 v genu *PECAMI*, rs10499563 v genu *IL6* ter rs10861032 na kromosomu 12 pogostejši pri bolnikih s PAB v primerjavi z vrstniki brez nje ter ali so ti polimorfizmi povezani s pogostostjo srčno-žilnih dogodkov in restenozo po PTA.

V ta namen bomo:

- v raziskavo vključili bolnike s PAB in brez nje, pri katerih smo 5 let redno beležili srčno-žilne dogodke
- v raziskavo vključili bolnike z izvedeno PTA, pri katerih smo 1, 6 in 12 mesecev od posega merili prehodnost prizadete arterije
- z reakcijo PCR v realnem času pomnožili odseke DNA, kjer se nahajajo polimorfizmi ter z alelno diskriminacijo določili genotipe preiskovancev
- s statistično analizo ugotovili pogostost polimorfizmov pri bolnikih s PAB in brez nje
- s statistično analizo ugotovili povezanost polimorfizmov s pogostostjo srčno-žilnih dogodkov
- s statistično analizo ugotovili povezanost polimorfizmov z restenozo po PTA

3 PREISKOVANCI, MATERIALI IN METODE

3.1 PREISKOVANCI

3.1.1 Raziskava A

Preiskovance so v raziskavo vključili družinski zdravniki in internisti iz celotne Slovenije. Cilj je bil, da vključijo bolnike s PAB ter po številu, spolu in starosti primerljive osebe brez PAB, ki so predstavljali kontrolno skupino.

Vključitvena kriterija za bolnike s PAB sta bila znižan GI ($\leq 0,90$) na vsaj eni nogi in starost med 40 in 80 let. Kontrolno skupino so predstavljali bolniki brez PAB z GI 0,91 - 1,30, otipljivimi stopalnimi pulzi v obeh nogah in odsotnost zdravljenja zaradi PAB v preteklosti ter primerljiva starost (40 do 80 let). Izključitveni kriteriji za obe skupini so bili maligna ali kronična bolezen s pričakovanim preživetjem krajšim od 5 let, večji ishemični dogodek (akutni koronarni sindrom, možganska kap ali prehodni ishemični napad, akutna ali kronična kritična ishemija uda) v mesecu pred vključitvijo v raziskavo ali nosečnost.

Pri preiskovancih smo 5 let beležili srčno-žilne dogodke. Med večje klinične dogodke so bili uvrščeni akutni koronarni sindrom (AKS), ishemična možganska kap ter kritična ishemija z amputacijo uda. Med manjše klinične dogodke pa je bila uvrščena kakršnakoli revaskularizacija.

Preiskovanci so se pisno strinjali s sodelovanjem v raziskavi. Raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko.

3.1.2 Raziskava B

V raziskavo smo vključili bolnike s klavdikacijo ali kritično ishemijo uda, pri katerih je bila opravljena PTA. Bolniki so se strinjali s PTA, ki je bila izvedena na Kliničnem oddelku za žilne bolezni Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.

Za oceno razvoja restenoze oz. reokluzije je bil po 1, 6 in 12 mesecih od PTA pri vseh bolnikih opravljen žilni ultrazvok. Restenoza je bila potrjena v primeru prisotnosti ≥ 50 odstotne zožitve.

Bolniki so se pisno strinjali s sodelovanjem v raziskavi. Raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko.

3.2 ODVZEM KRVI IN OSAMITEV DNA

Preiskovancem raziskave A so ob vključitvi v raziskavo v lokalnem laboratoriju vzeli polno kri. Le-ta je bila poslana v Laboratorij za hemostazo in aterotrombozo Kliničnega oddelka za žilne bolezni Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Preiskovancem raziskave B pa so polno kri odvzeli en dan pred izvedbo PTA. Kri je bila odvzeta iz komolčne vene v vakuumske epruvete z natrijevim citratom (Beckton Dickinson, Vacutainer System Europe).

Iz vzorcev polne krvi smo z uporabo kompleta »iPrep PureLink gDNA Blood Kit« na aparatu iPrep osamili DNA. V aparatu z lizirnim pufrom poteče liza krvnih celic (razgradnja celične membrane, razpad celice in sprostitvev celične vsebine). Sledi razgradnja proteinov vezanih na DNA s proteinazo K. V naslednjem koraku se sproščena DNA veže na magnetne kroglice. Sledi več zaporednih korakov, v katerih se preostale celične sestavine sperejo z različnimi pufri. V zadnjem koraku pa elucijski pufer sprosti genomsko DNA z magnetnih kroglic.

Vzorci smo do analize shranjevali pri temperaturi 2-8 °C, kjer so bili najdlje 1 leto. V tem času so bili stabilni.

3.3 DOLOČITEV GENOTIPOV

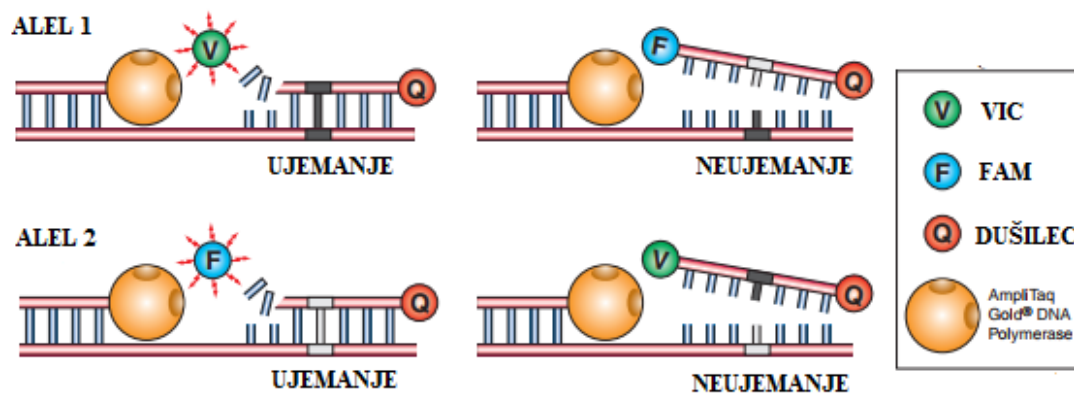
Odseke genov, kjer se nahajajo polimorfizmi smo pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo (PCR; ang. Polymerase Chain Reaction), genotipe pa določili z alelna diskriminacijo.

S PCR lahko v samo nekaj urah iz zelo majhne količine vzorca DNA dobimo milijon kopij izbranega odseka DNA. PCR reakcija poteka v več ciklih, vsak cikel je sestavljen iz 3 stopenj. V prvi stopnji pri temperaturi 94 °C poteče denaturacija. Zaradi poškodbe šibkih vodikovih vezi se dvoverižna DNA razklene v dve enoverižni. V naslednji stopnji se temperatura zniža na 54-60 °C, kar omogoča prileganje začetnih oligonukleotidov na komplementarno zaporedje matrične DNA. Zadnja stopnja poteka pri 72-80 °C (običajno 72 °C), kar omogoči vezavo DNA polimeraze na začetni oligonukleotid in izgradnjo komplementarne verige v smeri 5' proti 3'. Nastala DNA v naslednjem ciklu služi kot dodatna matica.

Za uspešno izvedeno reakcijo PCR potrebujemo vzorec DNA, termostabilno DNA-polimerazo, začetna oligonukleotida, deoksinukleozid-trifosfate (dNTP), Mg²⁺ in pufer za vzdrževanje pH (51).

Alelna diskriminacija omogoča hitro in občutljivo detekcijo znanih mutacij in polimorfizmov z instrumenti za PCR v realnem času. Detekcija produktov z alelna diskriminacijo poteka po končanem pomnoževanju.

Eden od načinov izvedbe alelna diskriminacije vključuje uporabo dveh TaqMan sond (oligonukleotida), specifičnih za alel, ki ga želimo analizirati. Fluorescentni sonde sta označeni z različnima reporterskima barviloma (VIC in FAM), zaradi česar ju lahko razlikujemo. DNA-polimeraza med podaljševanjem verige povzroči hidrolizo sonde, ki je komplementarna tarčnemu zaporedju (slika 10). Ker dušilec ne zmore več prestrezati fluorescence, le-ta poraste in označuje kateri alel je prisoten v vzorcu. Ob porastu fluorescence enega barvila (VIC ali FAM) gre za homozigot, ob porastu fluorescence obeh barvil (VIC in FAM) pa za heterozigot (52).



Slika 10: Fluorescenca reporterskega barvila pri alelni diskriminaciji.

3.3.1 Oprema in pripomočki

- Mešalec Vorteks
- Mini centrifuga
- Avtomatske pipete (Biohit)
- Elektronski dispencer (Dispencer eLine Lite, Biohit)
- Nastavki za avtomatske pipete in elektronski dispencer
- Mikrocentrifugirke, sterilne, posamično pakiranje (Biopur Safe-Lock micro test tubes, Eppendorf)
- Mikrotitrne ploščice za optično branje s 96 jamicami (96-well Reaction Plate with Barcode, Applied Biosystem)

- Plastično stojalo za mikrotitrsko ploščico
- Kompresijska podloga za mikrotitrne ploščice (MicroAmp Optical Film Compression Pad, Applied Biosystem)
- Prekrivna prozorna folija za mikrotitrne ploščice (MicroAmp Optical Adhesive Film, Applied Biosystem)
- Centrifuga za mikrotitrne ploščice (Centrifuge 5810, Eppendorf)
- Aparat za izvedbo PCR (ABI Prism 7000 Sequence Detection System)

3.3.2 Reagenti za pripravo reakcijske mešanice

- Voda PCR čistosti
- TaqMan Genotyping Master Mix (GMM)

GMM (2-krat koncentriran) je optimiziran za SNP genotipizacijo in vsebuje vse potrebno za pomnoževanje DNA: AmpliTaq Gold[®] DNA polimerazo (ultra čisto), dNTP, pasivno referenco (fluorescentno barvilo ROX) in optimizirano mešanico komponent.

GMM smo shranjevali pri temperaturi 2-8 °C. Pri tej temperaturi je obstojen 1 leto oziroma do izteka roka uporabe.

- TaqMan SNP Genotyping Assay za rs1466408, rs13428968, rs12803, rs668, rs12953, rs10499563 in rs10861032

TaqMan SNP Genotyping Assay je predpripravljena mešanica začetnih oligonukleotidov in sond, specifičnih za posamezni polimorfizem. V vsaki mešanici sta 2 različni hidrolizirajoči sonde, ki se vežeta na preiskovani polimorfizem. Prva je označena z reporterskim barvilom VIC, druga pa s FAM. Mesto vezave Taqman sond je prikazano v preglednici 2.

Preglednica 2: Mesto vezave TaqMan sond za določen polimorfizem.

SNP	GEN	MESTO VEZAVE	VIC	FAM
rs1466408	<i>NR4A2</i>	-15906 T>A	A	T
rs13428968	<i>NR4A2</i>	-3413 T>C	C	T
rs12803	<i>NR4A2</i>	+7275 G>T	T	G
rs668	<i>PECAMI</i>	+373 G>C	G	C
rs12953	<i>PECAMI</i>	+1688 A>G	A	G
rs10499563	<i>IL6</i>	-6331 T>C	C	T
rs10861032	<i>CHR12</i>	T>C	C	T

Ob prvi uporabi smo mešanico alikvotirali, s čimer smo zmanjšali število ciklov odmrzovanja in zamrzovanja, kar vpliva na kakovost reagentov in posledično na uspešnost reakcije pomnoževanja DNA.

3.3.3 Potek dela

1. Za izvedbo PCR reakcije smo najprej pripravili reakcijsko mešanico. Pred njeno pripravo smo glede na število vzorcev za analizo izračunali potreben volumen posameznih reagentov. Številu analiziranih vzorcev smo prišteli še kontrolne vzorce (laboratorijski kontrolni vzorci z znanim genotipom in vzorec brez DNA za detekcijo morebitnega onesnaženja reakcij in spremljanje nespecifičnega pomnoževanja). Izvajali smo 10 mikrolitrske reakcije zato smo za posamezno reakcijo potrebovali volumne reagentov, ki so prikazani v *preglednici 3*. Pri izračunu smo upoštevali dodaten volumen zaradi izgub pri pipetiranju. Reakcijsko mešanico smo pripravljali v laminarju.

Preglednica 3: Sestava reakcijske mešanice.

Reagenti	Volumni (μL)
GMM	5
TaqMan SNP Genotyping Assay	0,25
Destilirana voda	3,75

2. Pripravljeno reakcijsko mešanico smo dobro premešali in jo po 9 mikrolitrov glede na predviden načrt nanesli v posamezne jamice mikrotitrne ploščice. Mikrotitrsko ploščico z nanešeno reakcijsko mešanico smo prenesli na delovni pult in v posamezne vdolbinice nanesli po 1 mikroliter vzorcev DNA.

3. Mikrotitrsko ploščico smo prekrili s prozorno folijo. Pri tem smo pazili, da smo se folije dotikali le ob straneh. Robove folije smo tesno zatesnili, s čimer smo preprečili izhlapevanje iz robnih jamic. Ploščico smo na hitro odcentrifugirali in jo prekrili s kompresijsko podlogo.

4. Pomnoževanje je potekalo pod reakcijskimi pogoji, ki so prikazani v *preglednici 4*.

Preglednica 4: Pogoji reakcije pomnoževanja in alelne diskriminacije.

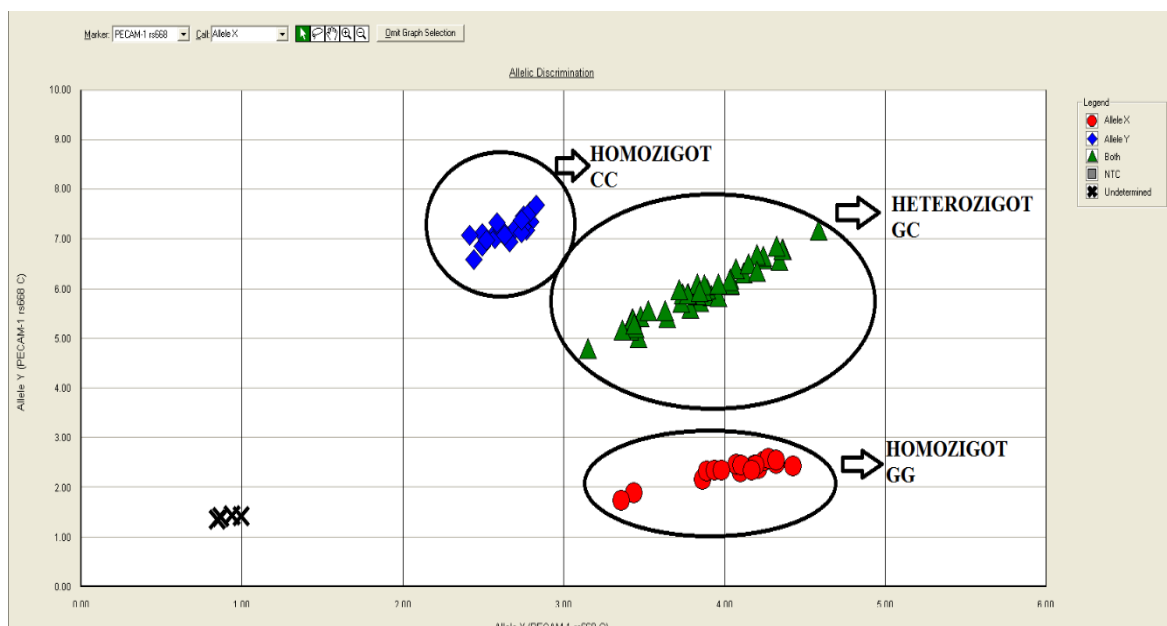
Temperatura	Čas	Število ciklov	Funkcija
50 °C	2 min	1	Zmanjševanje morebitnega onesnaženja s produkti predhodnik reakcij preko uporabljenih reagentov
95 °C	10 min	45	Denaturacija dvoverižne DNA
92 °C	15 s	45	Prileganje začetnih oligonukleotidov
60 °C	60 s	45	Podaljševanje
60 °C	2 min		Meritev fluorescence VIC in/ali FAM

Nekateri vzorci so bili problematični in se niso pomnožili. Za te vzorce smo ponovili reakcijo pomnoževanja s spremenjenimi volumni in pogoji. Volumen vzorčne DNA smo povečali (+1,0 µL), volumen vode pa ustrezno zmanjšali ter povečali število ciklov iz 45 na 60. Kljub spremenjenim volumnom in pogojem se nekaj vzorcev ni pomnožilo. Kjer smo imeli na voljo zamrznjene vzorce polne krvi, smo ponovno osamili DNA in ponovili reakcijo pomnoževanja. Na koncu je bilo neuspešno genotipiziranih 10 vzorcev.

3.3.4 Vrednotenje rezultatov

Za pravilno vrednotenje rezultatov smo pregledali obe datoteki: datoteko s podatki o pomnoževanju DNA in datoteko s podatki o alelni diskriminaciji.

Najprej smo vrednotili rezultate alelne diskriminacije. Na grafu smo označili kontrolne vzorce in jim pripisali znani genotip. V naslednjem koraku smo označili vse vzorce na ploščici in jim glede na razporeditev na grafu pripisali ustrezen genotip (*slika 11*).



Slika 11: Primer vrednotenja rezultatov alelne diskriminacije za polimorfizem rs668 v genu PECAM1.

Rezultate alelne diskriminacije smo preverili z rezultati pomnoževanja. V datoteki s podatki o pomnoževanju DNA smo glede na porast fluorescence za vsako jamico določili genotip. Le-tega smo primerjali z genotipom, določenim z alelno diskriminacijo.

3.4 STATISTIČNE METODE

Za razvrstitev preiskovancev v posamezne skupine in izračun absolutne ter relativne pogostosti preiskovancev z določenim genotipom smo uporabili programsko orodje Microsoft Office Excel.

Za celotno populacijo preiskovancev raziskave A in B smo preverili ali so absolutne pogostosti genotipov v Hardy-Weinbergovem ravnotežju. Pri posameznem polimorfizmu smo iz absolutne pogostosti preiskovancev za določen genotip najprej izračunali pogostost alelov po spodnjih enačbah:

$$f(\text{alel1}) = \frac{2n(\text{homozigot1}) + n(\text{heterozigot})}{2N} = p$$

$$f(\text{alel2}) = \frac{2n(\text{homozigot2}) + n(\text{heterozigot})}{2N} = q$$

Iz alelnih pogostosti pa smo nato izračunali pričakovano stanje genotipov s pomočjo enačbe:

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1.$$

To smo naredili tako, da smo število vseh preiskovancev pomnožili z vsakim členom enačbe in iz tega dobili pričakovano število genotipov:

$$\text{pričakovano število homozigotov1} = p^2 * N$$

$$\text{pričakovano število heterozigotov} = 2pq * N$$

$$\text{pričakovano število homozigotov2} = q^2 * N$$

Opaženo in pričakovano stanje genotipov smo primerjali s χ^2 testom programskega orodja Medcalc.

Podatke o absolutni pogostosti genotipov za posamezni polimorfizem smo med preučevanima skupinama primerjali s χ^2 testom programskega orodja MedCalc. Kot statistično pomembne smo opredelili vrednosti $p \leq 0,05$. Pri teh smo s programskim orodjem MedCalc izračunali še razmerje obetov ter 95-odstotni interval zaupanja (95IZ).

Programsko orodje MedCalc za izračun razmerja obetov (RO) uporablja enačbo:

$$RO = \frac{a/b}{c/d} = \frac{a*d}{b*c}, \text{ kjer so}$$

- a = izpostavljeni bolniki z dogodkom,
- b = izpostavljeni bolniki brez dogodka,
- c = neizpostavljeni bolniki z dogodkom,
- d = neizpostavljeni bolniki brez dogodka.

Za polimorfizme v genu *NR4A2* in *PECAM1* smo preučili tudi porazdelitev haplotipov med:

- PAB- in PAB+
- Bolniki brez in s kakršnimikoli dogodkom
- Bolniki brez in z večjim dogodkom
- Bolniki brez in z manjšim dogodkom

S prosto dostopnim programskim orodjem Haploview 4.2 (53) smo izračunali relativne pogostosti haplotipov v posamezni skupini bolnikov. Iz teh smo nato izračunali absolutne pogostosti, ki smo jih s χ^2 testom primerjali s haplotipom 1.

4 REZULTATI

4.1 RAZISKAVA A

4.1.1 Opis preiskovancev

Vključitvenim merilom je ustrezalo 1359 preiskovancev, 710 bolnikov s PAB (PAB+) in 649 bolnikov brez PAB (PAB-). Pri statistični analizi podatkov smo izključili tiste, ki so pred iztekom raziskave umrli zaradi srčno-žilnih vzrokov ($n = 82$). Tako smo v statistično analizo vključili 1277 preiskovancev, od tega 662 PAB+ in 615 PAB-. Med skupinama smo statistično pomembno razliko dokazali le v vrednosti GI ($p < 0,001$), ki je bila pričakovano nižja pri PAB+. V ostalih spremenljivkah, ki so prikazane v *preglednici 5*, se preiskovanci niso razlikovali.

Pri vseh bolnikih (PAB+ in PAB-) smo 5 let beležili srčno-žilne dogodke. Pri 994 bolnikih nismo zabeležili nobenega srčno-žilnega dogodka, pri 152 bolnikih smo zabeležili večji dogodek, pri 131 bolnikih pa manjši dogodek.

Preglednica 5: Opis vključenih bolnikov (prikazane so povprečne vrednosti in standardizirani odkloni ter p-vrednost).

Spremenljivka		PAB+ n = 662	PAB- n = 615	p
Starost (leta)		65 (9)	65 (9)	NS
Spol	moški (%)	63,1	61,8	NS
	ženske (%)	36,9	38,2	NS
Telesna masa (kg)	moški	83 (12)	85 (14)	NS
	ženske	74 (14)	75 (14)	NS
Telesna višina (cm)	moški	172 (6)	173 (6)	NS
	ženske	160 (7)	160 (6)	NS
ITM	moški	28 (4)	28 (4)	NS
	ženske	29 (5)	29 (5)	NS
Obseg pasu (cm)	moški	100 (10)	100 (11)	NS
	ženske	95 (13)	95 (13)	NS
GI		0,72 (0,18)	1,08 (0,11)	< 0,001
Število večjih dogodkov (n)		115	37	< 0,001
Število manjših dogodkov (n)		120	11	< 0,001

NS = ni statistično pomembno

4.1.2 Hardy-Weinbergovo ravnotežje

Za celotno skupino preiskovancev smo preverili ali so genotipi v Hardy-Weinbergovem ravnotežju. Pri posameznem polimorfizmu smo iz absolutne pogostosti preiskovancev za

določen genotip najprej izračunali pogostost alelov, nato pa iz pogostosti alelov pričakovano število genotipov.

V spodnjih enačbah je prikazan postopek izračuna pričakovane razporeditve genotipov za polimorfizem rs1466408 v genu *NR4A2*.

Pogostost alelov:

$$f(T) = \frac{2n(TT) + n(TA)}{2N} = \frac{2 * 1112 + 150}{2 * 1277} = 0,93 = p$$

$$f(A) = \frac{2n(AA) + n(TA)}{2N} = \frac{2 * 15 + 150}{2 * 1277} = 0,07 = q$$

$$\text{pričakovano število genotipov } TT = p^2 * N = 0,93^2 * 1277 = 1104$$

$$\text{pričakovano število genotipov } TA = 2pq * N = 2 * 0,93 * 0,07 * 1277 = 166$$

$$\text{pričakovano število genotipov } AA = q^2 * N = 0,07^2 * 1277 = 6$$

Opazovane in pričakovane absolutne pogostosti genotipov smo primerjali s χ^2 testom (preglednica 6). S testom smo dokazali, da med njimi ni statistično pomembne razlike ($p > 0,05$), torej so bile absolutne pogostosti genotipov naše populacije v Hardy-Weinbergovem ravnotežju.

Preglednica 6: Opažena in pričakovana absolutna pogostost genotipov za posamezni polimorfizem.

Polimorfizem	Opaženo število n = 1277	Pogostost alelov	Pričakovano število	p
NR4A2 SNPA (rs1466408)				
TT	1112	T 0,93	1104	NS
TA	150	A 0,07	166	
AA	15		6	
NR4A2 SNP B (rs13428968)				
TT	887	T 0,83	880	NS
TC	356	C 0,17	360	
CC	34		37	
NR4A2 SNP C (rs12803)				
GG	365	G 0,53	359	NS
GT	618	T 0,47	636	
TT	294		282	
PECAMI (rs668)				
GG	418	G 0,56	400	NS
GC	603	C 0,44	629	
CC	256		247	
PECAMI (rs12953)				
AA	402	A 0,56	400	NS
AG	619	G 0,44	629	
GG	256		247	
IL6 (rs10499563)				
TT	760	T 0,77	757	NS
TC	456	C 0,23	452	
CC	61		68	
KROMOSOM 12 (rs10861032)				
TT	915	T 0,85	922	NS
TC	332	C 0,15	326	
CC	30		29	

NS = ni statistično pomembno

4.1.3 Povezava med polimorfizmi in PAB oz. srčno-žilnimi dogodki

Za vsak polimorfizem smo s statistično analizo preverili ali so genotipi različno porazdeljeni glede na prisotnost bolezni. PAB+ smo primerjali s PAB-, za primerjavo med skupinama pa smo uporabili absolutne pogostosti. Genotipi za vse polimorfizme so se enakomerno razporejali med obe skupini (*preglednica 7*).

Preiskovance smo nato (neodvisno od PAB) razdelili glede na klinične dogodke. Za vsak polimorfizem smo s statistično analizo preverili ali so genotipi različno porazdeljeni glede na klinične dogodke. Najprej smo primerjali bolnike s kakršnimkoli dogodkom in bolnike brez dogodka. Povezavo med genotipi in dogodki smo ugotovili le za polimorfizem rs10861032 na kromosomu 12. Nato smo bolnike z dogodkom razdelili glede na vrsto dogodka in jih prav tako primerjali z bolniki brez dogodka. Povezavo smo ugotovili za polimorfizme rs668 v genu *PECAMI*, rs10499563 v genu *IL6* in rs10861032 na kromosomu 12. Za primerjavo med skupinama smo uporabili absolutne pogostosti (*preglednica 7*).

Preglednica 7: Absolutna in relativna (%) pogostost genotipov v posamezni skupini preiskovancev.

Polimorfizem	PAB- n = 615	PAB+ n = 662	Vsi bolniki brez dogodka n = 994	Bolniki s kakršnimkoli dogodkom n = 283	Bolniki z večjim dogodkom n = 152	Bolniki z manjšim dogodkom n = 131
NR4A2 SNPA (rs1466408)						
TT	534 (87)	578 (87)	859 (86)	253 (89)	136 (89)	117 (89)
TA	75 (12)	75 (11)	123 (12)	27 (10)	13 (9)	14 (11)
AA	6 (1)	9 (1)	12 (1)	3 (1)	3 (2)	0 (0)
p		NS ¹		NS ²	NS ²	NS ²
NR4A2 SNP B (rs13428968)						
TT	433 (70)	454 (69)	683 (69)	204 (72)	110 (72)	94 (72)
TC	164 (27)	192 (29)	283 (28)	73 (26)	40 (26)	33 (25)
CC	18 (3)	16 (2)	28 (3)	6 (2)	2 (1)	4 (3)
p		NS ¹		NS ²	NS ²	NS ²
NR4A2 SNP C (rs12803)						
GG	187 (30)	178 (27)	276 (28)	89 (31)	50 (33)	39 (30)
GT	287 (47)	331 (50)	484 (49)	134 (47)	70 (46)	64 (49)
TT	141 (23)	153 (23)	234 (24)	60 (21)	32 (21)	28 (21)
p		NS ¹		NS ²	NS ²	NS ²
PECAMI (rs668)						
GG	207 (34)	211 (32)	322 (32)	96 (34)	64 (42)	32 (24)
GC	286 (47)	317 (48)	469 (47)	134 (47)	64 (42)	70 (53)
CC	122 (20)	134 (20)	203 (20)	53 (19)	24 (16)	29 (22)
p		NS ¹		NS ²	0,05²	NS ²
PECAMI (rs12953)						
AA	198 (32)	204 (31)	311 (31)	91 (32)	58 (38)	33 (25)
AG	297 (48)	322 (49)	476 (48)	143 (51)	72 (47)	71 (54)
GG	120 (20)	136 (21)	207 (21)	49 (17)	22 (14)	27 (21)
p		NS ¹		NS ²	NS ²	NS ²
IL6 (rs10499563)						
TT	359 (58)	401 (61)	588 (59)	172 (61)	81 (53)	91 (69)
TC	226 (37)	230 (35)	359 (36)	97 (34)	63 (41)	34 (26)
CC	30 (5)	31 (5)	47 (5)	14 (5)	8 (5)	6 (5)
p		NS ¹		NS ²	NS ²	0,07 ²
KROMOSOM12 (rs10861032)						
TT	424 (69)	491 (74)	707 (71)	208 (73)	113 (74)	95 (73)
TC	177 (29)	155 (23)	269 (27)	63 (22)	32 (21)	31 (24)
CC	14 (3)	16 (2)	18 (2)	12 (4)	7 (5)	5 (4)
p		NS ¹		0,02²	0,03²	NS ²

¹ = primerjava porazdelitve genotipov med PAB- in PAB+;

² = primerjava porazdelitve genotipov med bolniki z dogodkom in brez njega;

NS = ni statistično pomembno

Pri preučevanju porazdelitve genotipov glede na klinične dogodke smo statistično pomembno razliko dokazali za polimorfizem rs10861032 na kromosomu 12. Razlika v porazdelitvi genotipov je bila statistično pomembna pri bolnikih s kakršnimkoli ($p = 0,02$)

in večjim dogodkom ($p = 0,03$) v primerjavi z bolniki brez dogodka. Z izračunom razmerja obetov smo dokazali, da je genotip CC povezan z 2,4-krat večjim tveganjem za kakršnikoli srčno-žilni dogodek oz. z 2,6-krat večjim tveganjem za večji srčno-žilni dogodek v primerjavi z ostalima genotipoma skupaj (*preglednica 8*).

Preglednica 8: Razmerje obetov (RO) in 95IZ za polimorfizem rs10861032 na kromosomu 12.

Genotip			p	RO (95IZ)
	Bolniki s kakršnikoli dogodkom n = 283	Bolniki brez dogodka n = 994		
TT	208 (73)	707 (71)	0,44	1,1 (0,8 – 1,5)
TC	63 (22)	269 (27)	0,10	0,8 (0,6 – 1,1)
CC	12 (4)	18 (2)	0,02	2,4 (1,1 – 5,0)
	Bolniki z večjim dogodkom n = 152	Bolniki brez dogodka n = 994		
TT	113 (74)	707 (71)	0,41	1,2 (0,8 – 1,7)
TC	32 (21)	269 (27)	0,12	0,7 (0,5 – 1,1)
CC	7 (5)	18 (2)	0,03	2,6 (1,1 – 6,4)

Pri polimorfizmu rs668 v genu *PECAMI* je bila razlika v porazdelitvi genotipov med bolniki z večjim dogodkom in bolniki brez dogodka statistično pomembna ($p = 0,05$). Genotip GG je bil pogostejši pri bolnikih z večjim dogodkom in je bil povezan z 1,5-krat (95IZ 1,1 – 2,2) večjim tveganjem za večji srčni-žilni dogodek v primerjavi z ostalima genotipoma skupaj.

Pri polimorfizmu rs10499563 v genu *IL6* je bila razlika v porazdelitvi genotipov med bolniki z manjšim dogodkom in bolniki brez dogodka blizu statistično pomembne ($p = 0,07$). Genotip TT je bil povezan z 1,6-krat (95IZ 1,1 – 2,3) večjim tveganjem za manjši dogodek v primerjavi z genotipoma TC in CC skupaj.

Za polimorfizme rs146608, rs13428968 in rs12803 v genu *NR4A2* ter rs12953 v genu *PECAMI* nismo dokazali statistično pomembne razlike v porazdelitvi genotipov glede na klinične dogodke.

4.1.4 Povezava med haplotipi *NR4A2* in *PECAMI* ter PAB oz. srčno-žilnimi dogodki

Za polimorfizme v genu *NR4A2* in *PECAMI* smo primerjali tudi razporeditev haplotipov med PAB- in PAB+, ter bolniki brez in z dogodkom. Razporeditev haplotipov *NR4A2* je

prikazana v *preglednici 9*. S statistično analizo nismo dokazali povezave med haplotipi *NR4A2* in PAB oz. srčno-žilnimi dogodki, haplotipi so bili namreč enakomerno porazdeljeni med vsemi pari preučevanih skupin.

Preglednica 9: Pogostost haplotipov NR4A2.

Skupina	Haplotip			
	1 GTT	2 TTT	3 TCT	4 TTA
PAB- (n = 615)	329 (53)	147 (24)	99 (16)	40 (7)
PAB+ (n = 662)	344 (52)	159 (24)	113 (17)	45 (7)
p				NS
Bolniki brez dogodka (n = 994)	517 (52)	238 (24)	169 (17)	70 (7)
Bolniki s kakršnikoli dogodkom (n = 283)	156 (55)	68 (24)	43 (15)	15 (5)
p				NS
Bolniki brez dogodka (n = 994)	517 (52)	238 (24)	169 (17)	70 (7)
Bolniki z večjim dogodkom (n = 152)	85 (56)	35 (23)	22 (14)	9 (6)
p				NS
Bolniki brez dogodka (n = 994)	517 (52)	238 (24)	169 (17)	70 (7)
Bolniki z manjšim dogodkom (n = 131)	71 (54)	33 (25)	21 (16)	6 (5)
p				NS

p = glede na haplotip 1; NS = ni statistično pomembo

Razporeditev haplotipov *PECAM1* je prikazana v *preglednici 10*. S statistično analizo nismo dokazali povezave med haplotipi *PECAM1* in PAB, statistično pomembna pa je bila povezava med haplotipi in srčno-žilnimi dogodki.

Preglednica 10: Pogostost haplotipov PECAM1.

Skupina	Haplotip			
	1 AG	2 GC	3 GG	4 AC
PAB- (n = 615)	337 (55)	254 (41)	13 (2)	11 (2)
PAB+ (n = 662)	355 (54)	285 (43)	15 (2)	7 (1)
p				NS
Bolniki brez dogodka (n = 994)	537 (54)	427 (43)	20 (2)	10 (1)
Bolniki s kakršnikoli dogodkom (n = 283)	155 (55)	112 (40)	8 (3)	8 (3)
p				0,06
Bolniki brez dogodka (n = 994)	537 (54)	427 (43)	20 (2)	10 (1)
Bolniki z večjim dogodkom (n = 152)	91 (60)	53 (35)	5 (3)	3 (2)
p				NS
Bolniki brez dogodka (n = 994)	537 (54)	427 (43)	20 (2)	10 (1)
Bolniki z manjšim dogodkom (n = 131)	64 (49)	59 (45)	3 (2)	5 (4)
p				0,02

p = glede na haplotip 1; NS = ni statistično pomembo

Pri bolnikih brez dogodka in bolnikih z manjšim dogodkom je bila porazdelitev haplotipa 4 v primerjavi s haplotipom 1 statistično pomembna ($p = 0,02$). Pri bolnikih brez dogodka in bolnikih s kakršnikoli dogodkom pa je bila blizu statistično pomembne ($p = 0,06$). Z izračunom razmerja obetov smo dokazali, da je haplotip 4 povezan z 2,9-krat večjim tveganjem za kakršnikoli dogodek oz. s 3,9-krat večjim tveganjem za manjši dogodek v primerjavi z ostalimi haplotipi skupaj (*preglednica 11*).

Preglednica 11: Razmerje obetov (RO) in 95IZ za haplotipe PECAM1.

Haplotip			p	RO (95IZ)
	Bolniki s kakršnikoli dogodkom n = 283	Bolniki brez dogodka n = 994		
1 AG	155 (55)	537 (54)	0,82	1,0 (0,8 – 1,3)
2 GC	112 (40)	427 (43)	0,31	0,9 (0,6 – 1,1)
3 GG	8 (3)	20 (2)	0,41	1,4 (0,6 – 3,3)
4 AC	8 (3)	10 (1)	0,03	2,9 (1,1 – 7,3)
	Bolniki z manjšim dogodkom n = 131	Bolniki brez dogodka n = 994		
1 AG	64 (49)	537 (54)	0,27	0,8 (0,6 – 1,2)
2 GC	59 (45)	427 (43)	0,65	1,1 (0,8 – 1,6)
3 GG	3 (2)	20 (2)	0,83	1,1 (0,3 – 3,9)
4 AC	5 (4)	10 (1)	0,01	3,9 (1,3 – 11,6)
	Bolniki z večjim dogodkom n = 152	Bolniki brez dogodka n = 994		
1 GC	91 (60)	537 (54)	0,18	1,3 (0,9 – 1,8)
2 GC	53 (35)	427 (43)	0,06	0,7 (0,5 – 1,0)
3 GG	5 (3)	20 (2)	0,32	1,7 (0,6 – 4,5)
4 AC	3 (2)	10 (1)	0,30	2,0 (0,5 – 7,3)

4.2 RAZISKAVA B

4.2.1 Opis preiskovancev

V raziskavo smo vključili 182 zaporednih bolnikov. V *preglednici 12* je prikazana starost in spol bolnikov z restenozo in brez nje. Bolniki se v teh značilnostih niso razlikovali.

Preglednica 12: Opis vključenih bolnikov (prikazane so povprečne vrednosti in standardizirani odkloni ter p-vrednost).

Spremenljivka		Prehodna arterija n = 82	Restenoza n = 100	p
Starost (leta)		64 (10)	65 (9)	NS
Spol	moški (%)	63	65	NS
	ženske (%)	37	35	NS

NS = ni statistično pomembno

Pri preiskovancih smo 1, 6 in 12 mesecev po posegu merili prehodnost prizadete arterije. Po 1. mesecu smo restenozo potrdili pri 19 bolnikih, po 6. mesecih pri 73 bolnikih ter po 12. mesecih pri 100 bolnikih.

4.2.2 Hardy-Weinbergovo ravnotežje

Za celotno skupino bolnikov smo preverili ali so genotipi v Hardy Weinbergovem ravnotežju. Pri posameznem polimorfizmu smo iz absolutne pogostosti preiskovancev za določen genotip najprej izračunali pogostost alelov, nato pa iz pogostosti alelov pričakovano število genotipov.

V spodnjih enačbah je prikazan postopek izračuna pričakovane razporeditve genotipov za polimorfizem rs1466408 v genu *NR4A2*.

Pogostost alelov:

$$f(T) = \frac{2n(TT) + n(TA)}{2N} = \frac{2 * 154 + 22}{2 * 181} = 0,94 = p$$

$$f(A) = \frac{2n(AA) + n(TA)}{2N} = \frac{2 * 0 + 22}{2 * 181} = 0,06 = q$$

$$\text{pričakovano število genotipov } TT = p^2 * N = 0,94^2 * 181 = 155$$

$$\text{pričakovano število genotipov } TA = 2pq * N = 2 * 0,94 * 0,06 * 181 = 20$$

$$\text{pričakovano število genotipov } AA = q^2 * N = 0,06^2 * 181 = 1$$

Opazovane in pričakovane absolutne pogostosti genotipov smo primerjali s χ^2 testom (preglednica 13). S testom smo dokazali, da med njimi ni statistično pomembne razlike ($p > 0,05$), torej so bile absolutne pogostosti genotipov naše populacije v Hardy-Weinbergovem ravnotežju.

Preglednica 13: Opažena in pričakovana absolutna pogostost genotipov za posamezni polimorfizem.

Polimorfizem	Opaženo stanje n = 182	Pogostost alelov	Pričakovano stanje	p
NR4A2 SNPA (rs1466408)				
TT	154	0,94	155	NS
TA	22	0,06	20	
AA	0		1	
NR4A2 SNP B (rs13428968)				
TT	131	0,84	128	NS
TC	43	0,16	49	
CC	8		5	
NR4A2 SNPC (rs12803)				
GG	57	0,54	53	NS
GT	83	0,46	90	
TT	41		38	
PECAMI (rs668)				
GG	51	0,49	43	NS
GC	77	0,51	90	
CC	53		47	
PECAMI (rs12953)				
AA	58	0,56	57	NS
AG	87	0,44	89	
GG	36		35	
IL6 (rs10499563)				
TT	117	0,80	116	NS
TC	56	0,20	58	
CC	8		7	
KROMOSOM 12 (rs10861032)				
TT	126	0,83	125	NS
TC	49	0,17	51	
CC	6		5	

NS = ni statistično pomembno

4.2.3 Povezava med polimorfizmi in restenozo po PTA

Kljub spremenjenim volumnom in pogojem pomnoževanja ter ponovni osamitvi DNA se pri polimorfizmih rs668 in rs12953 v genu *PECAMI*, rs10499563 v genu *IL6* ter rs10861032 na kromosomu 12 po 1 vzorec ni pomnožil. Pri polimorfizmu rs1466408 v genu *NR4A2* pa se ni pomnožilo 6 vzorcev.

Za vsak polimorfizem smo s statistično analizo preverili ali so genotipi različno porazdeljeni glede na razvoj restenoze po določenem časovnem obdobju (1, 6 in 12 mesecih). Za

primerjavo med skupinama bolnikov z restenozo in brez nje smo uporabili absolutne pogostosti (*preglednica 14*).

Preglednica 14: Absolutna in relativna (%) pogostost genotipov v posamezni skupini preiskovancev.

Polimorfizem	Po 1. mesecu		Po 6. mesecih		Po 12. mesecih	
	Restenoza n = 19	Prehodna arterija n = 163	Restenoza n = 73	Prehodna arterija n = 100	Restenoza n = 100	Prehodna arterija n = 73
NR4A2 SNP A (rs1466408)						
TT	16 (84)	138 (88)	63 (91)	82 (84)	85 (89)	60 (85)
TA	3 (16)	19 (12)	6 (9)	16 (16)	11 (11)	11 (15)
AA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
p	NS		NS		NS	
NR4A2 SNP B (rs13428968)						
TT	15 (79)	116 (71)	52 (71)	75 (75)	73 (73)	54 (74)
TC	4 (21)	39 (24)	19 (26)	20 (20)	25 (25)	14 (19)
CC	0 (0)	8 (5)	2 (3)	5 (5)	2 (2)	5 (7)
p	NS		NS		NS	
NR4A2 SNPC (rs12803)						
GG	7 (37)	50 (31)	22 (31)	33 (33)	29 (29)	26 (36)
GT	6 (32)	77 (48)	35 (49)	46 (46)	49 (49)	32 (44)
TT	6 (32)	35 (22)	15 (21)	21 (21)	21 (21)	15 (21)
p	NS		NS		NS	
PECAMI (rs668)						
GG	6 (32)	45 (27)	14 (19)	35 (35)	25 (25)	24 (33)
GC	9 (47)	68 (42)	35 (48)	37 (37)	43 (43)	29 (40)
CC	4 (21)	49 (30)	24 (33)	27 (27)	32 (32)	19 (26)
p	NS		0,07		NS	
PECAMI (rs12953)						
AA	5 (26)	53 (33)	18 (25)	38 (38)	31 (31)	25 (35)
AG	11 (58)	76 (47)	38 (52)	42 (42)	48 (48)	32 (44)
GG	3 (16)	33 (20)	17 (23)	19 (2)	21 (21)	15 (21)
p	NS		NS		NS	
IL6 (rs10499563)						
TT	14 (74)	103 (64)	56 (77)	58 (59)	69 (69)	45 (63)
TC	5 (26)	51 (31)	16 (22)	36 (36)	29 (29)	23 (32)
CC	0 (0)	8 (5)	1 (1)	5 (5)	2 (2)	4 (6)
p	NS		0,04		NS	
KROMOSOM 12 (rs10861032)						
TT	15 (79)	111 (69)	50 (68)	68 (69)	70 (70)	48 (67)
TC	4 (21)	45 (28)	20 (27)	28 (28)	26 (26)	22 (31)
CC	0 (0)	6 (4)	3 (4)	3 (3)	4 (4)	2 (3)
p	NS		NS		NS	

NS = ni statistično pomembno

Čeprav pri polimorfizmu rs668 v genu *PECAMI* porazdelitev genotipov med skupinama ni bila statistično pomembno drugačna po 6. mesecih od PTA, je bil genotip GG povezan z manjšim tveganjem za restenozo (RO 0,4; 95IZ 0,2 – 0,9) v primerjavi z genotipoma GC in CC skupaj (RO 2,3; 95IZ 1,1 – 4,7).

Po 6. mesecih od PTA smo statistično pomembno razliko v porazdelitvi genotipov dokazali za polimorfizem rs10499563 v genu *IL6* ($p = 0,04$). Pri tem polimorfizmu je bil genotip TT pogostejši pri bolnikih z restenozo in je bil povezan z 2,3-krat (95IZ 1,2 - 4,6) večjim tveganjem v primerjavi z genotipoma TC in CC skupaj.

Za polimorfizme rs1466408, rs13428968 in rs12803 v genu *NR4A2*, rs12953 v genu *PECAMI* in rs10861032 na kromosomu 12 nismo dokazali povezave z restenozo po PTA.

4.2.4 Povezava med haplotipi *NR4A2* in *PECAM1* ter restenozo po PTA

Za polimorfizme v genu *NR4A2* in *PECAM1* smo primerjali tudi porazdelitev haplotipov med skupinama bolnikov z in brez restenoze po 1., 6. in 12. mesecih od PTA.

Razporeditev haplotipov *NR4A2* je prikazana v preglednici 15. S statistično analizo nismo dokazali povezave med haplotipi *NR4A2* in restenozo po 1., 6. in 12. mesecih od PTA.

Preglednica 15: Pogostost haplotipov NR4A2.

Skupina	Haplotip			
	1 GTT	2TTT	3 TCT	4 TTA
Po 1. mesecu				
Bolniki brez restenoze (n = 157)	83 (53)	38 (24)	25 (16)	9 (6)
Bolniki z restenozo (n = 19)	11 (58)	5 (26)	1 (8)	2 (8)
p				NS
Po 6. mesecih				
Bolniki brez restenoze (n = 98)	52 (53)	23 (23)	14 (14)	10 (9)
Bolniki z restenozo (n = 69)	38 (56)	18 (26)	10 (14)	3 (4)
p				NS
Po 12. mesecih				
Bolniki brez restenoze (n = 71)	40 (56)	16 (22)	10 (14)	6 (8)
Bolniki z restenozo (n = 96)	51 (53)	25 (26)	13 (14)	6 (6)
p				NS

$p =$ glede na haplotip 1; NS = ni statistično pomembo

Razporeditev haplotipov *PECAM1* je prikazana v *preglednici 16*. S statistično analizo nismo dokazali povezave med haplotipi *PECAM1* in restenozo po 1., 6. in 12. mesecih od PTA.

Preglednica 16: Pogostost haplotipov PECAM1.

Skupina	Haplotip			
	1 AG	2 GC	3 GG	4 AC
Po 1. mesecu				
Bolniki brez restenoze (n = 162)	76 (47)	68 (42)	3 (2)	16 (10)
Bolniki z restenozo (n = 19)	10 (50)	7 (39)	1 (6)	1 (6)
p				NS
Po 6. mesecih				
Bolniki brez restenoze (n = 99)	50 (51)	38 (38)	3 (3)	8 (8)
Bolniki z restenozo (n = 73)	30 (41)	34 (47)	1 (2)	7 (10)
p				NS
Po 12. mesecih				
Bolniki brez restenoze (n = 72)	36 (50)	30 (41)	2 (3)	4 (6)
Bolniki z restenozo (n = 100)	45 (45)	42 (42)	2 (2)	11 (11)
p				NS

p = glede na haplotip 1; NS = ni statistično pomembo

5. RAZPRAVA

Preučevani polimorfizmi so se razporejali enako pogosto pri bolnikih s PAB in brez nje, kar pomeni, da niso povezani z razvojem te bolezni. Ugotovili pa smo, da je haplotip 4 v *PECAMI* ter polimorfizma rs10499563 v genu *IL6* ter rs10861032 na kromosomu 12 v povezavi z večjim tveganjem za srčno-žilne dogodke pri vseh bolnikih. Ugotovili smo tudi, da sta polimorfizma rs668 v genu *PECAMI* in rs10499563 v genu *IL6* povezana z večjim tveganjem za restenozo 6 mesecev po PTA.

5.1.1 RAZISKAVA A

Skupini PAB- in PAB+ sta bili primerljivi v starosti, spolu, telesni masi, telesni višini, ITM ter obsegu pasu. PAB+ so imeli pričakovano nižji GI, saj je kriterij za PAB GI nižji od 0,9. Genotipi vseh polimorfizmov so se razporejali primerljivo med obema skupinama, kar pomeni, da ti polimorfizmi nimajo vpliva na razvoj PAB. Relativne pogostosti genotipov vseh preučevanih polimorfizmov se pri PAB+ in PAB- ni pomembno razlikovala od tistih, ki so jih določili pri 226 zdravih evropskih prostovoljcih (*priloga*) (55). Prav tako se pogostost haplotipov v *NR4A2* ni pomembno razlikovala od tistih, ki so jih določili v predhodni raziskavi na 601 bolnikih s stabilno angino pectoris (24). Za preučevane polimorfizme ni objavljenih raziskav, ki bi dokazovale povezavo s PAB, ugotovljeno pa je bilo nekaj povezav z aterosklerozo. V raziskavi na 795 preiskovancih je bil pri polimorfizmu rs668 v genu *PECAMI* genotip GG povezan s prisotnostjo lezij v karotidni arteriji (54). V raziskavi, ki so jo opravili na 7129 preiskovancih je bil haplotip 2 v *NR4A2* povezan z aortno in koronarno kalcifikacijo (31). V drugi raziskavi pa je bilo ugotovljeno, da je divji tip *NR4A2* povezan z manjšim nastankom žilnih lezij (32).

Pri delitvi bolnikov na tiste, ki so utrpeli srčno-žilni dogodek in tiste brez dogodka nismo niti s preučevanjem posameznih polimorfizmov, niti s preučevanjem haplotipov *NR4A2* dokazali povezave s srčno-žilnimi dogodki. *NR4A2* se izraža le v aterosklerotičnih lezijah, kjer zmanjša vnetni odgovor, celično proliferacijo ter privzem LDL v makrofagih. Ugotovljeno je bilo, da so z zaščitno vlogo povezani homozigoti z divjim alelom. Večje tveganje za bolezni, v katere so vključeni omenjeni procesi tako pri SNP A predstavljata heterozigot TA in homozigot s polimorfizmov AA, pri SNP B heterozigot TC in homozigot s polimorfizmom CC, pri SNP C pa heterozigot GT in homozigot s polimorfizmom TT. V raziskavi, ki so jo opravili na 7129 preiskovancih prav tako ni bilo ugotovljene povezave med polimorfizmi v genu *NR4A2* in srčno-žilnimi dogodki (31).

Za polimorfizem rs668 smo dokazali pomembno razliko v porazdelitvi genotipov glede na srčno-žilne dogodke. Genotip GG je bil povezan z 1,5-krat večjim tveganjem za večje dogodke. V objavljenih raziskavah je bil alel G povezan s koronarno arterijsko boleznijo. To so ugotovili v raziskavah na 294 preiskovancih v kitajski populaciji (36), 247 preiskovancih v indijski populaciji (37), 98 preiskovancih v nemški populaciji (38) in 231 preiskovancih v kitajski populaciji (39). V raziskavi na 115 bolnikih z globoko vensko trombozo in 104 zdravih posameznikih je bil pri obeh skupinah genotip GG povezan s statistično pomembno višjimi plazemskimi vrednostmi PECAM-1 v primerjavi z genotipoma GC in CC (40). PECAM-1 omogoča transendotelijsko migracijo levkocitov v subendotelijski prostor. Vendar pa se lahko molekule PECAM-1 na površini celic povežejo, kar prepreči transendotelijsko migracijo levkocitov in poveča tveganje za nastanek strdka. Te ugotovitve se skladajo z našimi rezultati.

Za polimorfizem rs12953 nismo dokazali povezave s PAB in srčno-žilnimi dogodki, vendar pa tudi v večini že objavljenih raziskav tega niso dokazali oziroma so bili rezultati nasprotujoči. S srčno-žilnimi dogodki so bili povezani različni genotipi. V nekaterih raziskavah je bil alel G povezan z MI (41, 42), v drugih pa je bil alel A povezan s koronarno arterijsko boleznijo (38,39).

Povezanost haplotipov *PECAMI* s srčno-žilnimi dogodki še ni bila preučena. Polimorfizma sta bila preučevana le v kombinaciji s še enim polimorfizmom (43). V naši raziskavi smo dokazali povezavo med haplotipi in srčno-žilnimi dogodki. Haplotip 4 (AC; polimorfizem rs12953) je bil povezan z 2,9-krat večjim tveganjem za kakršnikoli dogodek oz. s 3,9-krat večjim tveganjem za manjši dogodek, vendar pa je bila pogostost tega haplotipa zelo nizka. Glede na število preučevanih polimorfizmov gre za majhno statistično pomembnost, zato bi bilo potrebno te ugotovitve potrditi na večji skupini preiskovancev.

Povezanost polimorfizma rs10499563 s srčno-žilnimi dogodki še ni bila preučena. Ugotovljeno pa je bilo, da je genotip TT povezan z višjimi vrednostmi IL-6 v krvi (49). Ker IL-6 s svojimi lastnostmi spodbuja vnetje in aterosklerozo, smo pričakovali, da je genotip TT povezan s srčno-žilnimi dogodki. V raziskavi smo to delno potrdili. Genotipi sicer niso bili povezani s PAB, bili pa so povezani s srčno-žilnimi dogodki. Genotip TT je bil v primerjavi z ostalima genotipoma skupaj povezan z 1,6-krat večjim tveganjem za manjše dogodke.

S srčno-žilnimi dogodki se je povezoval tudi polimorfizem rs10861032 na kromosomu 12. Dokazali smo, da je razporeditev genotipov med bolniki z in brez dogodka statistično pomembna. Genotip CC je bil povezan z 2,4-krat večjim tveganjem za kakršnikoli dogodek oz. z 2,6-krat večjim tveganjem za večji dogodek. Polimorfizem v povezavi s srčno-žilnimi dogodki še ni bil preučen.

5.1.2 RAZISKAVA B

Skupini bolnikov z restenozo in brez nje sta bili primerljivi v starosti in spolu. Relativne pogostosti genotipov posameznih polimorfizmov pri vseh vključenih bolnikih se niso pomembno razlikovale od tistih, ki so jih določili pri 226 zdravih evropskih prostovoljcih (*priloga*) (55).

V naši raziskavi niti s preučevanjem polimorfizmov, niti s preučevanjem haplotipov *NR4A2* nismo ugotovili povezave z restenozo 1, 6 ali 12 mesecev po PTA. V nasprotju z našo raziskavo je bila povezava med haplotipi *NR4A2* in restenozo po PKA potrjena v raziskavi na 601 bolnikih, kjer je bilo ugotovljeno, da sta z večjim tveganjem povezana haplotipa 3 in 4 (24). V drugi raziskavi na 142 bolnikih pa je bila ugotovljena povezava med haplotipoma 2 in 3 ter restenozo po PTA (32). Potrebne bi bile nadaljnje raziskave na večjem številu bolnikov glede na majhno pogostost haplotipov 3 in 4.

Povezava polimorfizmov rs668 in rs12953 v genu *PECAM1* z restenozo še ni bila preučena. V naši raziskavi smo ugotovili, da je pri polimorfizmu rs668 genotip GG povezan z več kot pol manjšim tveganjem za restenozo 6 mesecev po PTA. Ta ugotovitev je v nasprotju z ugotovitvijo v raziskavi A, kjer je bil genotip GG pomembno povezan z večjim tveganjem za večje srčno-žilne dogodke, medtem ko restenozo uvrščamo med manjše srčno-žilne dogodke. Kot smo že omenili v razpravi A, je genotip GG povezan z višjimi vrednostmi PECAM-1 v krvi (40). Zaradi povišanih vrednosti PECAM-1 lahko pride do medsebojnega povezovanja molekul, kar kompetitivno inhibira vezavo levkocitov in njihovo transendotelijsko migracijo. Genotipa GC in CC sta povezana z nižjimi vrednostmi PECAM-1, zato ne pride do njihovega medsebojnega povezovanja. V subendotelijski prostor zaradi tega prehaja več levkocitov, ki spodbujajo vnetje in s tem razvoj restenoze. Povezavo med polimorfizmom in restenozo smo preučevali 1, 6, in 12 mesecev po PTA. Razliko smo našli le po 6. mesecih. Razumevanje mehanizmov razvoja restenoze je kljub številnim raziskavam še vedno pomanjkljivo. Dobljene rezultate lahko razložimo s pomenom vnetja v različnih časovnih obdobjih. Na razvoj zgodnje restenoze (v 1. mesecu)

vpliva predvsem pretiran akutni odgovor na poškodbo arterijske stene, ki nastane z balonskim razširjanem arterije med PTA. Aktivirani trombociti sproščajo molekule, ki stimulirajo nastanek strdka na mestu poškodbe. Če je ta odziv pretiran, nastane tromboza, ki ovira pretok krvi. V prvem mesecu torej vnetje še nima zelo pomembne vloge. Na razvoj pozne restenoze (po 6. mesecih) pa ima pomembno vlogo tudi vnetje. Vnetne molekule namreč stimulirajo migracijo in proliferacijo GMC. Če je ta proces pretiran, v nekaj mesecih nastane ponovna zožitev arterije. Na razvoj zelo pozne restenoze (po 12. mesecih) pa ima najpomembnejšo vlogo samo napredovanje aterosklerotične bolezni in ne več pretirano celjenje poškodbe zaradi vnetja.

Za polimorfizem rs12953 nismo ugotovili povezave z restenozo, prav tako z restenozo niso bili povezani haplotipi v *PECAMI*.

Za polimorfizem rs10499563 v genu *IL6* še ni bila preučena povezava z restenozo. V naši raziskavi smo ugotovili, da je genotip TT povezan z 2,3-krat večjim tveganjem za razvoj restenoze 6 mesecev po PTA. Genotip TT je povezan s povišanimi vrednostmi IL-6 v krvi (49). Ker IL-6 s svojimi lastnostmi spodbuja vnetje in s tem razvoj restenoze, so bili ti rezultati pričakovani. Povezavo z restenozo smo našli le po 6. mesecih. To lahko, prav tako kot za rs668, razložimo s pomenom vnetja v različnih časovnih obdobjih. Po 6. mesecih ima pri razvoju restenoze pomembno vlogo vnetje, po 12. mesecih pa predvsem napredovanje aterosklerotične bolezni.

Za polimorfizem rs10861032 na kromosomu 12 nismo ugotovili povezave z restenozo. V vsegenomski raziskavi povezanosti (GWAS) na 866 bolnikih je bila ugotovljena povezava polimorfizma z razvojem restenoze po PKA, z večjim tveganjem pa je bil povezan alel C (27). V objavljenih raziskavah še ni bila preučena povezava z restenozo po PTA.

Odsotnost povezave nekaterih polimorfizmov kandidatnih genov s PAB, srčno-žilnimi dogodki in restenozo bi lahko bila posledica značilnosti preiskovancev, njihovega števila ali pa dejanske odsotnosti povezave. Na PAB, srčno-žilne dogodke in restenozo vplivajo številni dejavniki tveganja, kot so kajenje, hipertenzija, hiperlipidemija, sladkorna bolezen in pomanjkanje gibanja. Za ugotovitev povezave polimorfizmov kot neodvisnih dejavnikov tveganja bi bilo potrebno pri statistični analizi podatkov upoštevati tudi prisotnost in trajanje prej omenjenih dejavnikov tveganja. V raziskavi na dvojčkih je bilo namreč ugotovljeno, da je variabilnost v vrednosti GI v 48 odstotkih posledica genetskih vplivov, v 52 odstotkih pa

življenjskih navad (20). Pri naših preiskovancih so na razvoj PAB, srčno-žilnih dogodkov in restenoze lahko vplivali ti dejavniki in ne polimorfizmi kandidatnih genov. Glede na to, da smo našli šibke povezave bi bilo potrebno rezultate potrditi na večjem številu preiskovancev.

V prihodnjih raziskavah bi bilo potrebno preučiti še povezavo medsebojne interakcije polimorfizmov s PAB, srčno-žilnimi boleznimi in restenozo. Glede na kompleksnost bolezni je namreč malo verjetno, da bi na razvoj vplival en sam polimorfizem.

6. SKLEP

V magistrski nalogi smo preučevali povezavo med polimorfizmi kandidatnih genov in PAB, srčno-žilnimi dogodki ter restenozo po PTA.

V raziskavi A, kjer smo preučevali povezavo med polimorfizmi in PAB ter srčno-žilnimi dogodki smo z analizo 1277 vzorcev ugotovili:

- Polimorfizmi rs12803, rs146608 in rs13428968 v genu *NR4A2*, rs668 in rs12953 v genu *PECAMI*, rs10499563 v genu *IL6* in rs10861032 na kromosomu 12 niso pogostejši pri bolnikih s PAB v primerjavi z vrstniki brez te bolezni.
- Polimorfizem rs668 v genu *PECAMI* je povezan z večjim tveganjem za srčno-žilne dogodke. Genotip GG povečuje tveganje za večje dogodke v primerjavi z genotipoma GC in CC skupaj (za 1,5-krat).
- Haplotipi *PECAMI* so povezani z večjim tveganjem za srčno-žilne dogodke, in sicer haplotip 4 povečuje tveganje za kakršnekoli (za 2,9-krat) oz. manjše dogodke (za 3,9-krat) v primerjavi z ostalimi haplotipi skupaj.
- Polimorfizem rs10499563 v genu *IL6* je povezan z večjim tveganjem za srčno-žilne dogodke. Genotip TT povečuje tveganje za manjše dogodke v primerjavi z genotipoma TC in CC skupaj (za 1,6-krat).
- Polimorfizem rs10861032 na kromosomu 12 je povezan s srčno-žilnimi dogodki. Genotip CC povečuje tveganje za kakršnekoli (za 2,4-krat) oz. večje dogodke (za 2,6-krat) v primerjavi z genotipoma TT in TC skupaj.
- Polimorfizmi rs12803, rs146608 in rs13428968 v genu *NR4A2* niso povezani s pogostostjo srčno-žilnih dogodkov.

V raziskavi B, kjer smo preučevali povezavo med polimorfizmi in restenozo po PTA smo z analizo 182 vzorcev ugotovili:

- Polimorfizem rs10499563 v genu *IL6* je povezan z restenozo 6 mesecev po PTA. Genotip TT povečuje tveganje za razvoj restenoze v primerjavi z genotipoma TC in CC skupaj (za 2,3-krat).
- Polimorfizem rs668 v genu *PECAMI* je povezan z restenozo. Genotip GG je povezan z manjšim tveganjem v primerjavi z genotipoma GC in CC skupaj (za 1,9-krat).

- Polimorfizmi rs12803, rs146608 in rs13428968 v genu *NR4A2*, rs12953 v genu *PECAMI* in rs10861032 na kromosomu 12 niso povezani z restenozo po PTA.

Odsotnost povezave polimorfizmov nekaterih kandidatnih genov s PAB, srčno-žilnimi dogodki in restenozo bi lahko bila posledica značilnosti preiskovancev ali pa dejanske odsotnosti povezave. V prihodnjih raziskavah bi bilo potrebno preučiti še povezavo s polimorfizmi ob upoštevanju prisotnosti in trajanja dejavnikov tveganja ter povezavo z medsebojno interakcijo polimorfizmov.

7. PRILOGA

7.1 PRIMERJAVA RELATIVNE POGOSTOSTI GENOTIPOV Z ZDRAVIMI EVROPSKIMI PROSTOVOLJCI

Podatke za evropsko populacijo smo pridobili iz podatkovne baze NCBI, kjer so zbrani rezultati projekta HapMap-Ceu. Genotipizacija je bila izvedena pri 226 preiskovancih Utaha, potomcih severnih in zahodnih Evropejcev (55). Porazdelitev genotipov posameznih polimorfizmov pri PAB+, PAB- in bolnikih s PTA smo primerjali z evropsko populacijo s χ^2 testom. Med preučevanima skupinama nismo dokazali statistično pomembne razlike (preglednica 17).

Preglednica 17: Relativna pogostost genotipov.

Polimorfizem	Evropska populacija n = 226	PAB+ n = 662	PAB- n = 615	Bolniki s PTA n = 182
NR4A2 SNPA (rs1466408)				
TT	88	87	87	88
TA	12	11	12	13
AA	0	1	1	0
NR4A2 SNP B (rs13428968)				
TT	71	69	70	72
TC	27	29	27	24
CC	2	2	3	4
NR4A2 SNPC (rs12803)				
GG	26	27	30	31
GT	55	50	47	46
TT	19	23	23	23
PECAMI (rs668)				
GG	37	32	34	28
GC	45	48	47	43
CC	18	20	20	29
PECAMI (rs12953)				
AA	36	31	32	32
AG	43	49	48	48
GG	20	21	20	20
IL6 (rs10499563)				
TT	65	61	58	65
TC	32	35	37	31
CC	4	5	5	4
KROMOSOM 12 (rs10861032)				
TT	73	74	69	70
TC	26	23	29	27
CC	2	2	3	3

7. LITERATURA

1. Bajrović F. Temelji patofiziologije s fiziologijo za študente zdravstvenih ved. 1. pon. UL MF Inštitut za patološko fiziologijo. Ljubljana. 2015: 59-63
2. Gardner AW, Afaq A: Management of lower extremity peripheral arterial disease. *J Cardiopulm Rehabil Prev* 2008; 28(6): 349-357.
3. Natha B: Screening for peripheral arterial disease. *S Afr med j* 2014; 104 (2): 149-149
4. <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/peripheral-artery-disease/symptoms-causes/dxc-20167421>. Dostopno marec, 2017
5. Fowkes FG, Rudan D, Rudan I, Aboyans V, Denenberg JO: Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet* 2013; 382: 1329-1340.
6. Hirsch AT, Criqui MH, Treat-Jacobson D, et al: Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. *JAMA* 2001; 286: 1317-24.
7. Olin JW, Sealove BA: Peripheral Artery Disease: Current Insight Into the Disease and Its Diagnosis and Management. *Mayo Clin Proc* 2010; 85(7): 678-692.
8. Flu HC, Tamsma JT, Lindeman JHN, Hamming JF, Lardenoye JHP: A systematic review of implementation of established recommended secondary prevention measures in patients with PAOD. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2010, 39: 70-86
9. Bikfalvi A: Encyclopedic reference of vascular biology&pathology, Springer-Verlag, Berlin, 2000: 30-35
10. http://sphweb.bumc.bu.edu/otlt/mph-modules/ph/ph709_heart/ph709_heart3.html. Dostopno maj, 2017
11. Schroder F, Diehm N, Kareem S, Ames M, Pira A, Zwettler U, Lawall H, Diehm C: A modified calculation of ankle-brachial pressure index is far more sensitive in the detection of peripheral arterial disease. *J VascSurg* 2006; 44: 531–536.
12. The TASC working group: Management of peripheral arterial disease – Transatlantic inter-society consensus. *Critical limb ischemia. Int Angiol* 2000; 19(1): 183–304

13. Blinc A, Šurlan M, Ključevšek T, Klokočovnik T: Smernice za odkrivanje in zdravljenje periferne arterijske bolezni. *Zdrav Vestn* 2004; 73:673-680
14. Shammas NW: Epidemiology, classification, and modifiable risk factors of peripheral arterial disease. *Vascular Health and Risk Management* 2007; 3(2): 229-234
15. Olin JW, Sealove BA: Peripheral Artery Disease: Current Insight Into the Disease and Its Diagnosis and Management. *Mayo Clin Proc* 2010;85(7):678-692.
16. Schillinger M, Minar E: Restenosis After Percutaneous Angioplasty: The Role of Vascular Inflammation. *Vasc Health Risk Manag* 2005; 1(1): 73-78
17. <http://www.drmed.org/wp-content/uploads/2014/06/37-Perkutana-angioplastika.pdf>. Dostopno maj, 2017
18. Salapura V, Blinc A: Pojav restenoze stegenske arterije po perkutani transluminalni angioplastiki. *Zdrav Vestn* 2014; 83: 291-298
19. Bedenčič M, Božič M, Salapura V, Blinc A, Stegnar M: Genetic predisposition to the risk of restenosis after femoropopliteal percutaneous transluminal angioplasty. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2008; 36: A41.
20. Carmelli D, Fabsitz RR, Swan GE, Reed T, Miller B, Wolf PA: Contribution of genetic and environmental influences to ankle-brachial blood pressure index in the NHLBI Twin Study. *Am J Epidemiol* 2000; 151(5): 452-458.
21. Flex A, Gaetani E, Angelini F, Sabusco A, Chillà C: Pro-inflammatory genetic profiles in subjects with peripheral arterial occlusive disease and critical limb ischemia. *J Intern Med* 2007; 262(1): 124-130
22. Flex A, Gaetani E, Pola R, Santoliquido A: The -174 G/C Polymorphism of the Interleukin-6 Gene Promoter is Associated with Peripheral Artery Occlusive Disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002; 24(3): 264-268
23. Hazarika S, Annex BH: Biomarkers and genetics in peripheral artery disease. *Clin Chem* 2017; 63(1): 236-244.
24. Bonta PI, Pols TW, van Tiel CM, Vos M, Arkenbout EK, Rohlena J, et al: Nuclear receptor Nurr1 is expressed in and is associated with human restenosis and inhibits vascular

lesion formation in mice involving inhibition of smooth muscle cell proliferation and inflammation. *Circulation* 2010; 121: 2023-32.

25. Exner M, Schillinger M, Minar E, Mlekusch W, Sabeti S, Endler G, et al: Interleukin-6 promoter genotype and restenosis after femoropopliteal balloon angioplasty: initial observations. *Radiology* 2004; 231: 839-44.

26. Marculescu R, Mlekusch W, Exner M, Sabeti S, Michor S, Rumpold H, et al: Interleukin-1 cluster combined genotype and restenosis after balloon angioplasty. *Thromb Haemost* 2003; 90: 491-500.

27. Sampietro ML, Trompet S, Verschuren JJ, Talens RP, Deelen J, Heijmans BT, et al: A genome-wide association study identifies a region at chromosome 12 as a potential susceptibility locus for restenosis after percutaneous coronary intervention. *Hum Mol Genet* 2011; 20: 4748-57

28. Rodriguez-Calvo R, Tajés M, Vazquez-Carrera: The NR4A subfamily of nuclear receptors: potential new therapeutic targets for the treatment of inflammatory diseases, *Expert Opin Ther Targets* 2017; 21(3): 291-304

24. Bonta PI, Pols TW, van Tiel CM, Vos M, Arkenbout EK, Rohlena J, Kock KT, et al: Nuclear Receptor Nurr1 Is Expressed In and Is Associated With Human Restenosis and Inhibits Vascular Lesion Formation In Mice Involving Inhibition of Smooth Muscle Cell Proliferation and Inflammation, *Circulation* 2010; 121: 2023-2032

29. Bonta PI, van Tiel CM, Vos M, Pols TW, van Thienen JV, Ferreira V, et al: Nuclear Receptors Nur77, Nurr1, and NOR-1 Expressed in Atherosclerotic Lesion Macrophages Reduce Lipid Loading and Inflammatory Responses, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2288-2294

30. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4929>. Dostopno maj, 2017

31. Kardys I, van Tiel CM, de Vries CJ, Pannekoek H, Uitterlinden AG, Hofman A, Witteman JC, de Maat MP: Haplotypes of the NR4A2/NURR1 gene and cardiovascular disease: The Rotterdam Study, *Hum Mutat* 2009, 30(3): 417-423

32. Božič-Mijovski M, Bedenčič M, Stegnar M, Salapura V, Ježovnik MK, Kozak M, Blinc A: Nurr1 Haplotypes are Associated with Femoropopliteal Restenosis/Re-occlusion after Percutaneous Transluminal Angioplasty, *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2012; 43(3): 337-338
33. Popović D, Nikolajević Starčević J, Šantl Letonja M, Makuc J, Cokan Vujkovic A, Reschner H, Bregar D, Petrovič D: PECAM-1 gene polymorphism (rs668) and subclinical markers of carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes mellitus, *Balkan J Med Genet* 2016; 19(1): 63-70
34. Behar E, Chao NJ, Hiraki DD, Krishnaswamy S, Brown BW, Zehnder JL, et al: Polymorphism of adhesion molecule CD31 and its role in acute graft-versus-host disease. *N Engl J Med*. 1996; 334(5): 286-291.
35. Sakowicz A, Fendler W, Lelolek M, Sakowicz B, Pietrucha T: Genetic Polymorphisms and the Risk of Myocardial Infarction in Patients Under 45 Years of Age, *Biochem Genet* 2013; 51(3-4): 239-242
36. Wei H, Fang L, Chowdhury SH, Gong N, Xiong Z, Song J, et al: Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 gene polymorphism and its soluble level are associated with severe coronary artery stenosis in Chinese Singaporean. *Clin Biochem*. 2004; 37(12): 1091-1097
37. Fang L, Wei H, Chowdhury SH, Gong N, Song J, Heng CK, et al: Association of Leu125Val polymorphism of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) gene & soluble level of PECAM-1 with coronary artery disease in Asian Indians. *Indian J Med Res*. 2005; 121(2): 92-99.
38. Wenzel K, Baumann G, Felix SB: The homozygous combination of Leu125Val and Ser563Asn polymorphisms in the PECAM1 (CD31) gene is associated with early severe coronary heart disease. *Hum Mutat*. 1999; 14(6): 545.
39. Song FC, Chen AH, Tang XM, Zhang WX, Qian XX, Li JQ, et al. Association of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 gene polymorphism with coronary heart disease. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2003; 23: 156-8.
40. Li G, Han Z, Dong H, Zhang X, Kong X, Jin X: Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 gene 125C/G polymorphism is associated with deep vein thrombosis. *Molecular Medicine Reports* 2015; 12: 2203-2210.

41. Sasaoka T, Kimura A, Hohta SA, Fukuda N, Kurosawa T, Izumi T: Polymorphisms in the platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) gene, Asn563 Ser and Gly670Arg, associated with myocardial infarction in the Japanese. *Ann NY Acad Sci* 2001; 947: 259-269
42. Elrayess MA, Webb KE, Flavell DM, Syväne M, Taskinen MR, Frick MH, et al: A novel functional polymorphism in the PECAM-1 gene (53G>A) is associated with progression of atherosclerosis in the LOCAT and REGRESS studies. *Atherosclerosis*. 2003; 168: 131–138
43. Fu XL1, Chen JN, Wei GY, Liang LP, Li ZX, Deng YY, Xia ZH: Study of association of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 gene polymorphism with acute myocardial infarction. *Chinese critical care medicine* 2009; 21(6): 329-32
44. Woods A, Brull DJ, Humphries SE, Montgomery HE: Genetics of inflammation and risk of coronary artery disease: the central role of interleukin-6. *Eur Heart J* 2000; 21: 1574-1583
45. Flex A, Gaetani E, Pola R, Santoliquido A, Aloï F: The –174 G/C Polymorphism of the Interleukin-6 Gene Promoter is Associated with Peripheral Artery Occlusive Disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002; 24: 264-268
46. Reiss AB, Siegart NM, De Leon J: Interleukin-6 in atherosclerosis: atherogenic or atheroprotective?. *Clinical Lipidology* 2017; 12 (1): 14-23
47. Hansson GK, Libby P: The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(7): 508-519
48. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3569>. Dostopno maj, 2017
49. Smith AJ, D'Aiuto F, Palmén J, Cooper JA, Samuel J, Thompson S, Sanders J: Association of Serum Interleukin-6 Concentration with a Functional IL6 –6331T>C Polymorphism, *Clin Chem* 2008; 54: 841-850
27. Sampietro ML, Trompet S, Verschuren JJW, et al: A genome-wide association study identifies a region at chromosome 12 as a potential susceptibility locus for restenosis after percutaneous coronary intervention. *Hum Mol Genet* 2011;20(23):4748-4757
50. <https://www.ebi.ac.uk/gwas/search?query=rs10861032>. Dostopno september, 2017

51. Černe D, Ostanek B, Lukač-Bajalo J, Marc J, Hvala I. (2012). Biomedicinska analitika I. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo.

52. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_042315.pdf. Dostopno september, 2017

53. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005 Jan 15

54. Popović D: Gensko polimorfizmi adhezijskih molekul in vnetnih genov ter progresija ateroskleroze karotidnih arterij pri sladkorni bolezni tip 2. Doktorska disertacija. Maribor: Medicinska fakulteta. 2017

55. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>. Dostopno november, 2017