

# Povezanost polimorfizama gena estrogenskoga receptora alfa i interleukina 6 s endotelnom funkcijom u asimptomatskih potomaka bolesnika s ranom koronarnom bolesti i akutnim koronarnim sindromom

---

Miovski, Zoran

Doctoral thesis / Disertacija

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:350617>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Zoran Miovski**

**Povezanost polimorfizama gena  
estrogenskoga receptora alfa i  
interleukina 6 s endotelnom funkcijom u  
asimptomatskih potomaka bolesnika s  
ranom koronarnom bolesti i akutnim  
koronarnim sindromom**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2023.**

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Zoran Miovski**

**Povezanost polimorfizama gena  
estrogenskoga receptora alfa i  
interleukina 6 s endotelnom funkcijom u  
asimptomatskih potomaka bolesnika s  
ranom koronarnom bolesti i akutnim  
koronarnim sindromom**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2023.

Disertacija je izrađena u Klinici za bolesti srca i krvnih žila i Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Ljiljana Banfić

## ZAHVALE

Dugujem svoju zahvalnost mnogim ljudima koji su omogućili ovu disertaciju.

Najprije bih htio zahvaliti svojoj mentorici profesorici Ljiljani Banfić koja me uvela u kardiologiju, nesebično prenijela svoje znanje, motivirala za znanost i bezrezervno podržala u nastavku moje stručne i znanstvene karijere. Tijekom ovih godina postala je moj uzor, prijatelj, osoba koju neizmjereno poštujem.

Zahvalan sam i svojim učiteljima profesorima Maji Strozzi i Jošku Bulumu koji su mi otvorili vrata intervencijske kardiologije i svojim radom, mudrošću i požrtvovnošću usadili veliku ljubav prema toj najzahtjevnijoj grani kardiologije, koja je postala moja velika strast.

Nadalje, zahvalan sam svojim kolegama i prijateljima doktorici Ivi Ladić, medicinskoj sestri Ani Tustić i magistru medicinsko laboratorijske dijagnostike Domagoju Cabanu na velikoj pomoći oko prikupljanja i obrade uzoraka.

Naposljetku, zahvalan sam svojim roditeljima i bratu na podršci tijekom studija medicine i čitavog školovanja.

Rad posvećujem svojoj obitelji, svojoj supruzi Zini i svojoj kćeri Sofiji koje su mi bile potpora u najvažnijim trenucima.

## POPIS KRATICA

ACS	akutni koronarni sindrom, od eng. <i>acute coronary syndrome</i>
AIM	akutni infarkt miokarda
BMI	indeks tjelesne mase, od eng. <i>body mass index</i>
CABG	aortokoronarno premoštenje, od eng. <i>coronary artery bypass graft</i>
CAD	koronarna arterijska bolest, od eng. <i>coronary artery disease</i>
CC	citozin - citozin alelna forma interleukina 6
CRP	C reaktivni protein
DM	šećerna bolest od lat. <i>diabetes mellitus</i>
dRR	dijastolički arterijski tlak
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
eNOs	enzim endotelne NO sintetaze
EKG	elektrokardiogram
ESC	od eng. <i>European Society of Cardiology</i>
ESR	estrogenski receptor
ER $\alpha$	estrogenski receptor alfa
ER $\beta$	estrogenski receptor beta
ET-1	endotelin 1
FMD	protokom izazvana vazodilatacija od eng. <i>flow mediated dilatation</i>
GRACE	od eng. <i>Global Registry of Acute Coronary Events</i>
GG	gvanin - gvanin alelna forma interleukina 6
GC	gvanin - citozin alelna forma interleukina 6
HDL	lipoprotein velike gustoće, od eng. <i>high density lipoprotein</i>
IL6	interleukin 6
LBBB	blok lijeve grane, od eng. <i>left bundle branch block</i>
LDL	lipoprotein niske gustoće, od eng. <i>low density lipoprotein</i>
LL	long -long alelna forma estrogenskog receptora alfa
NO	dušični oksid
NSTEMI	infarkt miokarda bez elevacije ST spojnice, od eng. <i>non-ST elevation myocardial infarction</i>
NSTE-ACS	akutni koronarni sindrom bez elevacije ST spojnice, od eng. <i>non-ST</i>

	<i>elevation acute coronary sindrom</i>
PCI	perkutana koronarna intervencija, od eng. <i>percutaneous coronary intervention</i>
PCR	lančana reakcija polimeraze, od eng. <i>polymerase chain reaction</i>
RBBB	blok desne grane, od eng. <i>right bundle branch block</i>
STEMI	infarkt miokarda s elevacijom ST spojnice od eng. <i>ST elevation myocardial infarction</i>
sRR	sistolički arterijski tlak
SS	short -short alelna forma estrogenskog receptora alfa
SL	short -long alelna forma estrogenskog receptora alfa
UA	nestabilna angina pektoris od eng. <i>unstable angina</i>

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Akutni koronarni sindrom .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Epidemiologija.....	1
1.1.2. Definicija i klasifikacija.....	2
1.1.3. Patofiziologija akutnog koronarnog sindroma.....	4
1.1.4. Liječenje akutnog koronarnog sindroma .....	8
<b>1.2. Čimbenici rizika .....</b>	<b>11</b>
1.2.1. Uloga estrogena i estrogenskih receptora u aterosklerozi i endotelnoj disfunkciji .....	13
1.2.2. Uloga endotelne disfunkcije u akutnom koronarnom sindromu.....	16
1.2.3. Uloga IL-6 u aterosklerozi i endotelnoj disfunkciji.....	19
<b>2. HIPOTEZA.....</b>	<b>20</b>
<b>3. CILJEVI.....</b>	<b>21</b>
<b>4. METODE I ISPITANICI.....</b>	<b>22</b>
<b>4.1. Ispitanici i materijal.....</b>	<b>22</b>
<b>4.2. Metode i plan istraživanja .....</b>	<b>22</b>
4.2.1. Dijagnostika akutnog koronarnog sindroma.....	22
4.2.2. Analiza polimorfizma gena estrogenskog receptora alfa.....	23
4.2.3. Analiza polimorfizma gena IL-6.....	23
4.2.4. Plan istraživanja potomaka .....	24
4.2.5. Metoda protokom posredovane dilatacije (od eng. <i>flow mediated dilatation-FMD</i> ) .....	24
4.2.6. Statistička analiza .....	27
<b>5. REZULTATI.....</b>	<b>28</b>
<b>5.1. Karakteristike bolesnika s ranom koronarnom bolešću .....</b>	<b>28</b>
<b>5.2. Polimorfizam gena estrogenskog receptora alfa u bolesnika s ranom koronarnom bolešću.....</b>	<b>29</b>
<b>5.3. Polimorfizam gena IL-6 u bolesnika s ranom koronarnom bolešću .....</b>	<b>44</b>
<b>5.4. Karakteristike potomaka bolesnika s ranom koronarnom bolešću .....</b>	<b>46</b>
<b>5.5. Polimorfizam gena estrogenskog receptora alfa u potomaka bolesnika s ranom koronarnom bolešću.....</b>	<b>46</b>
<b>5.6. Polimorfizam gena IL-6 u potomaka bolesnika s ranom koronarnom bolešću .....</b>	<b>61</b>
<b>5.7. FMD kod potomaka bolesnika s ranom koronarnom bolešću.....</b>	<b>62</b>
5.7.1. FMD u potomaka s polimorfizmom ER $\alpha$ .....	63
5.7.2. FMD kod potomaka s polimorfizmom IL-6 .....	64
5.7.3. FMD potomaka u odnosu na kombinacije polimorfizama ER $\alpha$ i polimorfizama IL-6 .....	65
<b>6. RASPRAVA .....</b>	<b>67</b>
<b>6.1. Polimorfizam gena estrogenskog receptora alfa u bolesnika s ranom koronarnom bolešću i njihovih potomaka.....</b>	<b>67</b>

<b>6.2. Polimorfizam gena IL-6 u bolesnika s ranom koronarnom bolešću i njihovih potomaka.....</b>	<b>73</b>
<b>6.3. FMD kao pokazatelj endotelne disfunkcije u potomaka bolesnika s ranom koronarnom bolešću.....</b>	<b>75</b>
<b>7. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>83</b>
<b>8. SAŽETAK.....</b>	<b>86</b>
<b>9. SUMMARY.....</b>	<b>88</b>
<b>10. POPIS LITERATURE.....</b>	<b>90</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>109</b>



# 1. UVOD

## 1.1. Akutni koronarni sindrom

### 1.1.1. Epidemiologija

Kardiovaskularne bolesti uzrokuju otprilike jednu trećinu svih smrtnih slučajeva u svijetu, od čega se procjenjuje da je 7,5 milijuna smrtnih slučajeva uzrokovano ishemijskom bolesti srca (1). Akutni koronarni sindrom (ACS, od *eng. acute coronary syndrome*) i iznenadna smrt uzrokuju većinu smrtnih slučajeva povezanih s ishemijskom bolesti srca, što predstavlja 1,8 milijuna smrtnih slučajeva godišnje. Incidencija ishemijske bolesti srca i ACS raste s dobi, ali se u prosjeku javlja 7-10 godina ranije u muškaraca nego u žena, pa se ACS mnogo češće javlja u muškaraca nego u žena mlađih od 65 godina, iako žene predstavljaju većinu bolesnika starijih od 75 godina. Unutar svjetskih i europskih regija postoje velike razlike u incidenciji i prevalenciji ishemijske bolesti srca i ACS-a, kao i u stopama smrtnosti. Međutim, informacije o učestalosti i smrtnosti ACS-a još uvijek su nedovoljno dostupne za Europu, te se većina informacija temelji na učestalosti i smrtnosti od ishemijske bolesti srca (2). Učestalost ishemijske bolesti srca je tako u 2017. u Europi varirala od 94/100 000 u Portugalu do 520/100 000 u Bjelorusiji u muškaraca, odnosno od 44/100 000 u Portugalu do 259/100 000 u Bjelorusiji u žena, dok je u Hrvatskoj iznosila 211/100 000 u muškaraca i 123/100 000 u žena. Ishemijska bolest srca je iste godine bila i vodeći uzrok smrti u Europi od koje je umrlo 862 tisuće muškaraca (19% svih smrti) i 877 tisuća žena. U Europskoj je uniji iste godine od ishemijske bolesti srca umrlo 335 tisuća (14% svih smrti) muškaraca i 297 tisuća (12% svih smrti) žena. Ta je smrtnost u Europi znantno varirala: od 77/100 000 u Francuskoj do 700/100 000 u Litvi među muškarcima i 32/100 000 u Francuskoj do 429/100 000 u Litvi među ženama.

Hrvatska je pak na sredini ljestvice smrtnosti od ishemijske bolesti srca unutar Europe, ali iznad prosjeka EU-a: 2017. su u Hrvatskoj od ishemijske bolesti srca umrla 4963 muškarca (19,2% svih smrti) i 6106 žena (22,1% svih smrti) (3). Potrebno je ipak naglasiti da je u posljednim desetljećima većina europskih zemalja doživjela značajno smanjenje dobno standardiziranih stopa smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti i ishemijske bolesti srca, posebno od ACS-a. To je posljedica poboljšanja kardiovaskularne prevencije i liječenja ACS-a, ali se taj trend uvijek može vratiti zbog starenja stanovništva i povećanja nekih čimbenika rizika.

### 1.1.2. Definicija i klasifikacija

ACS podrazumijeva skupinu kliničkih simptoma povezanih s akutnom ishemijom miokarda koja nastaje kao posljedica smanjenog ili zaustavljenog protoka kroz koronarne arterije. Najčešće se prezentira kao akutno nastala nelagoda u prsima koja se opisuje kao bol, pritisak, stezanje ili žarenje, a može uključivati i bol u lijevoj ruci i vratu, bol u epigastriju i dispneju.

Prema smjernicama Europskog kardiološkog društva ACS možemo podijeliti na:

1. ACS sa ST elevacijom u elektrokardiogramu (EKG-u) – STEMI (od *eng. ST elevation myocardial infarction*) koji obuhvaća bolesnike s akutnom boli u prsima i perzistentnom elevacijom ST spojnice koja traje više od 20 minuta.
2. ACS bez elevacije ST spojnice u EKG-u (NSTE-ACS, od *eng. non-ST elevation acute coronary sindrom*) koji podrazumijeva bolesnike s akutnom boli u prsima bez perzistentne elevacije ST spojnice. Ukoliko ishemija uzrokuje oštećenje miokarda koje rezultira porastom biomarkera u krvi (srčani specifični enzimi troponini ili mišićna frakcija kreatin kinaze) radi se o infarktu miokarda bez ST elevacije (NSTEMI, od *eng. non-ST elevation myocardial infarction*), a ukoliko nema mjerljivog porasta

srčanih enzima radi se o nestabilnoj angini (UA, od eng. *unstable angina*). Akutni infarkt miokarda (AIM, od eng. *acute myocardial infarction*) uključuje STEMI i NSTEMI, a od UA se razlikuje po tome što nastaje kao posljedica akutne totalne ili subtotalne okluzije koronarne arterije i posljedične nekroze miokarda. Otprilike dvije trećine bolesnika s ACS ima NSTEMI-ACS, a trećina STEMI.

Osim te podjele postoji i univerzalna definicija infarkta miokarda koja AIM dijeli na pet entiteta (tip 1 infarkta miokarda, tip 2, tip 3, tip 4 te tip 5 infarkt miokarda) (4).

Tip 1. infarkta miokarda je najčešći i karakteriziran je rupturom ili ulceracijom aterosklerotskog plaka što rezultira stvaranjem intraluminalnog tromba koji opstruira protok krvi kroz koronarne arterije i posljedično uzrokuje nekrozu miokarda.

Tip 2. infarkta miokarda je nekroza miokarda koja nastaje kao posljedica nesrazmjera između potrebe i opskrbe miokarda kisikom, a nastaje kao posljedica hipotenzije, hipertenzije, tahiaritmije, bradiaritmije, anemije, hipoksemije, koronarnog spazma, spontane disekcije koronarne arterije, embolije ili mikrovaskularne disfunkcije.

Tip 3. infarkta miokarda klinički se prezentira kao nagla srčana smrt odnosno podrazumijeva infarkt miokarda koji je doveo do smrtnog ishoda prije nego što su se uspjeli odrediti srčano specifični biomarkeri u krvi, ali postoji visoka klinička sumnja da se radilo o akutnoj ishemiji.

Tip 4. infarkta miokarda podrazumijeva infarkt miokarda povezan s perkutanom koronarnom intervencijom (PCI, od eng. *percutaneous coronary intervention*), gdje periproceduralno nastaju disekcija, okluzija, tromboza, distalna embolizacija koronarne arterije ili tromboza stenta.

Naposljetku, tip 5. infarkta miokarda nastaje također periproceduralno, no nakon kardiokirurškog zahvata ugradnje srčanih prenosnica, kao posljedica ekstrakorporalne cirkulacije, traumatske ili ishemijske ozljede.

### 1.1.3. Patofiziologija akutnog koronarnog sindroma

ACS uglavnom nastaje kao posljedica ruptуре aterosklerotskog plaka unutar koronarnih arterija. Ateroskleroza je generalizirana arterijska bolest koja zahvaća srednje velike i velike krvne žile, pa tako i koronarne arterije, a obilježava ju oštećenje endotela, kronična upala i formiranje aterosklerotskog plaka (5). Postmortem studije su pokazale da proces razvoja koronarne arterijske bolesti (CAD, od *eng. coronary arterial disease*) počinje oko dvadesete godine života (6). Brzina progresije aterosklerotskih lezija je varijabilna, nelinearna i nepredvidiva. Neznačajne lezije mogu postepeno ili naglo progredirati, što u konačnici dovodi do razvoja značajnog suženja (suženje koronarne arterije za 60% ili više) ili do potpune okluzije arterije. Postepena progresija ili stagnacija lezije dovodi do razvoja kronične ishemijske bolesti srca, dok brza progresija i/ili ruptura aterosklerotskog plaka dovodi do ACS-a. Ruptura aterosklerotskog plaka kao posljedicu ima stvaranje okluzivnog ili subtotalno okluzivnog tromba. Okluzivni trombi u pravilu dovode do nastanka STEMI-ja, dok subokluzivni trombi dovode do nastanka NSTEMI-ACS-a (7).

#### 1.1.3.1. Početak ateroskleroze - uloga endotela

Ateroskleroza je multifaktorijalna bolest na koju utječu mnogi čimbenici, među kojima su najvažniji muški spol, starija životna dob, pušenje, dislipidemija, pretilost (BMI, od *eng. body mass indeks*  $> 30\text{kg/m}^2$ ), šećerna bolest, arterijska hipertenzija te nasljedni faktori (8). Ovi rizični čimbenici pridonose oštećenju endotela krvne žile i rezultiraju endotelnom disfunkcijom, što predstavlja ključnu ulogu u pokretanju procesa ateroskleroze. Disfunkciju

endotela uzrokuje smanjenje biorasplošivosti dušičnog oksida (NO) i pretjerana proizvodnja endotelina 1, što smanjuje vazodilataciju, povećava ekspresiju adhezijskih molekula (npr. selektina) i povećava trombogenost krvi izlučivanjem lokalno aktivnih tvari (9).

#### 1.1.3.2. Razvoj aterosklerotskog plaka - uloga upale

Jednom kada je endotel oštećen, upalne stanice, osobito monociti, migriraju u subendotelni prostor i tamo se diferenciraju u makrofage. Makrofagi fagocitiraju oksidirani lipoprotein niske gustoće (LDL, od eng. *low density lipoprotein*) koji ulaze u stijenk u oštećene arterije, pretvaraju se u „pjenušave stanice“ i uzrokuju stvaranje masnih pruga. Aktivirani makrofagi oslobađaju kemokine i citokine (npr. monocitni kemotaktični protein 1, faktor nekroze tumora  $\alpha$  i interleukine) koji pojačavaju proces privlačenjem dodatnih makrofaga i stanica glatkih mišića. Stanice glatkih mišića sintetiziraju izvanstanične komponente matriksa na mjestu plaka. Makrofagi imaju važnu ulogu i u razgradnji plaka pomoću enzima matriks metaloproteinaze, što je ključno u razvoju ACS-a. Naime, poremećaj ravnoteže između produkcije matriksa glatkih mišićnih stanica i razgradnje istog od strane makrofaga, dovodi do «ranjivosti» plaka i sklonosti pucanju plaka. Iako ruptura plaka može uzrokovati ACS, u velikoj većini slučajeva (čak njih 99%) simptomi mogu izostati.

#### 1.1.3.3. Stabilnost aterosklerotskog plaka

Stabilnost aterosklerotskih plakova je vrlo varijabilna, ali su poznate karakteristike koje svrstavaju plakove u visoko rizične (10-17). To su: velika lipidna jezgra, tanka vanjska fibrinska ovojnica, velika gustoća makrofaga i T-limfocita uz relativni manjak stanica glatkih mišića, povećana izraženost matriksnih metaloproteinaza, ekscentrično širenje plaka i povećanje njegove neovaskularizacije. Kao što je ranije opisano, upala povećava aktivnost

makrofaga na mjestu plaka što dovodi do povećanja njegove lipidne jezgre i stanjivanja fibrinske ovojnice, a to povećava nestabilnost plaka i može rezultirati njegovim pucanjem. Dokazano je da povišene vrijednosti biomarkera upale (C-reaktivnog proteina, CRP-a) pozitivno koreliraju s brojem rupturiranih plakova (18). Jedan od najznačajnijih citokina koji sudjeluje u upalnom odgovoru je interleukin 6 (IL-6), citokin kojeg sintetiziraju adipociti, endotelne stanice, fibroblasti, miociti i leukociti. Dosadašnja su istraživanja pokazala povezanost između povišene razine cirkulirajućeg IL-6 i rizika od infarkta miokarda u asimptomatskih koronarnih bolesnika (19). IL-6 se također smatra jednim od ključnih citokina za razvoj rane ateroskleroze (20).

#### 1.1.3.4. Poremećaj aterosklerotskog plaka, tromboza i akutni koronarni sindrom

Patogeneza ACS-a uključuje složenu interakciju endotela, upalnih stanica i trombogenosti krvi (21, 22), a više linija dokaza sugerira da stvaranje tromba ima centralnu ulogu u toj patogenezi (23, 24). Čimbenici poput lipidnog sastava aterosklerotskog plaka, stupnja upale, dinamike protoka krvi u tom području i bolesnikova antitrombotska i protrombotska ravnoteža važni su za proces stvaranja tromba i određuju hoće li određena ruptura plaka rezultirati ACS-om ili ne (25-27). Post-mortem ispitivanja pokazala su da ruptura plaka uzrokuje otprilike 75% fatalnih AIM, dok površna erozija endotela čini preostalih 25% (28). Nakon rupture plaka ili endotelne erozije, subendotelni matriks bogat prokoagulantnim tkivnim faktorom izložen je cirkulacijskoj krvi što dovodi do adhezije trombocita, nakon čega slijedi njihovo aktiviranje i agregacija te posljedično stvaranje tromba. Postoje dvije vrste tromba: tromb bogat trombocitima («bijeli tromb») koji se formira u područjima brzog protoka i samo djelomično okludira arteriju, i tromb bogat fibrinom («crveni tromb») koji je rezultat aktivacije koagulacijske kaskade i smanjenog protoka u arteriji. Crveni

trombi se obično superimponiraju na bijele i to uzrokuje totalnu okluziju (Slika 1).



Slika 1. Prikaz “bijelog” i “crvenog” tromba iz koronarne arterije dobiven aspiracijskom trombektomijom u bolesnika s infarktom miokarda

*Autor Zoran Miovski, 2016.*

#### 1.1.4. Liječenje akutnog koronarnog sindroma

Liječenje ACS se razlikuje ovisno o kojem se tipu infarkta radi, odnosno liječenje ACS-a u užem smislu riječi uključuje liječenje infarkta miokarda tipa 1, dok se u ostalih tipova pokušava otkloniti etiološki čimbenik koji je doveo do infarkta.

Liječenje infarkta miokarda tipa 1 ovisi o tome da li se radi o STEMI li NSTEMI-ACS-u, a uzimaju se u obzir i drugi čimbenici, poput kliničke slike, dobi i komorbiditeta bolesnika, bolesnikova želja, ali i mogućnosti liječenja u ustanovi u kojoj se zbrinjava ACS.

Bolesnici koji imaju kliničku sliku ACS, a ST spojica se ne može analizirati u EKG-u, te imaju kompletni blok lijeve ili desne grane (LBBB; od eng. *left bundle branch block* ili RBBB, od eng. *right bundle branch block*) liječe se jednako kao i bolesnici sa STEMI-jem. Temelj liječenja je žurna revaskularizacija koronarnih arterija u kombinaciji s farmakoterapijom koja uključuje antiagregacijske, antikoagulantne, antishemijske i antilipidne lijekove.

##### 1.1.4.1. Revaskularizacija koronarnih arterija

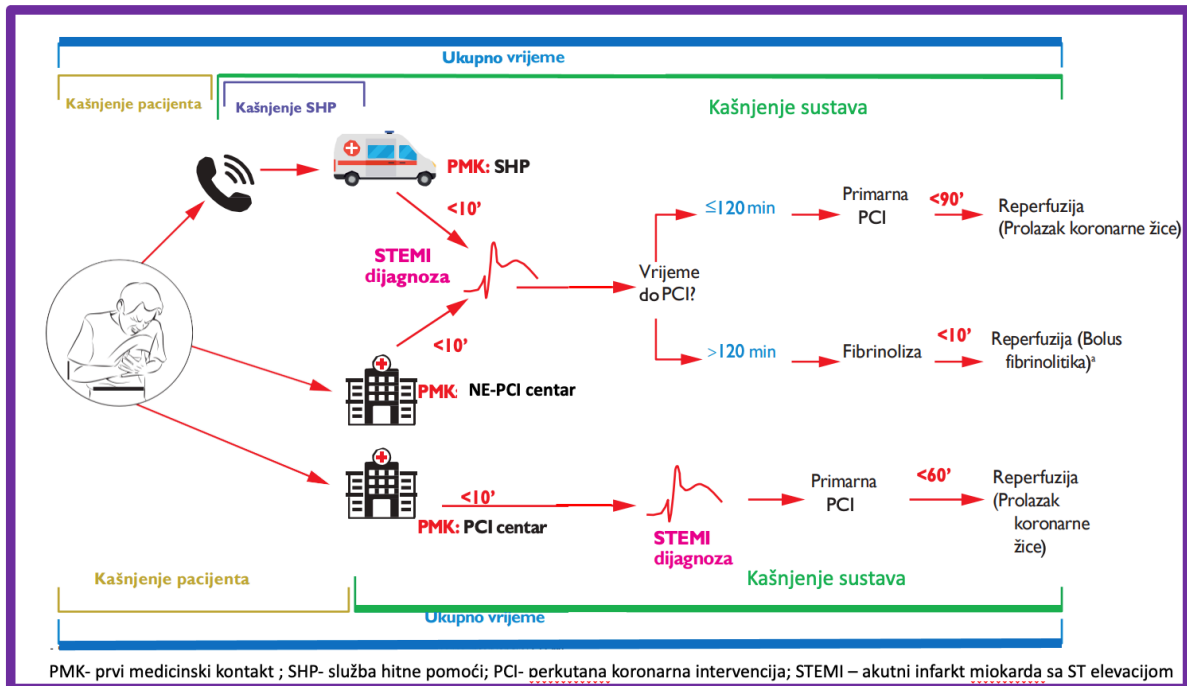
Ovaj postupak podrazumijeva ponovnu uspostavu krvnog protoka kroz suženu ili potpuno okludiranu koronarnu arteriju; a navedeno se može postići:

1. Perkutanom koronarnom intervencijom (PCI, od eng. *percutaneous coronary intervention*) kojom se mjesto opstrukcije proširuje uz pomoć koronarnog balona i koronarnih stentova
2. Fibrinolitičkim lijekovima
3. Kardiokirurškom revaskularizacijom miokarda kojom se opstrukcija zaobilazi uz pomoć preosnica (aortokoronarni “bypass“)

U bolesnika sa STEMI-jem metoda izbora je primarni PCI, odnosno revaskularizacija unutar 12 sati od početka simptoma (Slika 2) (29). Isti pristup se primjenjuje i u bolesnika u kojih je prošlo više od 12 sati od početka simptoma,



ali i dalje perzistiraju bolovi u prsima, hemodinamska nestabilnost ili maligne aritmije. Ukoliko se bolesnik zbrinjava u ustanovi u kojoj nije moguće učiniti PCI ili je za transport bolesnika do PCI centra potrebno više od 120 minuta od postavljene dijagnoze STEMI-ja, indicirana je primjena fibrinolitičke terapije koja uključuje tenekteplazu, alteplazu, streptokinazu ili reteplazu unutar 10 minuta od postavljene dijagnoze ukoliko ista nije kontraindicirana.



Slika 2. Strategija liječenja STEMI-a

Preuzeto i modificirano iz ESC smjernica za dijagnostiku i liječenje bolesnika s infarktom miokarda sa ST elevacijom (29)

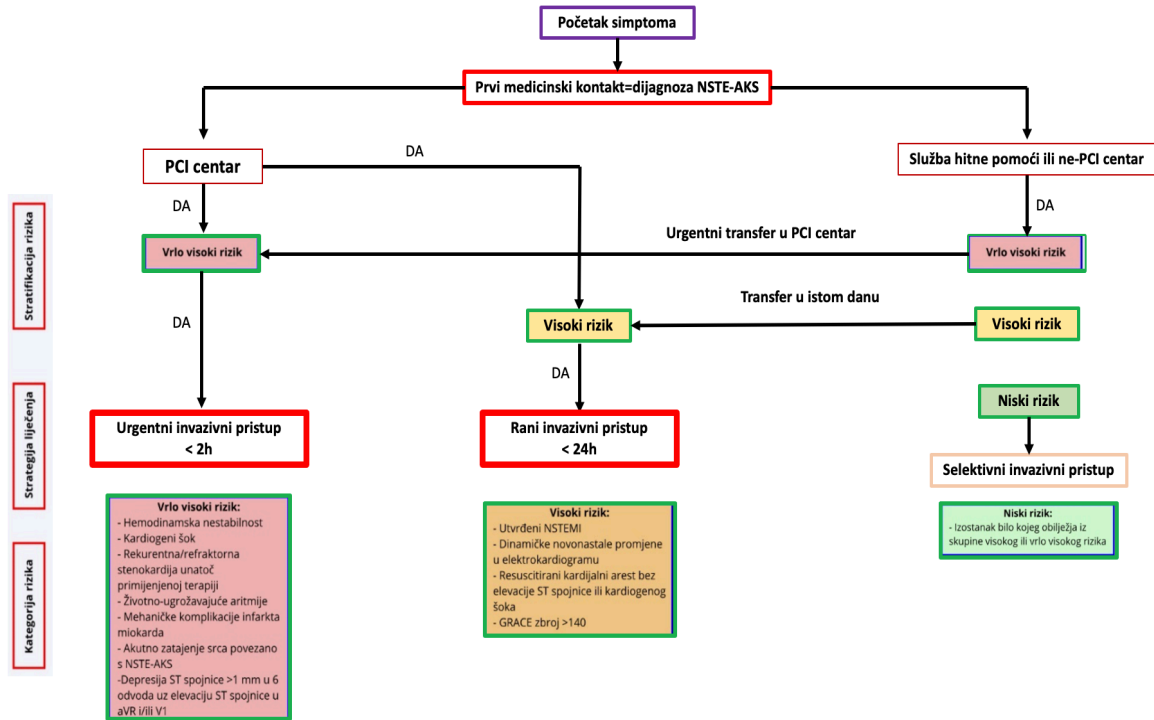
Za razliku od bolesnika sa STEMI, u slučaju NSTEMI-ACS u svakog je bolesnika potrebno učiniti procjenu rizika kako bi se utvrdio optimalan pristup: to može biti konzervativno liječenje, hitni i odgođeni PCI. Procjena se radi prema smjernicama Europskog kardiološkog društva (ECS, od eng. *European Cardiology Society*), koja između ostalog uključuje i bodovanje za procjenu rizika za unutarbolničku, odnosno 6-mjesečnu smrtnost - GRACE 2.0 (od eng. *Global Registry of Acute Coronary Events*), a koji procjenjuje dob, puls, sistolički krvni tlak, Killipovu

klasu, kreatinin, promjenu ST spojnice, povišeni troponin te kardiopulmonalni arrest pri prijemu, svrstavajući bolesnike u one niskog, visokog i vrlo visokog rizika.

Trenutno važeće ESC smjernice preporučuju sljedeće (Slika 3) (30):

1. hitni PCI unutar 120 min u bolesnika s jednim ili više od sljedećih kriterija: hemodinamska nestabilnost ili kardiogeni šok, ponavljajuća ili perzistentna bol u prsima, maligne aritmije ili srčani arrest, mehaničke komplikacije infarkta, akutno srčano popuštanje ili ponavljajuće dinamičke promjene ST spojnice;
2. rani PCI unutar 24 sata u bolesnika s jednim ili više od sljedećih kriterija: dinamičke promjene troponina ili ST spojnice (simptomatske ili asimptomatske), te GRACE skor za visoki rizik ( $> 140$  bodova),
3. PCI unutar 72 sata u bolesnika s jednim ili više od sljedećih kriterija: šećerna bolest, bubrežna insuficijencija, ejekcijska frakcija lijeve klijetke (LVEF od eng. *left ventricular ejection fraction*)  $< 40\%$  ili kongestivno srčano popuštanje, rana novonastala angina, raniji PCI ili ranije prenosnice (CABG od eng. *coronary artery bypass graft*), te GRACE skor za srednji rizik ( $> 109$  i  $< 140$  bodova).

Svi ostali bolesnici u kojih su bolovi u prsima prestali, nemaju gore navedene rizike te imaju GRACE skor za niski rizik trebaju se liječiti prema ESC smjernicama za dijagnostiku i liječenje kroničnih koronarnih sindroma (31).



Slika 3. Strategija liječenja NSTEMI-ACSa

Preuzeto i modificirano iz ESC smjernica za dijagnostiku i liječenje bolesnika s NSTEMI-ACS (30)

## 1.2. Čimbenici rizika

Tradicionalni rizični faktori za razvoj koronarne bolesti su muški spol, starija životna dob (muškarci stariji od 55 godina, žene starije od 65 godina), pušenje, pretilost (BMI > 30kg/m<sup>2</sup>), dislipidemija, arterijska hipertenzija, šećerna bolest te nasljedni faktori (8). Postoje promjenjivi i nepromjenjivi čimbenici rizika. Tako su promjenjivi rizični čimbenici povezani sa stilom i načinom života; pušenjem, pretilosti, dislipidemijom, arterijskom hipertenzijom i šećernom bolesti. Brojne su studije pokazale da pušenje dvostruko povećava rizik od ACS-a, kao i pretilost (posebno abdominalnog tipa) te da je dislipidemija podjednako važan rizični faktor (32-34). Također, svaki porast prosječnog sistoličkog tlaka za 20 mm Hg ili dijastoličkog za 10 mm Hg udvostručuje rizik za razvoj ACS-a, budući da pod djelovanjem povišenog arterijskog tlaka dolazi do oštećenja endotela krvnih žila (35). Šećerna bolest, bez obzira na tip, povećava rizik od ACS-a i do tri puta, a

mortalitet i do 10 puta (36). Svi ovi čimbenici pridonose ubrzanoj aterosklerozi, pa npr. hiperglikemija inhibira produkciju vazodilatatora poput NO, a pojačava djelovanje vazokonstriktora poput endotelina 1 pospješuje koagulaciju i usporava fibrinolizu.

Nepromjenjivi rizici su vezani uz genetičko nasljeđe a u njih spadaju dob, spol, narodnost te pozitivna obiteljska anamneza. Dokazano je da su razvoju ACS-a podložnije starije osobe. Mlađa populacija kao rizične faktore ima veću prevalenciju dislipidemije, pušenja i pozitivne obiteljske anamneze dok starije osobe imaju veću prevalenciju hipertenzivne bolesti. Također, u mlađih je bolesnika češće prisutna jednožilna bolest i STEMI, dok stariji češće imaju višežilnu bolest i NSTEMI (29).

U prosjeku, žene oboljevaju od ishemijske bolesti srca 7-10 godina kasnije nego muškarci (37), a muškarci češće imaju nestabilan aterosklerotski plak podložan rupturi i krvarenju, što dovodi do bržeg razvoja ACS-a (38). Također, muškarci oboljevaju od ACS-a tri puta češće nego žene koje nisu u menopauzi, no taj se rizik izjednačava nastupom menopauze, a objašnjava se protektivnim učinkom estrogena (39). Posljedično, nasljeđe smatramo značajnim čimbenikom rizika ukoliko postoji pozitivna obiteljska anamneza ACS prije 55. godine za muškarce, odnosno prije 65. godine za žene (40).

Prema brojnim epidemiološkim studijama, 40% bolesnika koji su doživjeli ACS imaju tri ili više rizičnih faktora, dok je za 60% oboljelih uzrok i dalje nejasan, što predstavlja izazov za klinička i znanstvena istraživanja kako bi se u konačnici smanjio morbiditet i mortalitet od ishemijske bolesti srca i ACS-a (8).

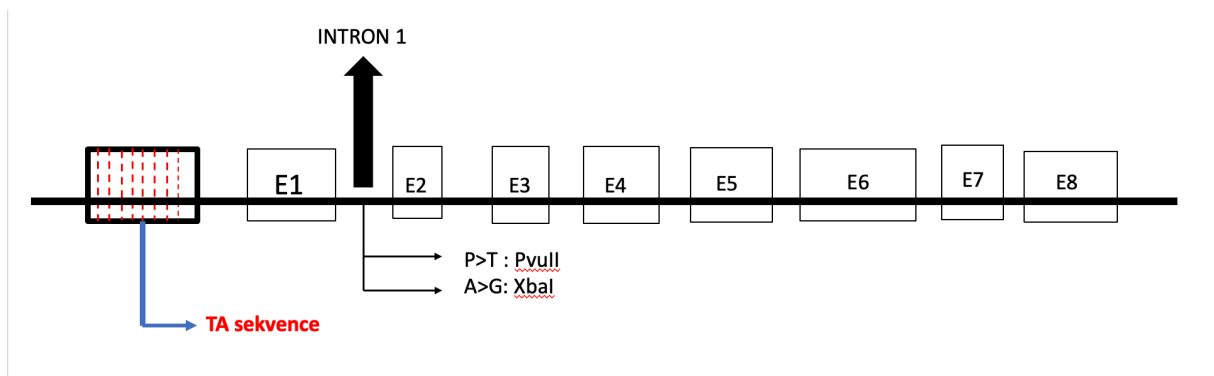
### 1.2.1. Uloga estrogena i estrogenskih receptora u aterosklerozi i endotelnoj disfunkciji

U kardiovaskularnom sustavu estrogeni imaju vazodilatacijski, anti-upalni i anti-proliferativni učinak, te povoljno utječu na lipidogram (41, 42), a ti se učinci ostvaruju posredstvom estrogenskih receptora. Postoje dvije vrste estrogenskih receptora: estrogenski receptor alfa ( $ER\alpha$ ) i estrogenski receptor beta ( $ER\beta$ ), kodirana s dva različita gena, koja su oba izražena na endotelnim i glatko-mišićnim stanicama vaskularne stijenke (43). Pretkliničke studije su pokazale da je  $ER\alpha$  glavni posrednik ateroprotektivnog učinka estrogena (44), a to je potom potvrđeno i u ranim kliničkim studijama. Naime, snižena ekspresija  $ER\alpha$  je prvo dokazana u premenopauzalnih žena s preuranjenom aterosklerozom (45). Potom je nađeno da je metilacija, odnosno inaktivacija  $ER\alpha$  povećana u endotelnim stanicama na mjestu aterosklerotskih plakova (46). Naposljetku, preuranjena je ateroskleroza detektirana i u mladog muškarca homozigota s mutacijom u  $ER\alpha$  genu (47). Stoga su prve kliničke studije upućivale na to da bi promjena ekspresije i funkcije  $ER\alpha$  receptora mogle smanjiti ateroprotektivni učinak estrogena.

Gen za  $ER\alpha$  se nalazi na šestom kromosomu (6q24.1) i ima šest domena kodiranih s osam eksona (Slika 4.). Polimorfizmi gena  $ER\alpha$  su ispitivani u mnogim stanjima i nađena je njihova povezanost s ranom osteoporozom (48), karcinomom dojke (49), karcinomom prostate (50), arterijskom hipertenzijom (51), dislipidemijom (52) te odgovorom u lipidogramu na hormonsku nadomjesnu terapiju (53). No rezultati ovih studija nisu bili konzistentni, a većina ih je ispitivala polimorfizme jednog nukleotida ("SNP", od eng. '*single nucleotid polymorphisms*'): PvuII polimorfizam koji je uzrokovan zamjenom timina u citozin (T/C) u intronu 1 gena i XbaI polimorfizam uzrokovan zamjenom gvanina u adenzin (G/A) koji se nalazi 50 parova baza nizvodno od PvuII polimorfizma. Povezanost ovih polimorfizama i ishemijske bolesti srca također se pokazala nenkonzistentnom,

pa dok jedne studije govore u prilog povezanosti PvuII polimorfizma s aterosklerozom i koronarnom bolesti (52), druge govore protiv (54).

Nasuprot ovim saznanjima, duljina ponavljanja jednostavne sekvence dinukleotida timina i adenzina (T/A) u promotorskoj regiji ER $\alpha$  gena uzvodno od egzona 1 u nekoliko je studija pokazala povezanost s koronarnom bolesti (55, 56).

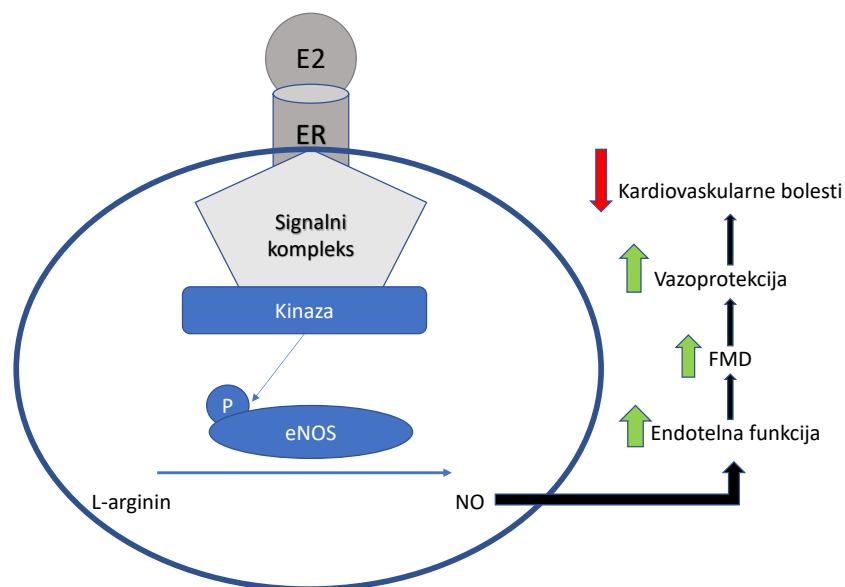


Slika 4. Gen za ER $\alpha$

Autor Zoran Mioviski, 2022.

Estrogeni štite od ateroskleroze na način da štite bolesnike od endotelne disfunkcije, odnosno endotelnog oštećenja. Naime, jedno od najbolje opisanih djelovanja estrogena je sposobnost da on utječe na reaktivnost arterija direktnim utjecajem na endotelnu funkciju (57), stimulirajući enzim endotelne sintetaze dušičnog oksida (eNOs) u vaskularnim endotelnim stanicama. Stimulacijom estrogenskih receptora ustvari započinje signalni put aktivacije ERK/MAP i PI3K kinaze što u konačnici dovodi do fosforilacije i aktivacije enzima eNOS i produkcije NO iz L-arginina. NO potom dovodi do relaksacije glatkih mišićnih stanica i do vazodilatacije arterije (Slika 5). Jedno od glavnih svojstava adekvatne funkcije endotela je protokom izazvana vazodilatacija (FMD, od eng. flow-mediated vasodilatation) koja nastaje kao odgovor na naglo povećanje protoka u arteriji i na taj način štiti endotel arterije od oštećenja. Naime, krv u lumenu krvne žile djeluje na stijenku dvjema ortogonalnim silama - tangencijalno usmjerenom

silom na jedinicu površine stijenke koja je frikcijska sila primarno povezana s protokom i naziva se sila smicanja (eng. shear stress), te silom istezanja koja na stijenku djeluje okomito i izravno i odgovara krvnom tlaku (58). Na tangencijalnu silu zdrave endotelne stanice reagiraju trenutačno – poticanjem bioloških procesa koji dovode do otpuštanja vazoaktivnih agensa te brze promjene žilnog tonusa. NO je prvi definirani takav vazodilatatorni agens, tzv. endotelni čimbenik relaksacije koji se otpušta u odgovoru na žilni stres i vodi do relaksacije vaskularnih glatkih mišićnih stanica. Osim vazodilatatornih svojstava, NO sprječava adheziju i agregaciju trombocita, kao i migraciju leukocita u arterijsku stijenku, te inhibira proliferaciju glatkih mišićnih stanica, odnosno ima ulogu u svim ključnim koracima za razvoj ateroskleroze. Nekoliko godina nakon otkrića NO otkriveno je da vaskularni endotel kao protutežu NO, proizvodi i vazokonstriktorni agens, endotelin-1 (ET-1), koji djeluje na način da povišuje krvni tlak i dovodi do vaskularne i srčane hipertrofije (59, 60).



Slika 5. Signalni put estrogenskog receptora

*Autor Zoran Mioviski, 2022.*

### 1.2.2. Uloga endotelne disfunkcije u akutnom koronarnom sindromu

Kako je sposobnost otpuštanja vazoaktivnih tvari i vazodilatacija u arteriji putem NO glavna karakteristika zdravog endotela, tako je neraspoloživost NO i aktivacija vazokonstriktorskih agensa, odnosno neprimjerena aktivacija endotela i vazokonstrikcija obilježje endotelne disfunkcije. To može biti uzrokovano nedostatkom L-arginina, supstrata za NO, ili manjkom kofaktora za NO-sintetazu ali i genetskim razlikama i posttranslacijskim modifikacijama enzima. Dokazano je da se endotelna disfunkcija pojavljuje puno ranije prije pojave opstruktivnih aterosklerotskih lezija, a osobito je zanimljivo da može biti prisutna čak i u djece s obiteljskom anamnezom kardiovaskularnih bolesti (20, 61). Isto tako, endotelna će disfunkcija biti izraženija u slučaju veće izloženosti rizičnim čimbenicima za razvoj ACS-a, a važan je i prognostički čimbenik za buduće kardiovaskularne događaje u bolesnika s ranijim ACS-om (62, 63).

Bitno je naglasiti da je glavna karakteristika endotelne disfunkcije njena reverzibilnost, pa uklanjanje rizičnih čimbenika na koje se može utjecati, kao i uzimanje odgovarajuće medikamentozne terapije mogu dovesti do njenog značajnog poboljšanja i smanjiti rizik za ACS. Primjerice, primjena statina i antihipertenziva koji se koriste u liječenju ishemijske bolesti srca i ACS-a ima povoljan učinak na endotelnu funkciju kroz smanjenje razine oksidativnog stresa i lipida (64). Također, primjena ACE inhibitora smanjuje endotelnu disfunkciju povećanjem bioraspoloživosti NO-a (65).

Ovisno o tome koliko traje izloženost rizičnom čimbeniku, endotelna disfunkcija može biti početna, stacionarna ili progresivna, a stupanj endotelne disfunkcije se može procijeniti. Procjena endotelne disfunkcije tako predstavlja važan prediktor u razvoju ACS-a, a njome se može pratiti i učinak liječenja ishemijske bolesti srca. Obzirom da endotelna disfunkcija nije lokalizirana, već se radi o generaliziranom poremećaju, testovi endotelne disfunkcije su jednako značajni, bilo da se izvode na koronarnim ili perifernim arterijama (66). Procjena endotelne disfunkcije najčešće podrazumijeva mjerenje dilatacije krvne žile kao odgovor na



određeni podražaj, pri čemu smanjena dilatacija služi kao pokazatelj endotelne disfunkcije.

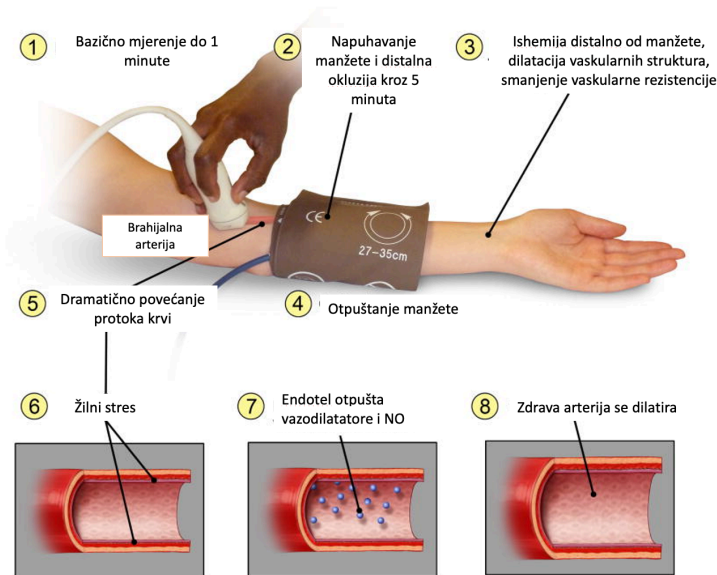
#### 1.2.2.1. Procjena endotelne disfunkcije metodom protokom posredovane dilatacije

Ultrazvučni test protokom posredovane dilatacije perifernih arterija (FMD) se izvodi na brahijalnoj arteriji i temelji se na ranije opisanom patofiziološkom mehanizmu izazivanja vazodilatacije uslijed povećanog protoka kroz arteriju, pri čemu povećani protok izaziva žilni stres koji stimulira endotelne stanice na lučenje NO i posljedičnu vazodilataciju. Smanjena vazodilatacija uslijed žilnog stresa predstavlja poremećaj biorasploživosti NO-a i postojanje endotelne disfunkcije (67).

Žilni stres na brahijalnoj arteriji se uzrokuje postavljanjem i zatezanjem manžete na podlakticu čime se uzrokuje okluzija protoka, a promjer brahijalne arterije se mjeri ultrazvučnim aparatom visoke rezolucije. Promjer se mjeri u bazalnim uvjetima, tijekom pet minuta okluzije te potom tijekom 3 minute reaktivne hiperemije nakon popuštanja okluzije (Slika 6). FMD se izražava kao maksimalni postotak dilatacije tijekom reaktivne hiperemije u odnosu na bazalni promjer (Slika 7).

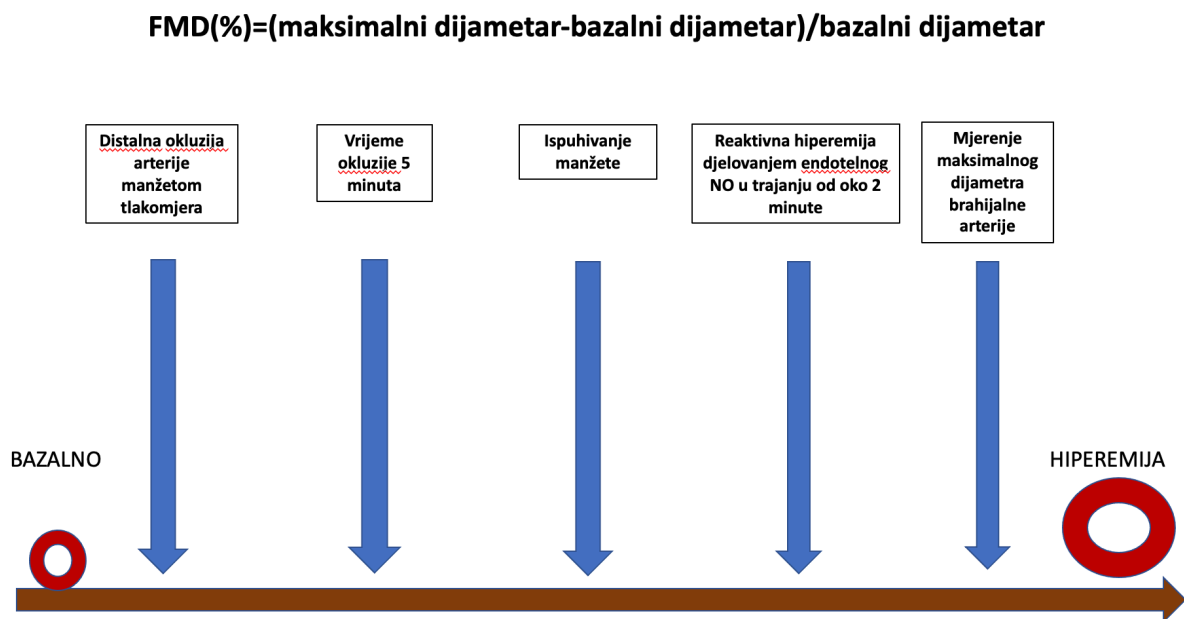
Osim povezanosti endotelne disfunkcije i koronarne bolesti, postoje dokazi o endotelnoj disfunkciji u asimptomatskih mladih bolesnika bez klasičnih rizičnih čimbenika, ali s pozitivnom obiteljskom anamnezom za koronarnu bolest (68). U studiji koja je uključivala 94 ispitanika s rizičnim faktorima za ACS, endotelna disfunkcija (patološki FMD) je imala visoku senzitivnost (91%), dok je uredna endotelna funkcija (uredan FMD) imala visoku negativnu prediktivnu vrijednost (95%) (69). Velika case-control multietnička studija koja je obuhvaćala 2843 zdravih ispitanika je pokazala da oni s reduciranim FMD-om imaju značajno više kardiovaskularnih događaja tijekom petogodišnjeg razdoblja praćenja (70). Također, ispitivanje endotelne disfunkcije se pokazalo kao korisna metoda za

identifikaciju bolesnika s visokim rizikom za razvoj ACS-a među onima s koronarografski dokazanom blagom ili minimalnom koronarnom bolesti (71).



Slika 6. Grafički prikaz izvođenja FMD-a

Preuzeto i modificirano od: The University of Western Australia – <https://researchimpact.uwa.edu.au/wp-content/uploads/2018/04/FMD>



Slika 7. Grafički prikaz izračuna FMD-a

Autor Zoran Mioviski, 2022.

### 1.2.3. Uloga IL-6 u aterosklerozi i endotelnoj disfunkciji

Kao što je ranije opisano, ateroskleroza je kronično upalno stanje koje karakterizira aktivacija odgovora akutne faze, a IL-6 ima ključnu ulogu u tom procesu (20). IL-6 je, naime, pleotropni citokin kojeg sintetiziraju adipociti, endotelne stanice, fibroblasti, miociti i leukociti, a koji kao jedan od najznačajnijih citokina u upalnom odgovoru stimulira sintezu proteina akutne faze. I IL-6 i transkripti gena IL-6 nađeni su u aterosklerotskim plakovima (72-74), pa se IL-6 smatra jednim od ključnih citokina za razvoj rane ateroskleroze (20). Također, prospektivne studije su pokazale da visoke razine IL-6 u plazmi imaju proupalni i prokoagulantni učinak, kao i da su povišene razine IL-6 i CRP-a u plazmi (koji je dobar surogat razine IL-6) prediktivne za razvoj ACS-a u asimptomatskih zdravih muškaraca (19), kao i ishemijske bolesti srca u žena (75). Također je pokazano da je sistemska upala povezana s endotelnom funkcijom u bolesnika s koronarnom bolesti (76), odnosno da narušava vazodilataciju arterija ovisna o endotelu (77).

Ekspresija IL-6 je regulirana uglavnom na razini transkripcije, a promotorsko mjesto u genu IL-6 ima nekoliko polimorfizama. Jedan od najčešćih funkcionalnih polimorfizama je pojedinačni polimorfizam zamjene gvanina i citozina (G>C), na poziciji -174, odnosno 174 baznih parova uzvodno od početnog mjesta translacije. Pokazalo se da polimorfizam promotora -174 G>C utječe na brzinu transkripcije gena i bazalnu koncentraciju IL-6 u plazmi, kao i da je povezan s mnogim kroničnim upalnim stanjima, uključujući ishemijsku bolest srca (78). Stoga je za očekivati da postoji i povezanost endotelne disfunkcije, odnosno FMD-a s genotipom promotora IL-6.

## **2. HIPOTEZA**

Potomci bolesnika s ranom koronarnom bolesti i ACS-om koji naslijede polimorfizam gena estrogenskog receptora alfa i/ili interleukina 6 imat će značajniju endotelnu disfunkciju u usporedbi s ostalim ispitanicima bez nasljeđenog polimorfizma gena estrogenskog receptora alfa i/ili interleukina 6.

### **3. CILJEVI**

#### **Opći cilj:**

Analizirati povezanost polimorfizma gena za ER $\alpha$  i polimorfizma gena za IL-6 u zdravih asimptomatskih ispitanika (potomaka bolesnika s ranom koronarnom bolešću) i endotelne disfunkcije korištenjem metode protokom posredovane dilatacije (od eng. *flow mediated dilatation – FMD*)

#### **Specifični ciljevi:**

- 1) utvrditi pojavnost polimorfizma ER $\alpha$  i IL-6 u bolesnika s ranom koronarnom bolešću i u njihovih potomaka;
- 2) utvrditi prisutnost endotelne disfunkcije FMD metodom u potomaka koronarnih bolesnika;
- 3) ispitati povezanost polimorfizma ER $\alpha$  i patoloških vrijednosti lipidograma u bolesnika s ranom koronarnom bolesti i njihovih potomaka;
- 4) ispitati povezanost polimorfizma IL-6 i plazmatske vrijednosti CRP-a u bolesnika s ranom koronarnom bolešću.

## 4. METODE I ISPITANICI

Istraživanje je provedeno na Klinici za bolesti srca i krvnih žila i Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb u sklopu projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta „Genetska osnova kardiovaskularnih učinaka hormonskog nadomjestnog liječenja“ (broj projekta 108-1081875-2423) pod mentorstvom voditeljice projekta prof. dr.sc. Ljiljane Banfić.

### 4.1. Ispitanici i materijal

Prva faza istraživanja uključila je 73 bolesnika s ranom koronarnom bolesti koji su preboljeli ACS (muškarci mlađi od 50 godina a žene mlađe od 55 godina). Potom je u studiju uključeno 68 potomaka svih bolesnika kojima je dokazan polimorfizam ER $\alpha$  i/ili IL-6. Ispitanici su bili upoznati s metodologijom istraživanja, a nakon potpisanog informiranog pristanka uzeti su krvni uzorci i učinjeno ispitivanje.

### 4.2. Metode i plan istraživanja

#### 4.2.1. Dijagnostika akutnog koronarnog sindroma

ACS je dijagnosticiran na temelju kliničke slike, elektrokardiograma, laboratorijskih nalaza te nalaza koronarografije. Koronarografija je učinjena Seldingerovom metodom transradijalnim ili transfemoralnim pristupom. Bolesnici s ACS-om su liječeni perkutanom koronarnom intervencijom i/ili optimalnom medikamentoznom terapijom prema Europskim smjernicama za akutne koronarne sindrome (ranije navedene ESC smjernice). S

obzirom na medikamentoznu terapiju i utjecaj lijekova na endotelnu funkciju, u koronarnih bolesnika nije ispitivana endotelna (dis)funkcija.

#### 4.2.2. Analiza polimorfizma gena estrogenskog receptora alfa

Svim ispitanicima (bolesnicima i njihovim potomcima) izvađeno je 5 ml krvi iz periferne vene koja je pohranjena u epruvetu s Na-EDTA i čuvana na 4°C. Nakon transporta u laboratorij, genomska DNA je izolirana iz leukocita uz pomoć seta za ekstrakciju (Nucleon II DNA extraction kit Scotlab, Coatbridge, Lanarkshire, UK) prema uputama proizvođača. Ekstrahirana DNA je pohranjena na -30°C. Korištene su PCR početnice namijenjene za amplifikaciju polimorfne regije (TA)<sub>n</sub> ponavljanja 1174 bp uzvodno mjesta početka prvog egzona humanog gena ER $\alpha$ . 5' početnica obilježena je fluorescentnom bojom cijaninom (Cy5), dok 3' početnica nije obilježena. Nakon amplifikacije, produkti PCR su podvrgnuti elektroforezi na gelu od 6% poliakrilamida u automatiziranom uređaju za sekvencioniranje (ALFexpress, Amersham Pharmacia). Određivanje alela učinjeno je pomoću računalnog programa AlleleLocator software (Amersham Pharmacia). Kod svih reakcija korištene su pozitivne kontrole koje sadrže genomsku DNA i negativne kontrole koje sadrže sve osim DNA.

Polimorfizam regije T/A ponavljanja ER $\alpha$  s obzirom na broj ponavljajućih T/A slijedova je podijeljen na kratke („S“ <19 T/A ponavljanja) i duge („L“  $\geq$ 19 T/A ponavljanja) polimorfizme. Prema navedenom, ispitanici su podjeljeni prema mogućim alelnim formama: SS, LL i SL.

#### 4.2.3. Analiza polimorfizma gena IL-6

Genomska DNA izolirana je iz leukocita periferne krvi uz pomoć „Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I“ (Roche, Germany) prema preporukama proizvođača. IL-6 -174 G>C genotipizacija učinjena je metodom PCR-RFLP koristeći primere (5'- TGA CTT CAG CTT TAC TCT TGT-3' ; 5'- CTG ATT

GGA AAC CTT ATT AAG- 3'). Amplifikacija je postignuta pomoću GeneAmp PCR sistema 9700 (Applied Biosystems, Foster City, USA) na slijedeći način: 94°C tijekom 10 min, nakon toga 30 ciklusa na 94°C tijekom 1 minute, 55°C tijekom 30 sekundi, 72°C tijekom 1 minute, i konačno 72°C tijekom 10 minuta. Fragmenti su odvajani elektroforezom na 2% agaroznom gelu koji sadržava ethidium bromid i vizualizirani pomoću UV svjetla. Ovisno o polimorfizmu IL-6, ispitanici su podjeljeni prema mogućim alelnim formama: GG, CC i CG.

#### 4.2.4. Plan istraživanja potomaka

Druga faza istraživanja uključila je potomke bolesnika s ranom koronarnom bolesti i ACS-om i dokazanim polimorfizmom ER $\alpha$  i/ili IL-6. U ovoj fazi ispitan je utjecaj polimorfizama ER $\alpha$  i IL-6 na endotelnu funkciju (FMD) kod potomaka. Isključni kriteriji za populaciju potomaka uključenih u ispitivanje bila je anamneza maligne ili autoimune bolesti, febrilnog stanja, izražena hipotenzija (sistolčki RR <90 mmHg) i nadomjesna hormonska terapija te dob manja od 6 godina.

#### 4.2.5. Metoda protokom posredovane dilatacije (od eng. *flow mediated dilatation-FMD*)

Svim uključenim potomcima učinjeno je ispitivanje endotelne (dis)funkcije FMD metodom u skladu s Europskim konsenzusom i smjernicama za FMD, koje su sažete u Tablici 1 (79). Korišten je ultrazvučni aparat Aloka alfa 10 i program za ispitivanje endotelne funkcije te linearna sonda frekvencije 12 mHz. Mjerenje je provedeno na desnoj brahijalnoj arteriji koja je prikazana u longitudinalnoj ravnini nekoliko centimetara iznad kubitalne jame. Za kontinuirano mjerenje promjera arterije korištena je „wall tracking“ metoda. Okluzija brahijalne arterije postignuta je manžetom tlakomjera i tlakom koji je 50 mmHg viši od aktualno izmjerenog sistoličkog tlaka u bazalnim uvjetima. Mjerenje promjera krvne žile praćeno je kontinuirano od početka testa do tri minute nakon deflacije manžete.



FMD je izražen kao postotak maksimalne post-okluzijske promjene promjera arterije u odnosu na bazični promjer.

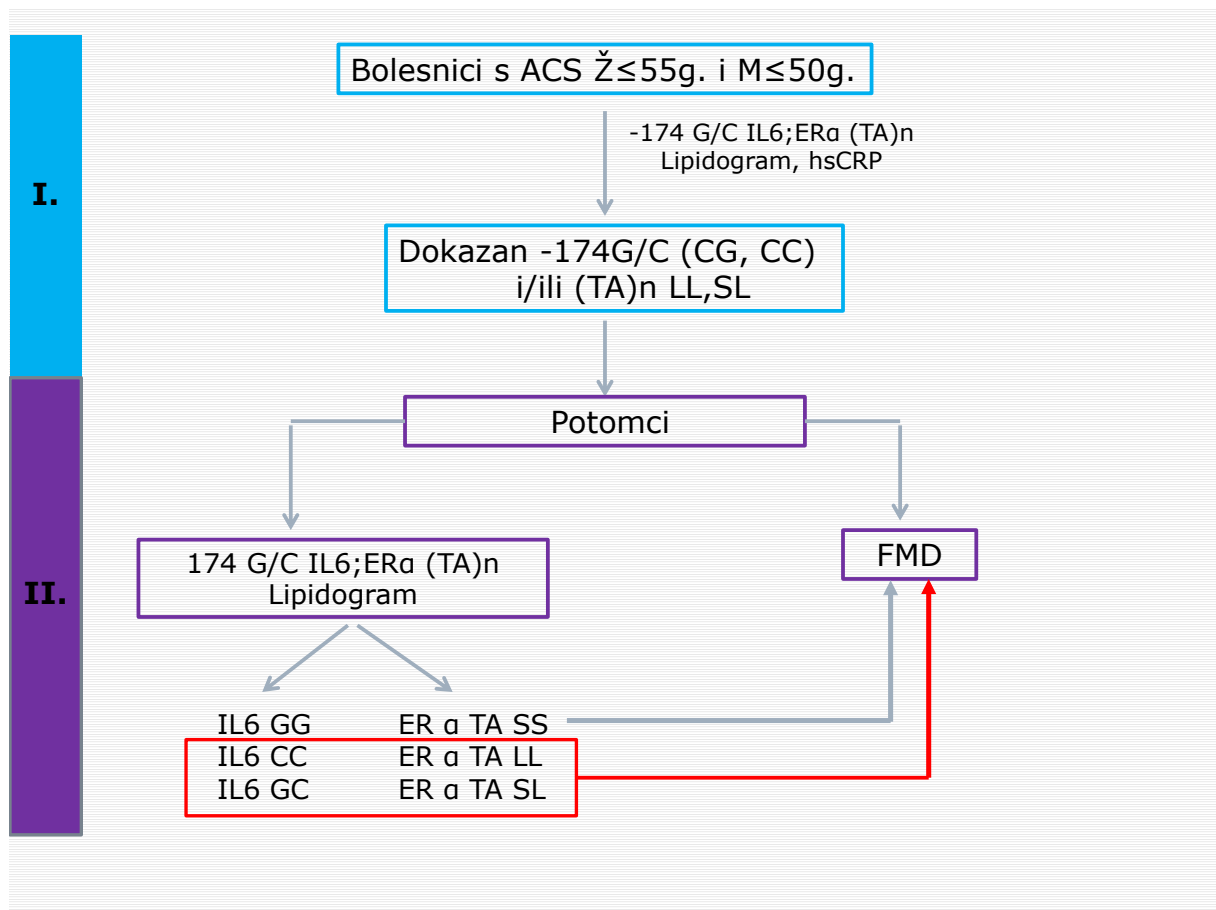
Shema istraživanja prikazana je na Slici 8.

Tablica 1. Preporuke za izvođenje FMD-a

<b>Metodološke i tehnološke smjernice</b>	<b>Potrebno</b>
Priprema ispitanika	1
Odmor u tihoj zamračenoj sobi 10-15 minuta prije testa	1
Ležeći položaj (tj. snimljena arterija bi trebala biti oko razine srca)	1
Vrijeme testiranja mora biti standardizirano kako bi se izbjegle dnevne varijacije, testovi se moraju provesti u slično doba dana	2
Subjekti moraju biti natašte $\geq 6$ h	2
Izbjegavati tjelovježbu $\geq 24$ h, alkohol ili hranu/pića koja sadrže kofein ili su bogata polifenolima $\geq 12$ h	2
Bez pušenja ili konzumiranja duhana prije mjerenja ( $>6$ h)	2
Potrebno je pažljivo uzeti anamnezu u vezi s korištenjem/vremenskim rasporedom bilo kojeg lijeka. Može biti potrebno ukidanje nekog lijeka no to nije uvijek izvedivo.	2
Žene u predmenopauzi treba procijeniti u standardiziranom dijelu menstrualnog ciklusa.	2
<b>Protokol</b>	
Bazalni promjer mora se ispitati prije napuhavanja manžete u trajanju od $>30$ s	1
Potrebno je izraziti apsolutni bazalni promjer u rezultatima	1
Manžeta mora biti postavljena distalno od arterije koja se snima, s tlakom u manžeti $>50$ mmHg sistoličkog tlaka i napuhanom 5 min	1
Promjer nakon ispuhivanja mora se kontinuirano pratiti 3 minute nakon ispuhivanja	1
Treba testirati endotel-neovisnu vazodilataciju i navesti dozu gliceril-trinitrata	1
Preporuča se primjera 25 mcg gliceril-trinitrata.	3

<b>Tehnika</b>	
Kontinuirano mjerenje brzine i promjera koristeći simultani live duplex ultrazvuk	1
Treba koristiti slike B-moda s linearnom sondom od $\geq 7,5$ MHz. Treba koristiti najviši dostupni MHz, obzirom na dubinu tkiva.	1
Brzina protoka treba biti procijenjena pomoću insonacije jednake 60-70 stupnjeva ili manje	1
Koristiti isti kut za brzinu protoka unutar isti studije.	1
<b>Analiza</b>	
Koristiti kontinuirano otkrivanje rubova i software za praćenje zidova krvne žile	1
Automatizirani matematički algoritmi trebaju se koristiti za izračunavanje najvećeg promjera	1
Izraziti bazalni promjer	1
Izraziti FMD odgovor u apsolutnoj (mm) i relativnoj (%) promjeni	1
Izraziti relevantnu stopu sile smicanja	2
Off-line analizu treba izvesti "slijepi" promatrač	3
<b>Faktori ovisni o ispivaču</b>	
Dostatna obuka ultrasoničara (preporučena razina reproducibilnosti: $< 2\%$ varijacije u promjeru, $< 15\%$ varijacija u FMD-u u konsektivnim mjerenjima)	1
Održavanje iskustva ultrasoničara	1
Za manje iskusne laboratorije preporučuje se sterotaktički držač sonde	2

\*Razina preporuke 1- obavezno, 2- visoko preporučeno, 3- preporučuje se kada je moguće



Slika 8. Shema istraživanja

#### 4.2.6. Statistička analiza

Svi podaci analizirani su statističkim programom R package (R Development Core Team 2006). U univarijatnoj analizi, za usporedbu kontinuiranih varijabli korišten je neparametrijski Mann-Whitney U test, dok su kategorijske varijable uspoređivane uz pomoć X<sup>2</sup> ili fisher-exact testa.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Karakteristike bolesnika s ranom koronarnom bolešću

U studiju je između lipnja 2013. i srpnja 2019. uključeno 73 odraslih bolesnika s ranom koronarnom bolesti: 48 muškaraca i 25 žena. Medijan dobi muških bolesnika bio je 44 godine (raspon 33-50), a medijan dobi ženskih bolesnika bio je 49 godina (raspon 40-53). Karakteristike studijske populacije su prikazane u Tablici 2. Uključeni su bolesnici imali medijan sistoličkog tlaka 130 mm Hg (raspon 105-192), a medijan dijastoličkog tlaka 82 (raspon 60-110). Šezdeset dva bolesnika (85%) su bili pušači, njih 14 (19%) je imalo šećernu bolest, obiteljska anamneza je bila pozitivna na koronarnu bolest u 48 bolesnika (66%). Medijan vrijednosti ukupnog kolesterola bio je 4.8 mmol/L (raspon, 2.5-9.6), medijan vrijednosti LDL-a bio je 2.9 mmol/L (raspon, 1.4-8.15), medijan vrijednosti HDL-a 1.0 mmol/L (raspon, 0.55-2.15), a medijan vrijednosti triglicerida 1.6 mmol/L (raspon, 0.62-12.2). Medijan vrijednosti CRP-a je bio 3.3 mg/L (raspon, 0.3-210).

Tablica 2. Karakteristike studijske populacije bolesnika

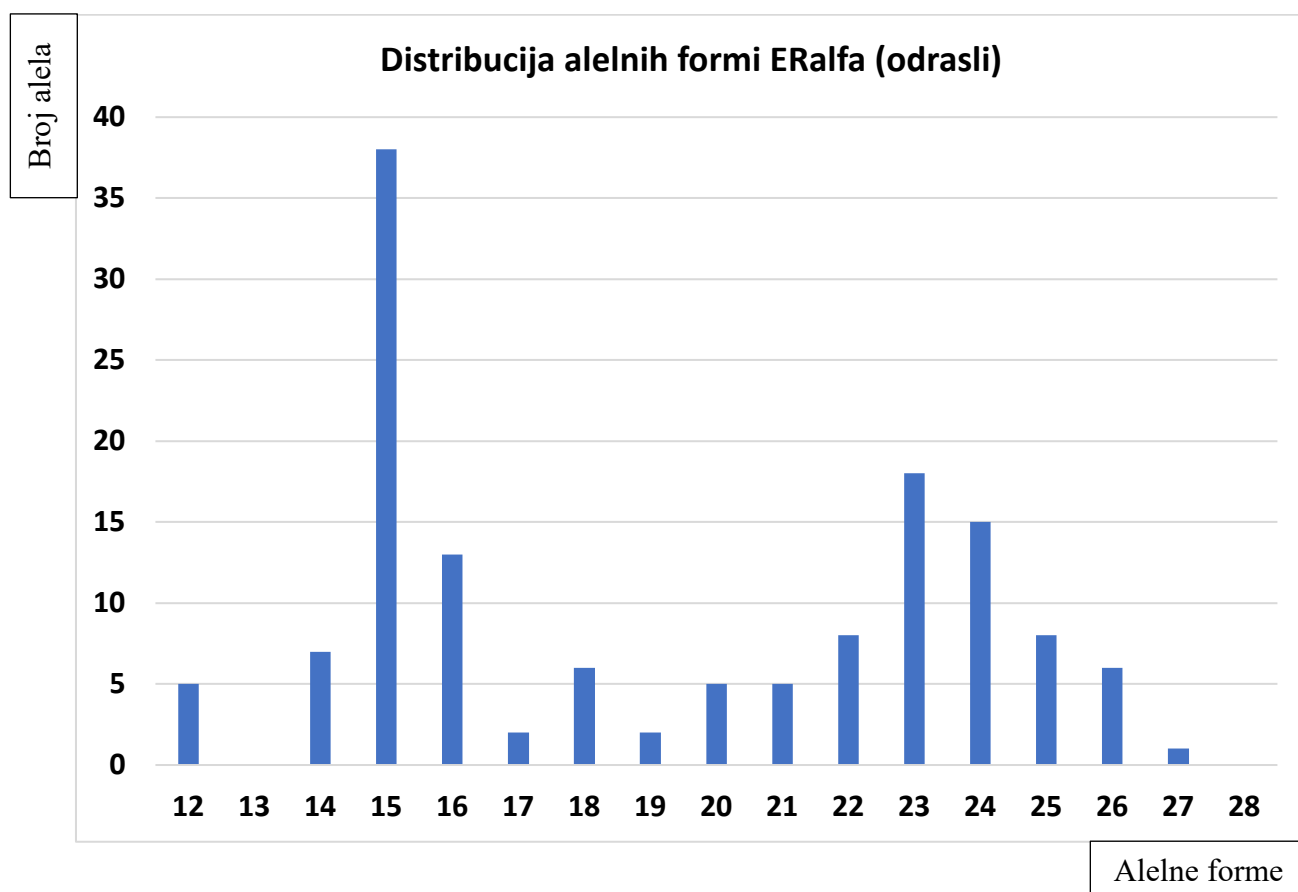
Broj roditelja (n)	73
Spol	25 žena , 48 muškaraca
Dob (godine)	Ž 49 (40-53), M 44 (33-50)
Sistolički tlak (mmHg)	130 (105-192)
Dijastolički tlak (mmHg)	82 (60-110)
Pušači (n;%)	62 (85%)
DM (n;%)	14 (19%)
Obiteljska anamneza (n; %)	48 (66%)
Ukupni kolesterol (mmol)	4.8 (2.5–9.6)
LDL (mmol/L)	2.9 (1.4-8.15)
HDL (mmol/L)	1.0 (0.55-2.15)
Trigliceridi (mmol/L)	1.6 (0.62-12.2)
CRP (mg/L)	3.3 (0.3-210)

## 5.2. Polimorfizam gena estrogenskog receptora alfa u bolesnika s ranom koronarnom bolešću

Distribucija broja ponavljajućih T/A slijedova je prikazana na Slici 9. Vidljiva su dva „vrška“, na 15 i 23 ponavljanja. Bolesnici su podijeljeni na one s „dugom“ alelnom formom genotipa ER $\alpha$  (oba alela  $\geq$  19 ponavljanja; „LL“ od eng. *long-long*; n=17, 23%), one s „kratkom“ alelnom formom genotipa ER $\alpha$  (oba alela <19 ponavljanja; „SS“ od eng. *short-short*; n=17, 23%), i one s „mješovitom“ alelnom formom genotipa ER $\alpha$  (jedan kratki i jedan dugi alel; „SL“ od eng. *short-long*; n=39, 54%) (Tablica 3.) Genotip ER $\alpha$  s barem jednom dugom alelnom formom (LL + SL alelna forma) je pronađena u 56 (77%) bolesnika s ranom koronarnom bolešću.

Nije bilo statistički značajne razlike u medijanu dobi između tri genotipske skupine ER $\alpha$ , prevalenciji pušača, bolesnika sa šećernom bolešću i vrijednostima

krvnog tlaka (Tablica 4). Također nije bilo statistički značajne razlike u medijanu vrijednosti ukupnog kolesterola, LDL-a, HDL-a, triglicerida (Slike 10-13) između tri genotipske skupine  $ER\alpha$ , kao ni CRP-a (nije prikazano,  $p=0.92$ ). No, kada smo populaciju podijelili na žene i muškarce, nije bilo statistički značajne razlike u medijanu vrijednosti ukupnog kolesterola, LDL-a, HDL-a i triglicerida u ženskih ispitanika (Slike 14-17) dok je u muških postojao trend viših vrijednosti triglicerida i nižih vrijednosti HDL-a u onih s „kratkom“ alelnom formom genotipa  $ER\alpha$  (Slike 18- 21).



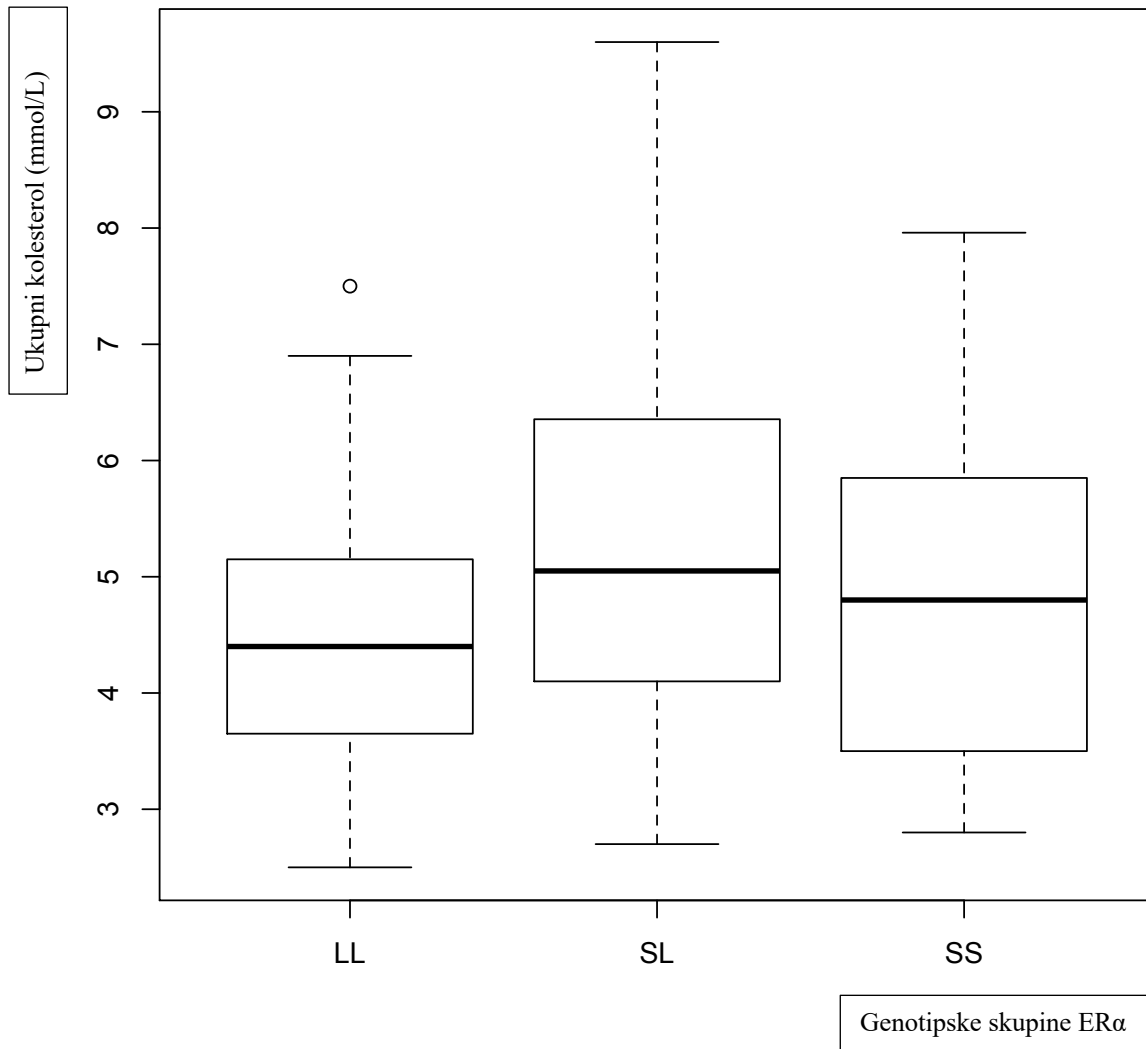
Slika 9. Distribucija alelnih formi  $ER\alpha$  u bolesnika s ranom koronarnom bolešću

Tablica 3. Polimorfizam ER $\alpha$  u bolesnika s ranom koronarnom bolešću

Broj bolesnika s barem jednom dugom alelnom formom ER $\alpha$ n (%)	56 (76.7%)	M 38 (83%)	Ž 18 (67%)
SS n (%)	17 (23.3%)	8 (17%)	9 (33%)
SL n (%)	39 (53.4%)	28 (61%)	11 (41%)
LL n (%)	17 (23.3%)	10 (22%)	7 (26%)

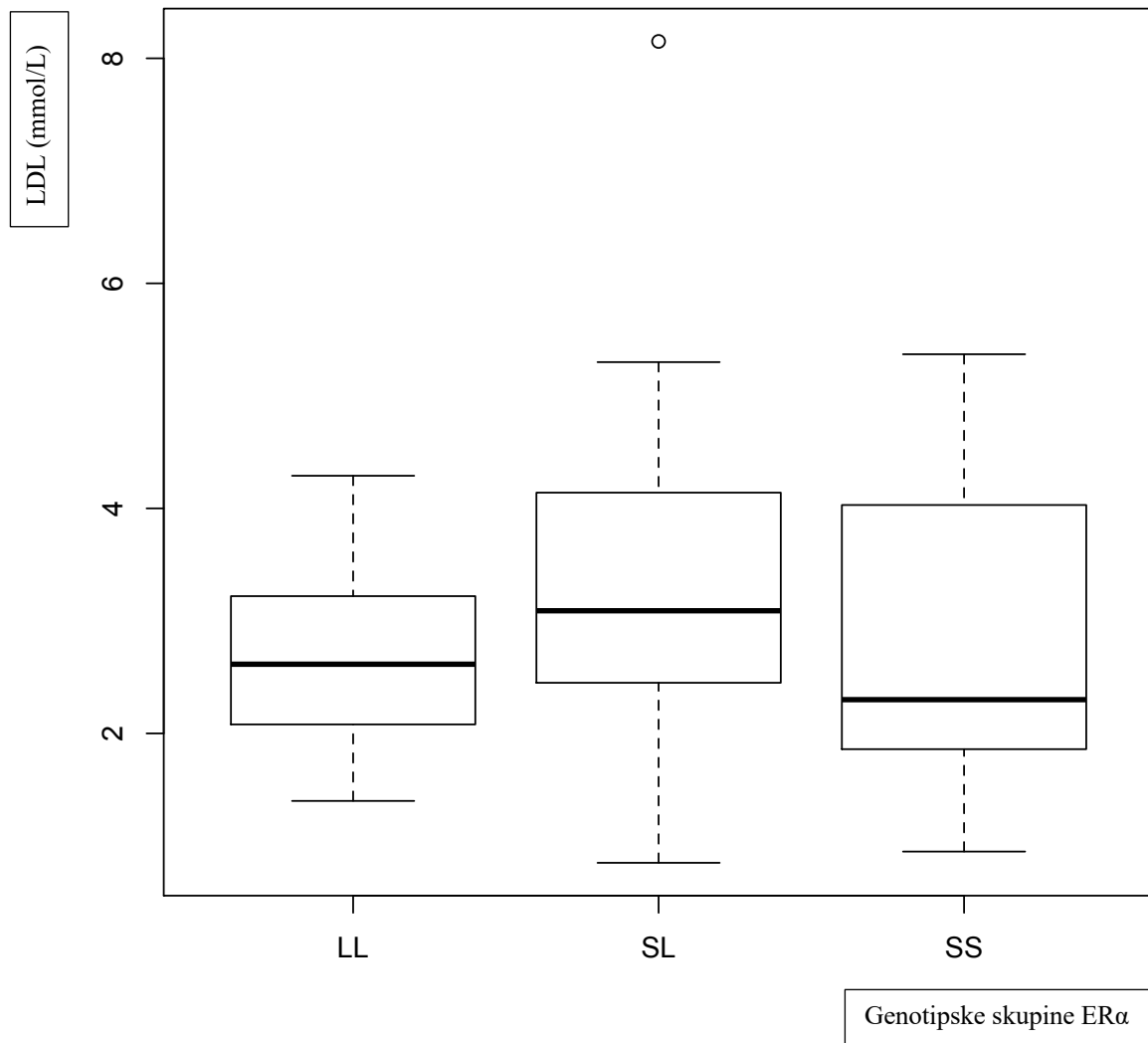
Tablica 4. Kliničke karakteristike tri genotipske skupine polimorfizma ER $\alpha$

	SS	SL	LL	p
Muško/žensko n (%)	8 / 9 (47%/53%)	28/ 11 (72%/28%)	10/7 (59%/41%)	0.19
Dob	44 (36-53)	46 (35-53)	45 (37-51)	0.61
Sistolički tlak (mmHg)	130	130	135	0.86
Dijasatolički tlak (mmHg)	90	80	80	0.47
Šećerna bolest n (%)	3 (18%)	11(28%)	0	0.04
Pušenje n (%)	11 (65%)	32 (82%)	16 (94%)	0.15
Obiteljska anamneza n (%)	10 (59%)	27 (69%)	11 (65%)	0.79

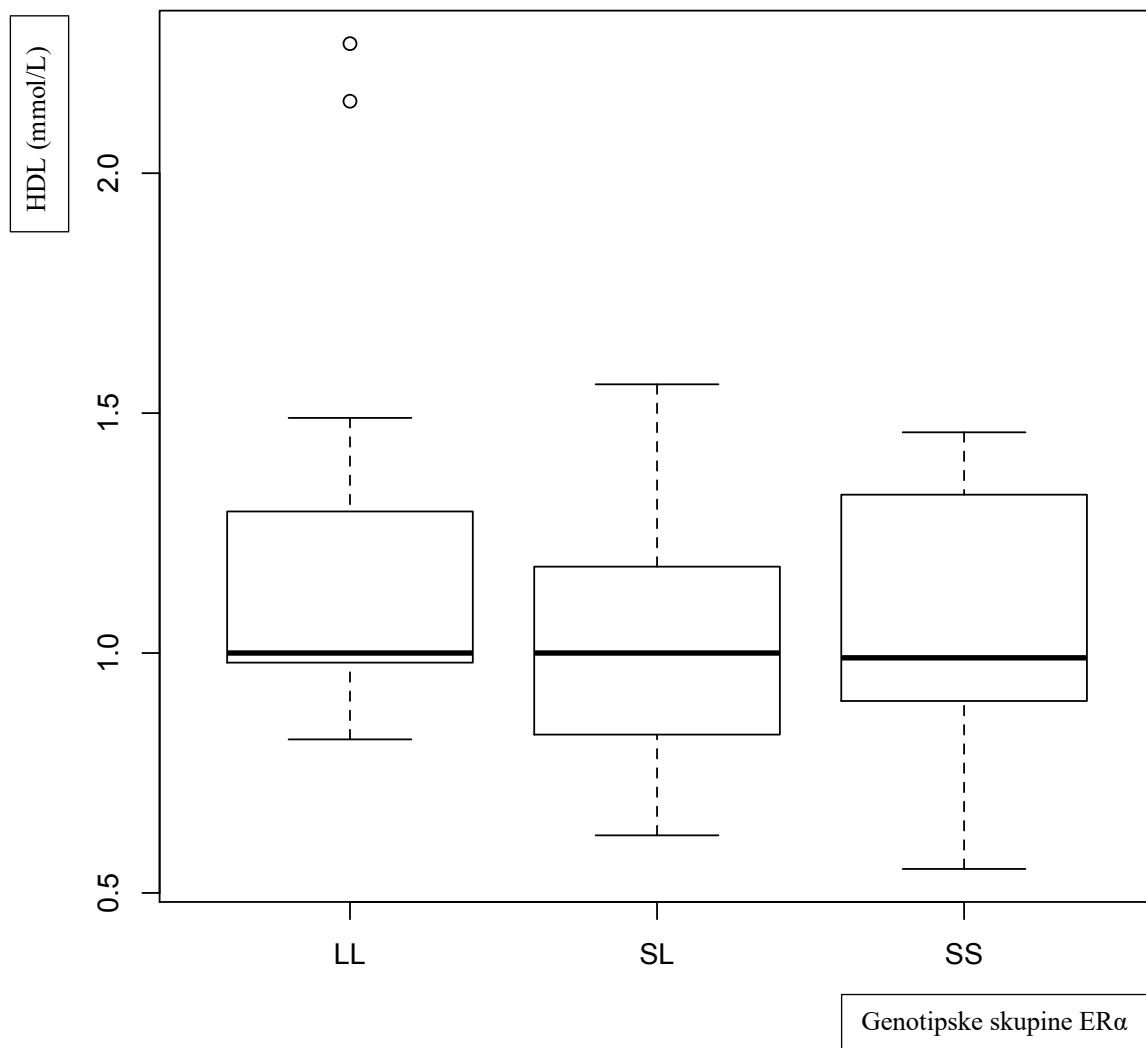


Slika 10. Vrijednosti ukupnog kolesterola u odnosu na genotipske skupine ER $\alpha$ ; medijan, raspon; SS 4.80 (2.80-7.96), SL 5.05 (2.70-7.10), LL 4.40 (2.50-7.50); p=0.52

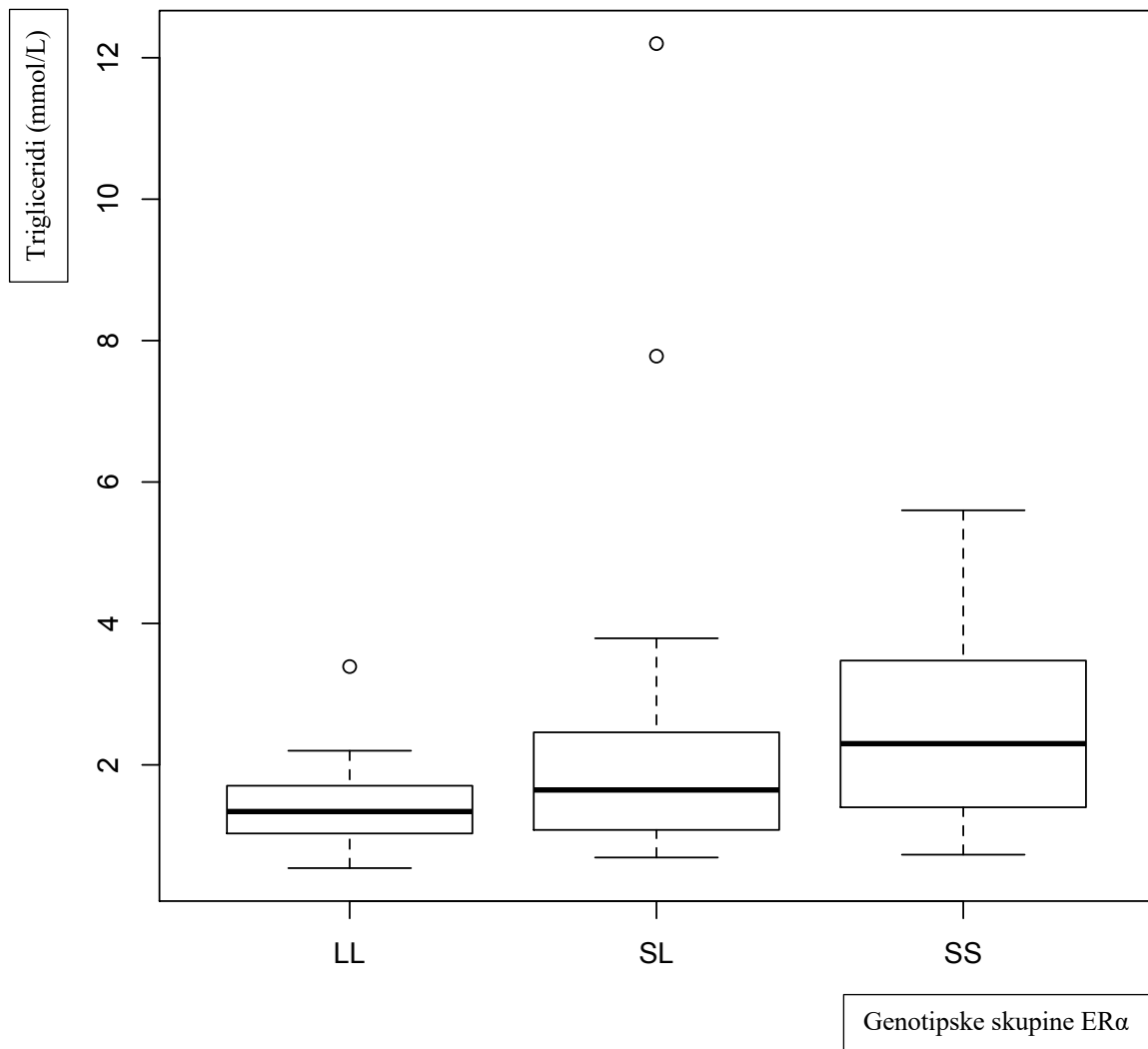




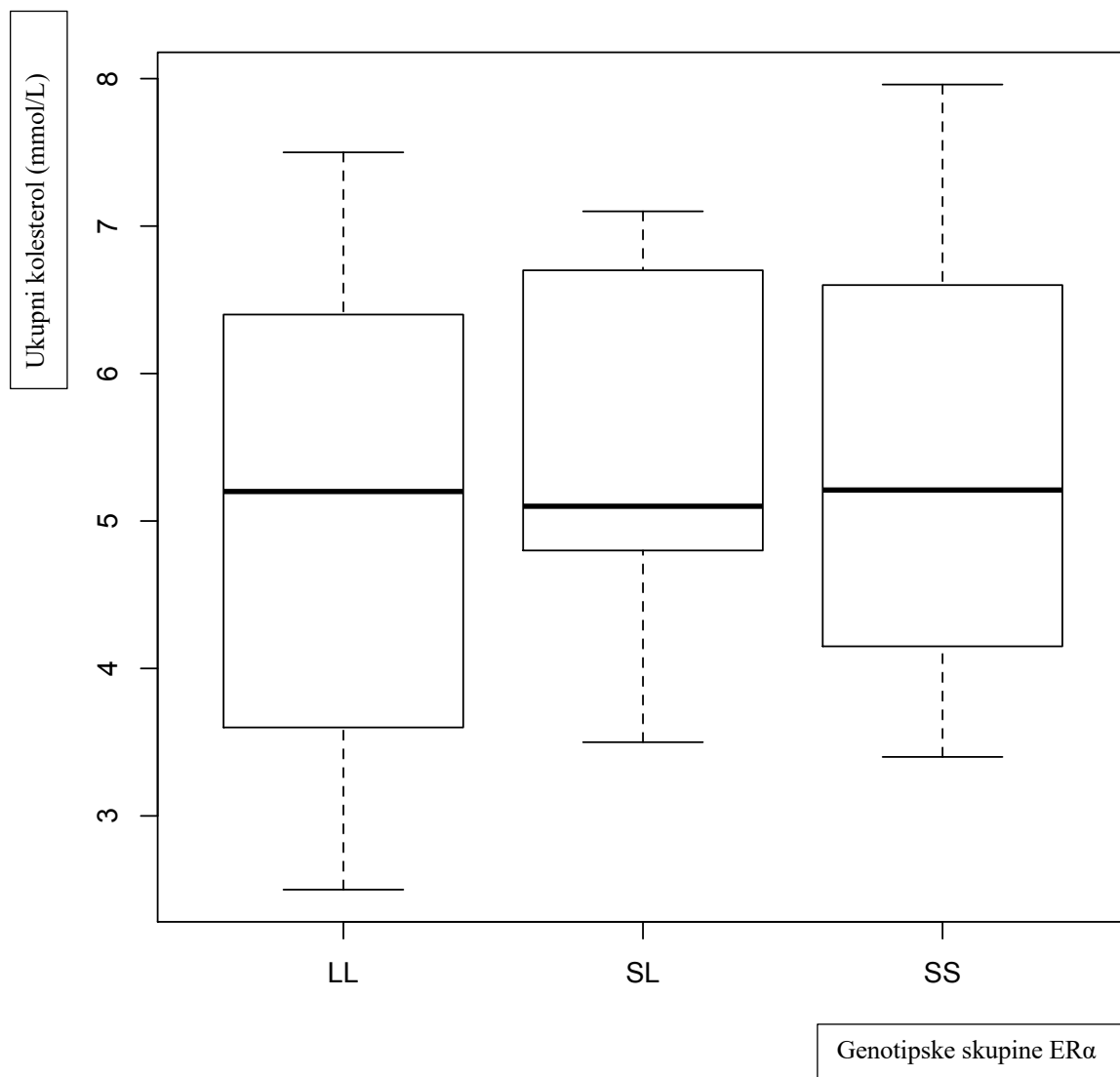
Slika 11. Vrijednosti ukupnog LDL-a u odnosu na genotipske skupine ERα; medijan, raspon; SS 2.30 (0.95-5.37), SL 3.09 (0.85-8.15), LL 2.62 (1.40-4.29) p=0.27



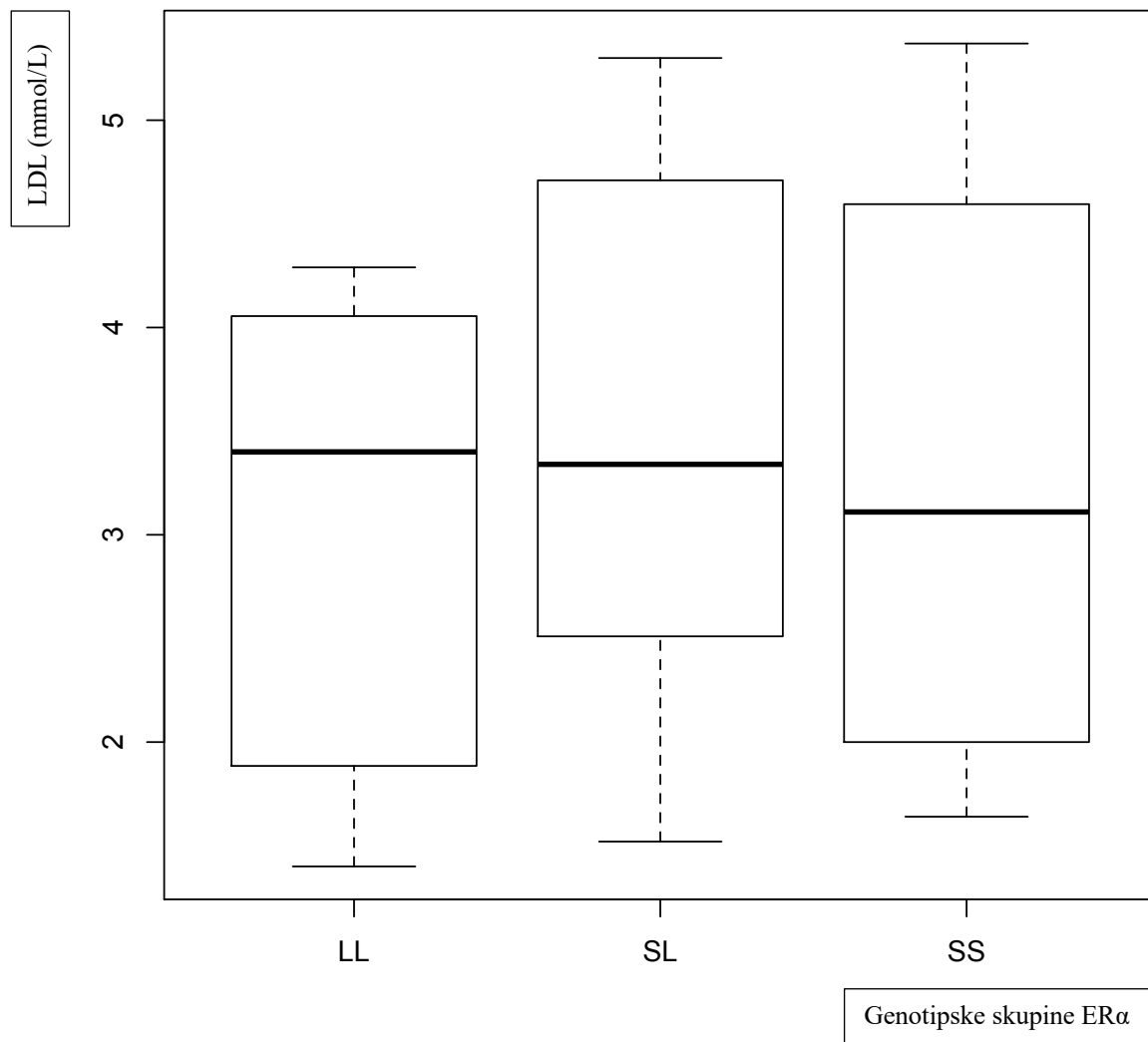
Slika 12. Vrijednosti ukupnog HDL-a u odnosu na genotipske skupine ERα; medijan, raspon; SS 0.99 (0.78-1.46); SL 1.00 (0.62-1.56), LL 1.0 (0.44-2.27), p=0.49



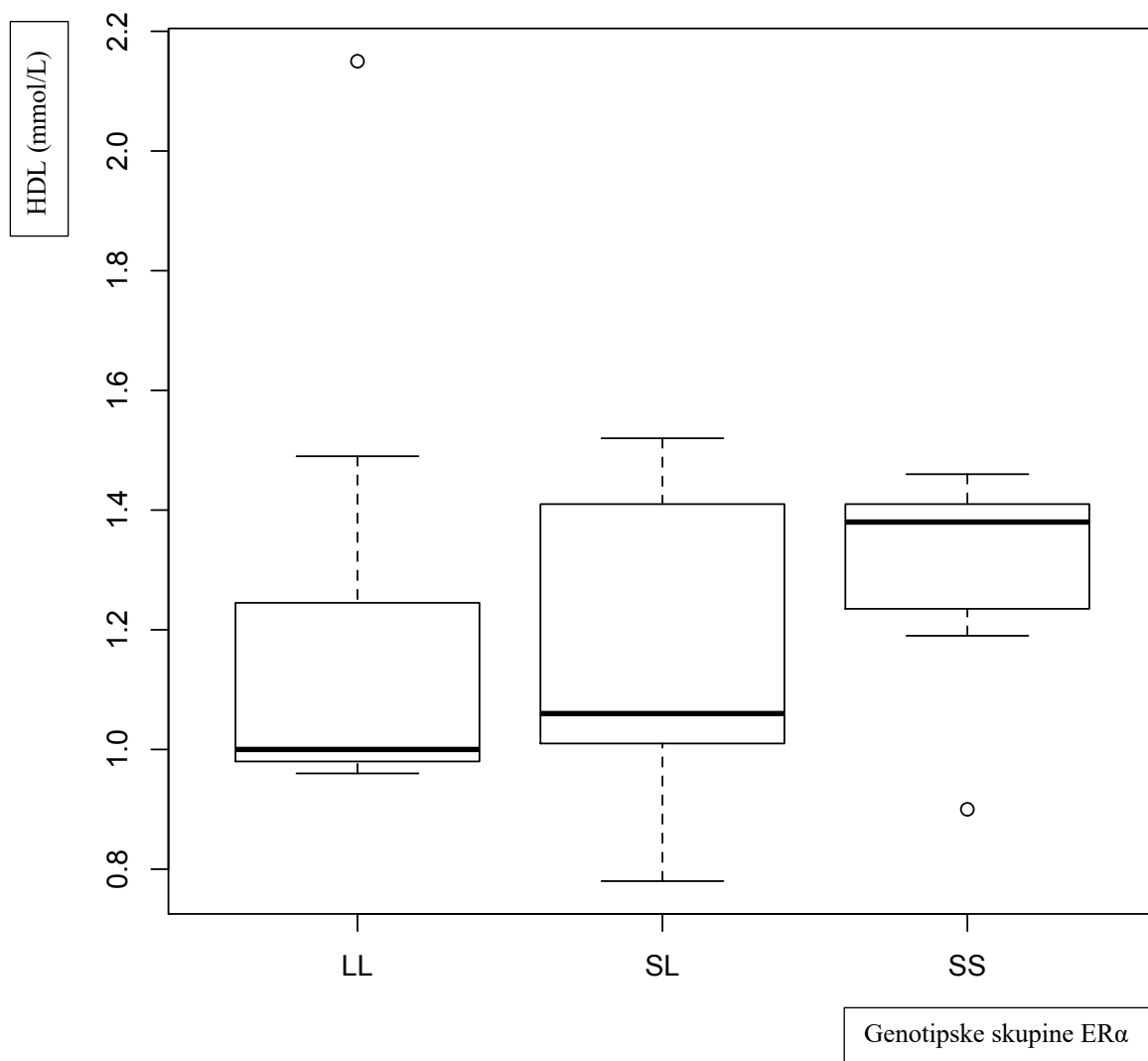
Slika 13. Vrijednosti triglicerida u odnosu na genotipske skupine ERα; medijan, raspon; SS 2.30 (0.73-5.60), SL 1.65 (0.54-2.20), LL 0.69 (1.34-12.20); p=0.11



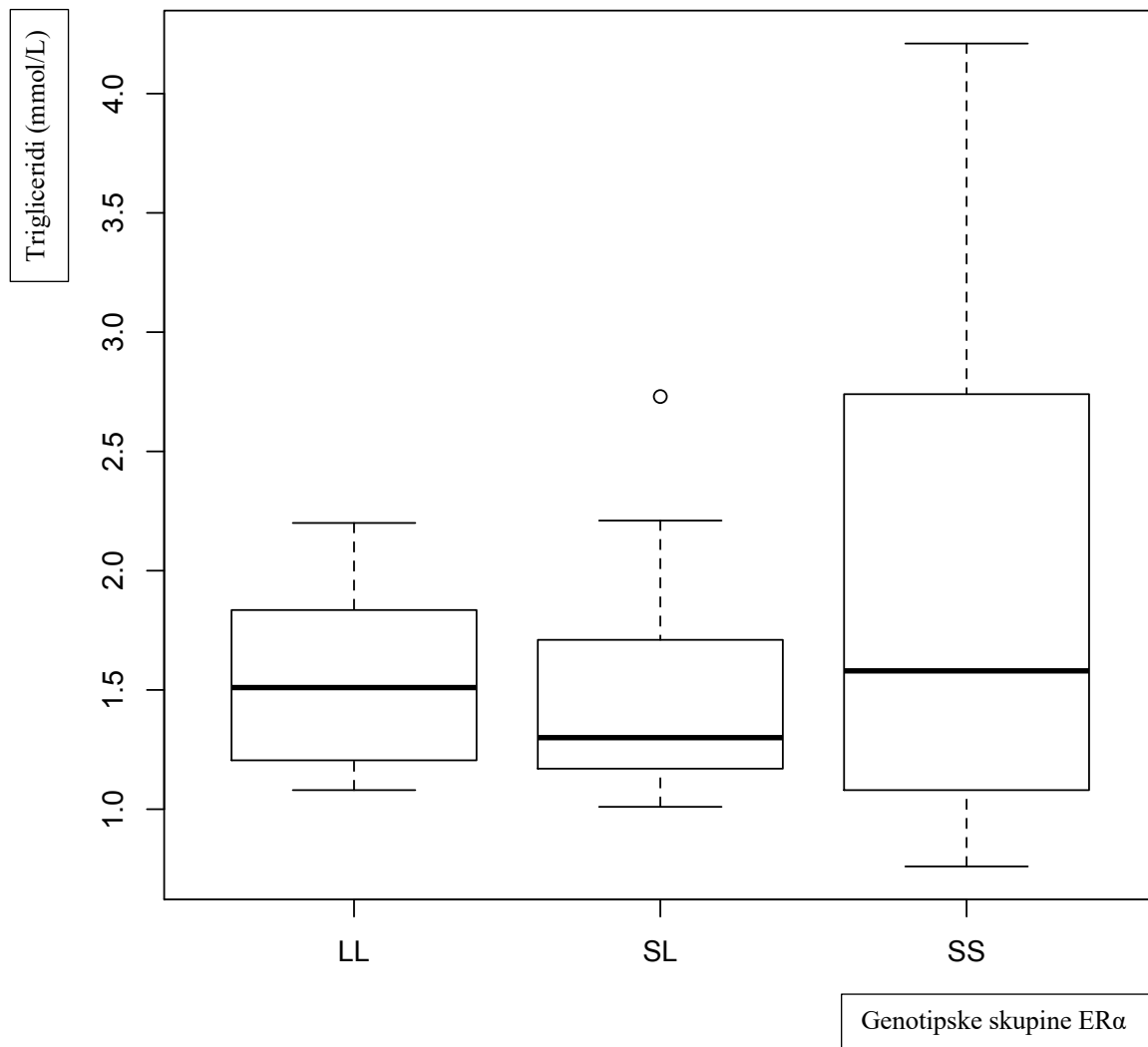
Slika 14. Vrijednosti ukupnog kolesterola u odnosu na genotipske skupine ER $\alpha$  u ženskih bolesnika; medijan, raspon; SS 5.21 (3.40-7.50), SL 5.10 (3.50-7.10), LL 5.20 (2.50-7.50); p=0.91



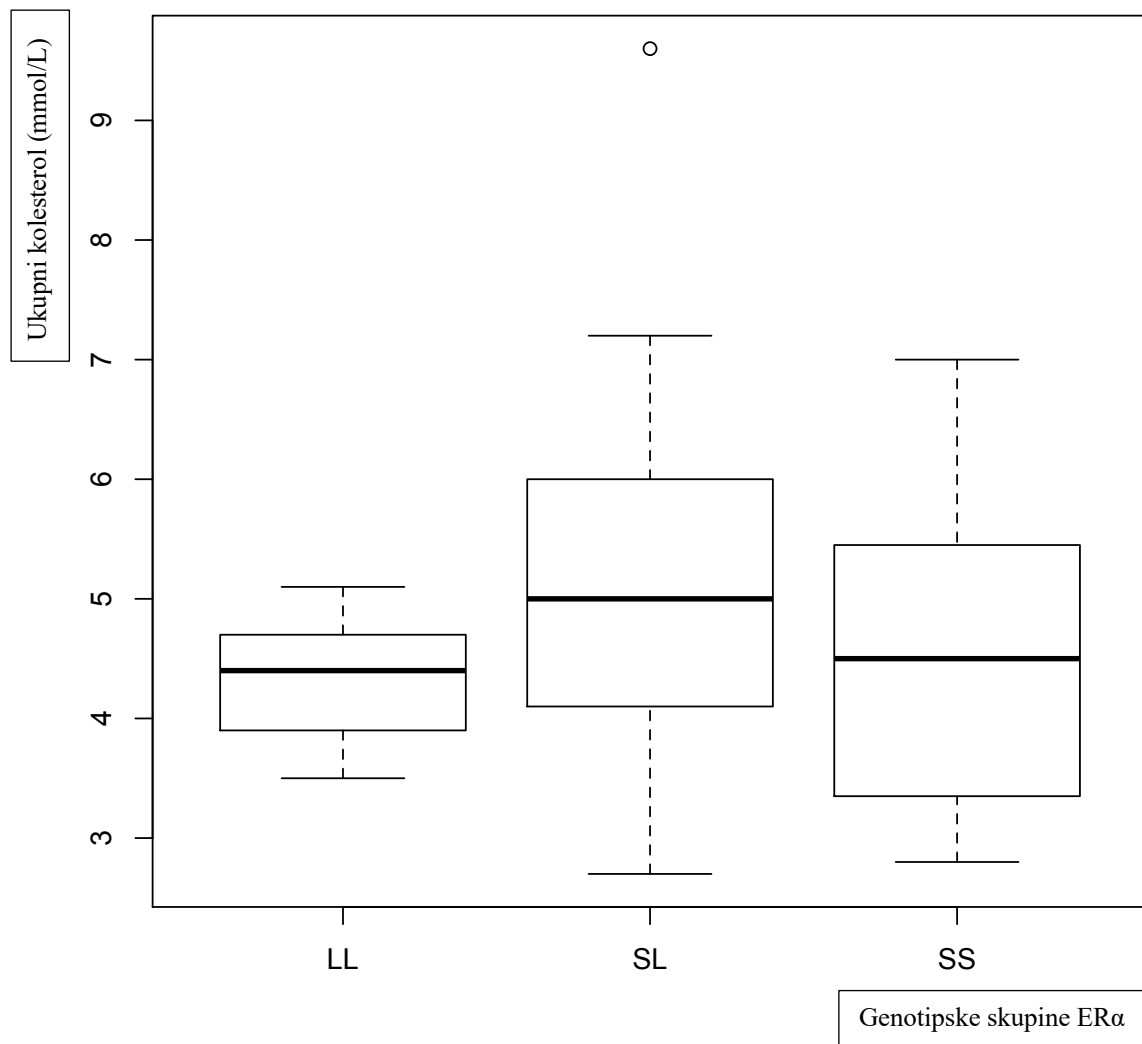
Slika 15. Vrijednosti LDL-a u odnosu na genotipske skupine ER $\alpha$  u ženskih bolesnika; medijan, raspon; SS 3.11 (1.70-5.37), SL 3.34 (1.52-5.30), LL 3.40 (1.40-4.29); p=0.67



Slika 16. Vrijednosti HDL-a u odnosu na genotipske skupine ER $\alpha$  u ženskih bolesnika; medijan, raspon; SS 1.38 (0.90-1.46), SL 1.06 (0.78-1.52), LL 1.00 (0.96-2.15); p=0.65

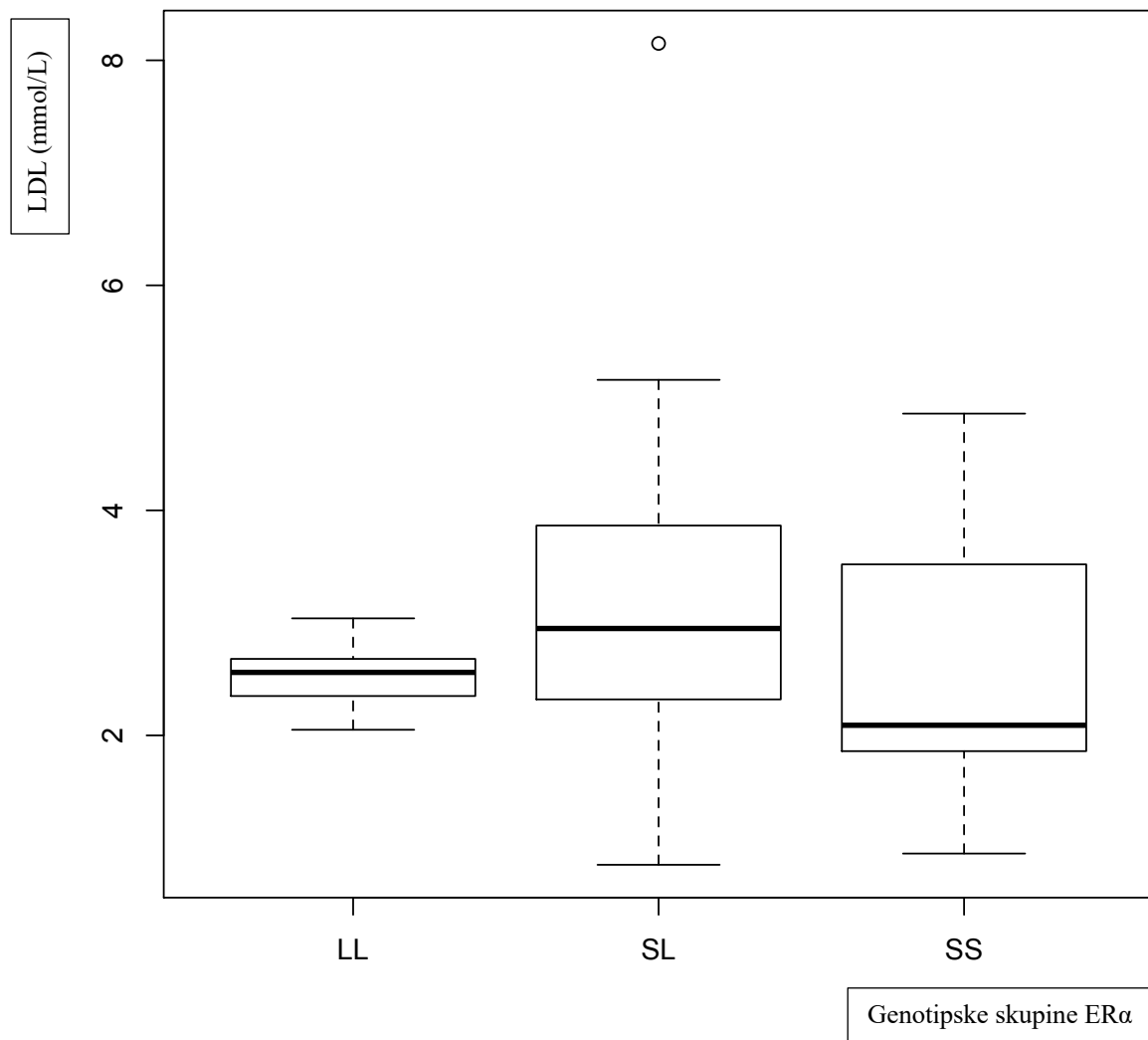


Slika 17. Vrijednosti triglicerida u odnosu na genotipske skupine ERα u ženskih bolesnika; medijan, raspon; SS 1.58 (3.40-7.50), SL 1.30 (1.01-2.73), LL 1.51 (1.08-2.20); p=0.85

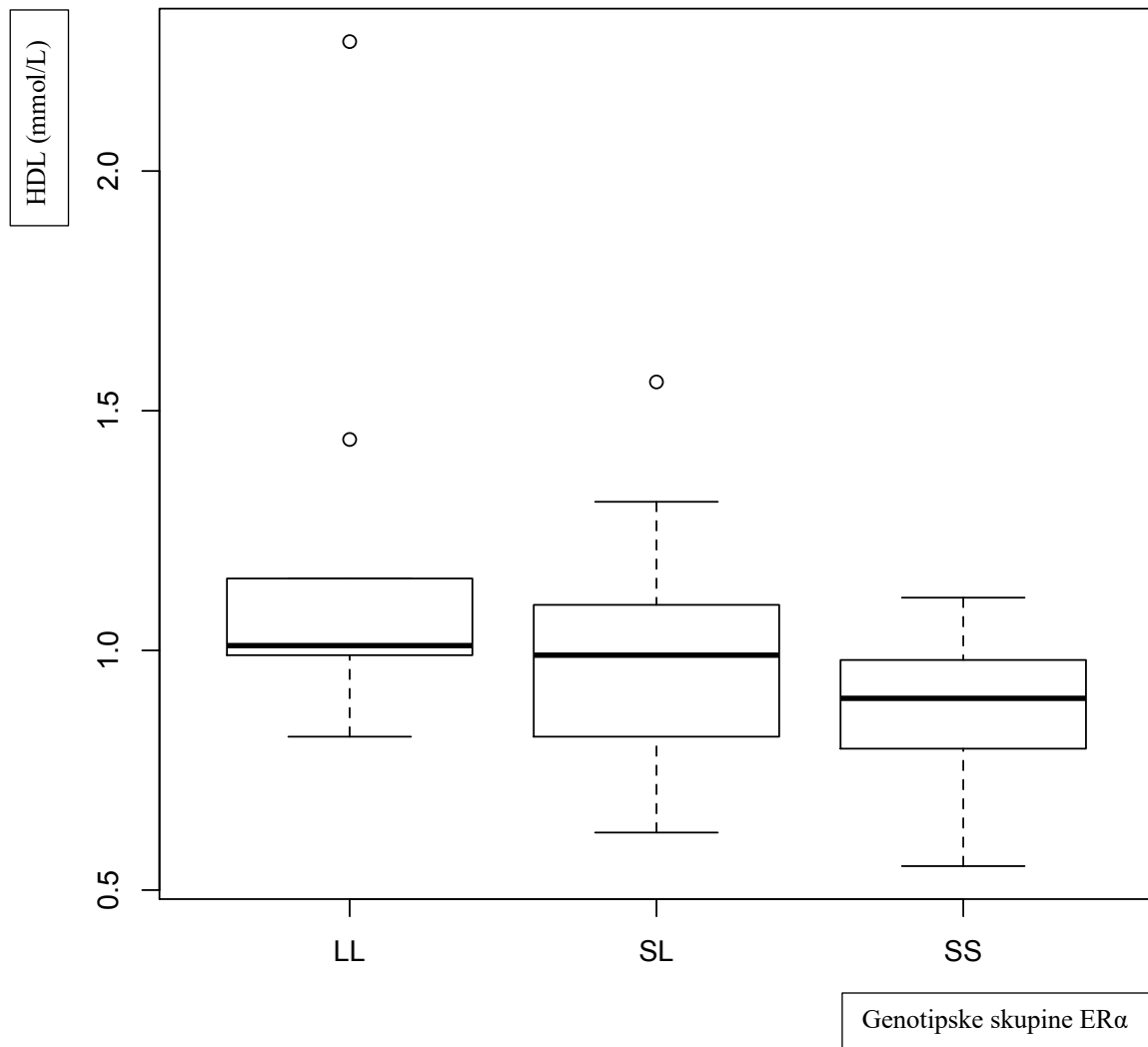


Slika 18. Vrijednosti ukupnog kolesterola u odnosu na genotipske skupine ERα u muških bolesnika; medijan, raspon; SS 4.50 (2.80-7.00), SL 5.00 (2.70-7.20), LL 4.40 (3.60-5.10); p=0.39

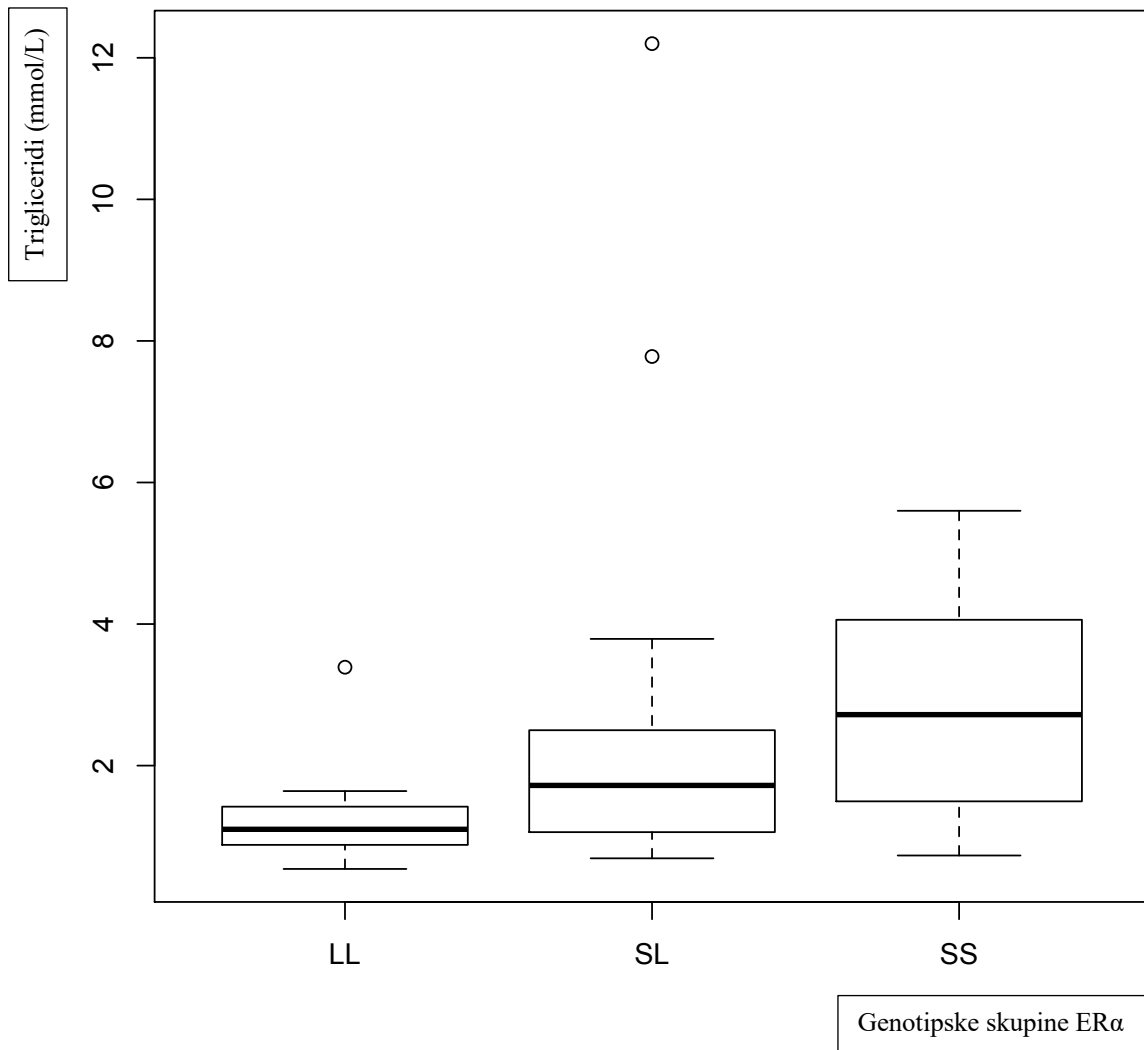




Slika 19. Vrijednosti LDL-a u odnosu na genotipske skupine ER $\alpha$  u muških bolesnika; medijan, raspon; SS 2.09 (0.95-4.86), SL 2.95 (0.85-5.16), LL 2.56 (2.05-3.04); p=0.19



Slika 20. Vrijednosti HDL-a u odnosu na genotipske skupine ER $\alpha$  u muških bolesnika; medijan, raspon; SS 0.90 (0.78-1.11), SL 0.99 (0.62-1.56), LL 1.01 (0.82-2.27); p=0.09



Slika 21. Vrijednosti triglicerida u odnosu na genotipske skupine ERα u muških bolesnika; medijan, raspon; SS 2.72 (0.73-5.60), SL 1.72 (0.69-12.20), LL 1.10 (0.54-3.39); p=0.05

### 5.3. Polimorfizam gena IL-6 u bolesnika s ranom koronarnom bolešću

Mutacija IL-6 je pronađena u 41 (56%) bolesnika s ranom koronarnom bolešću. Među njima, 28 bolesnika bilo je s GC heterozigotnom alelnom formom (38%), 13 bolesnika s CC homozigotnom alelnom formom (18%), dok je 32 bolesnika imalo divlji tip, odnosno GG alelnu formu (44%) (Tablica 5).

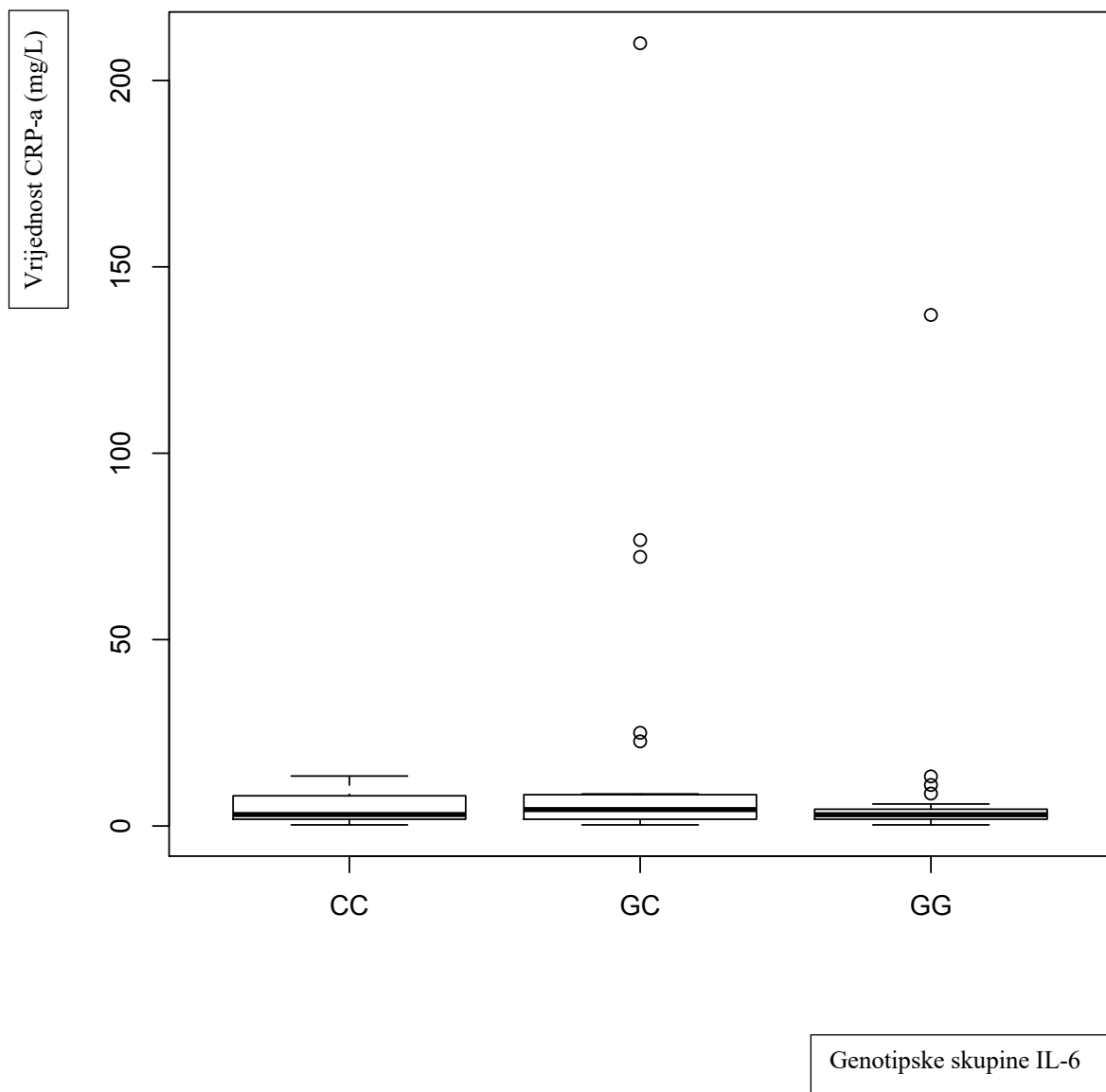
Nije bilo statistički značajne razlike u medijanu dobi između tri genotipske skupine, prevalenciji pušača, bolesnika sa šećernom bolešću i vrijednostima krvnog tlaka (Tablica 6). Također, nije bilo statistički značajne razlike u medijanu vrijednosti ukupnog kolesterola, LDL-a, HDL-a, triglicerida (nije prikazano), kao ni CRP-a između 3 genotipske skupine (Slika 22).

Tablica 5. Polimorfizam IL-6 u bolesnika s ranom koronarnom bolešću

Broj bolesnika s mutacijom IL-6 n (%)	41 (56.2%)
GG n (%)	32 (43.8%)
GC n (%)	28 (38.4%)
CC n (%)	13 (17.8%)

Tablica 6. Kliničke karakteristike bolesnika tri genotipskih skupina polimorfizma IL-6

	GG	GC	CC	p
Muško/žensko n (%)	22/10 (69%/31%)	15/13 (53%/47%)	9/4 (69%/31%)	0.43
Dob	44 (35-53)	46 (36-53)	45 (41-52)	0.38
Sistolički tlak mmHg	132	130	127	0.95
Dijastolički tlak mmHg	82	80	86	0.96
Šećerna bolest n (%)	7 (22%)	3 (11%)	4 (31%)	0.26
Pušenje n (%)	23 (72%)	25 (89%)	12 (92%)	0.05
Obiteljska anamneza n (%)	23 (72%)	19 (68%)	6 (46%)	0.33



Slika 22. Vrijednost CRP-a u odnosu na genotipske skupine IL-6; medijan, raspon; GG 3.03 (0.30-137.10), GC 4.40 (0.30-76.70), CC 3.07 (0.30-13.40);  $p=0.38$

#### 5.4. Karakteristike potomaka bolesnika s ranom koronarnom bolešću

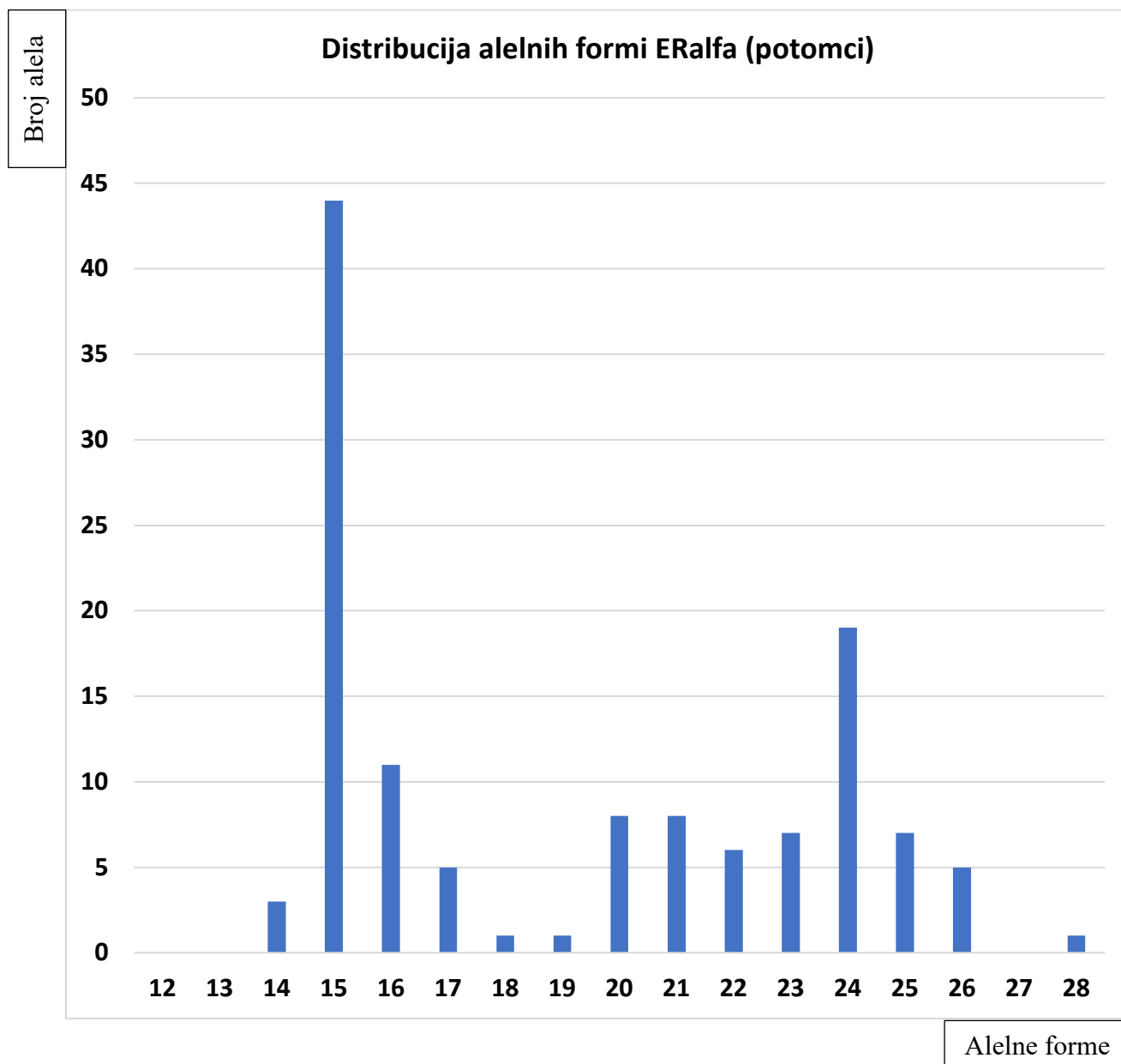
U studiju je potom uključeno 68 potomaka opisanih bolesnika s ranom koronarnom bolešću, od toga 35 ženskih i 33 muških potomaka. Medijan dobi je bio 16 godina i to u ženskih potomaka 15 godina a u muških potomaka 18 godina. U potomaka je također učinjena genetska analiza polimorfizama ER $\alpha$  i IL-6, te je kod svih učinjen i FMD.

#### 5.5. Polimorfizam gena estrogenskog receptora alfa u potomaka bolesnika s ranom koronarnom bolešću

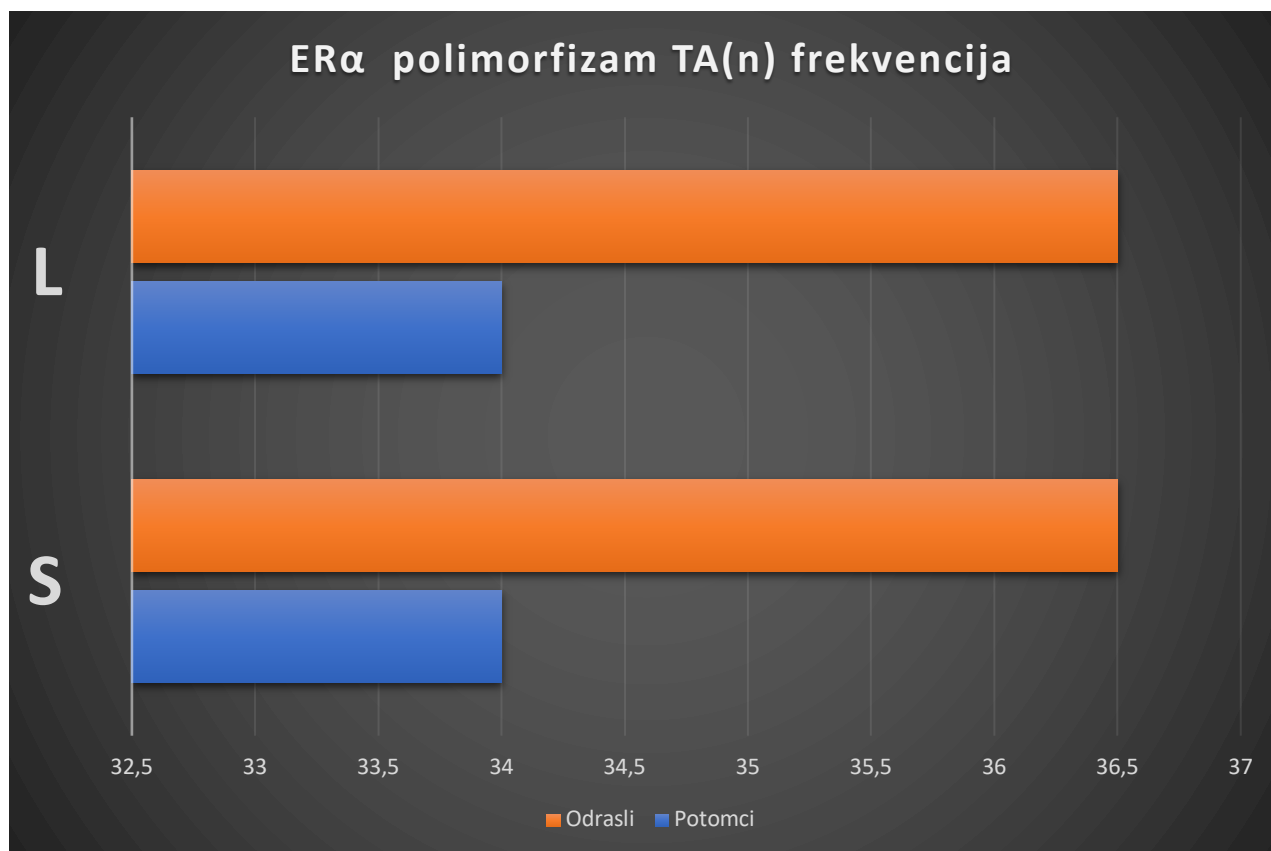
Distribucija broja ponavljajućih T/A slijedova je prikazana na Slici 23. Nađena su dva „vrška“, na 15 i 24 ponavljanja. Potomci su, kao i roditelji, podijeljeni na one s „dugom“ alelnom formom genotipa ER $\alpha$  (oba alela  $\geq 19$  ponavljanja; „LL“ od eng. *long-long*; n=15, 22%), one s „kratkom“ alelnom formom genotipa ER $\alpha$  (oba alela  $< 19$  ponavljanja; „SS“ od eng. *short-short*; n=15, 22%), te one s „mješovitom“ alelnom formom genotipa ER $\alpha$  (jedan kratki i jedan dugi alela; „SL“ od eng. *short-long*; n=38, 56%). Genotip ER $\alpha$  s barem jednim dugim alelom (LL+SL) je pronađena u 53 (78%) potomaka bolesnika s ranom koronarnom bolešću.

Usporedba alelnih frekvencija ER $\alpha$  odraslih i potomaka prikazana je na Slici 24: S ( $< 19$  TA ponavljanja) imalo je 50% bolesnika i 50% potomaka, a L ( $\geq 9$  ponavljanja) također 50% bolesnika i 50% potomaka. Detaljna analiza nasljeđivanja polimorfizama ER $\alpha$  prema genotipu roditelja prikazana je u Tablici 7. U potomaka smo analizirali i lipidogram te nismo našli statistički značajne razlike u medijanu vrijednosti ukupnog kolesterola, LDL-a, HDL-a i triglicerida između tri genotipske skupine ER $\alpha$  (Slike 25-28) No, kada smo populaciju podijelili na djevojčice i dječake (Slike 29-36), u dječaka smo zapazili jasan trend viših vrijednosti kolesterola, LDL-a i triglicerida u potomaka s kratkom alelnom formom ER $\alpha$  ('SS'), a vrijednosti LDL-a su dosegle i statistički značajnu razliku

( $p < 0.05$ ), dok u djevojčica nije bilo značajne razlike u medijanu vrijednosti ukupnog kolesterola, LDL-a, HDL-a i triglicerida.



Slika 23. Distribucija alelnih formi ER $\alpha$  u potomaka bolesnika s ranom koronarnom bolešću

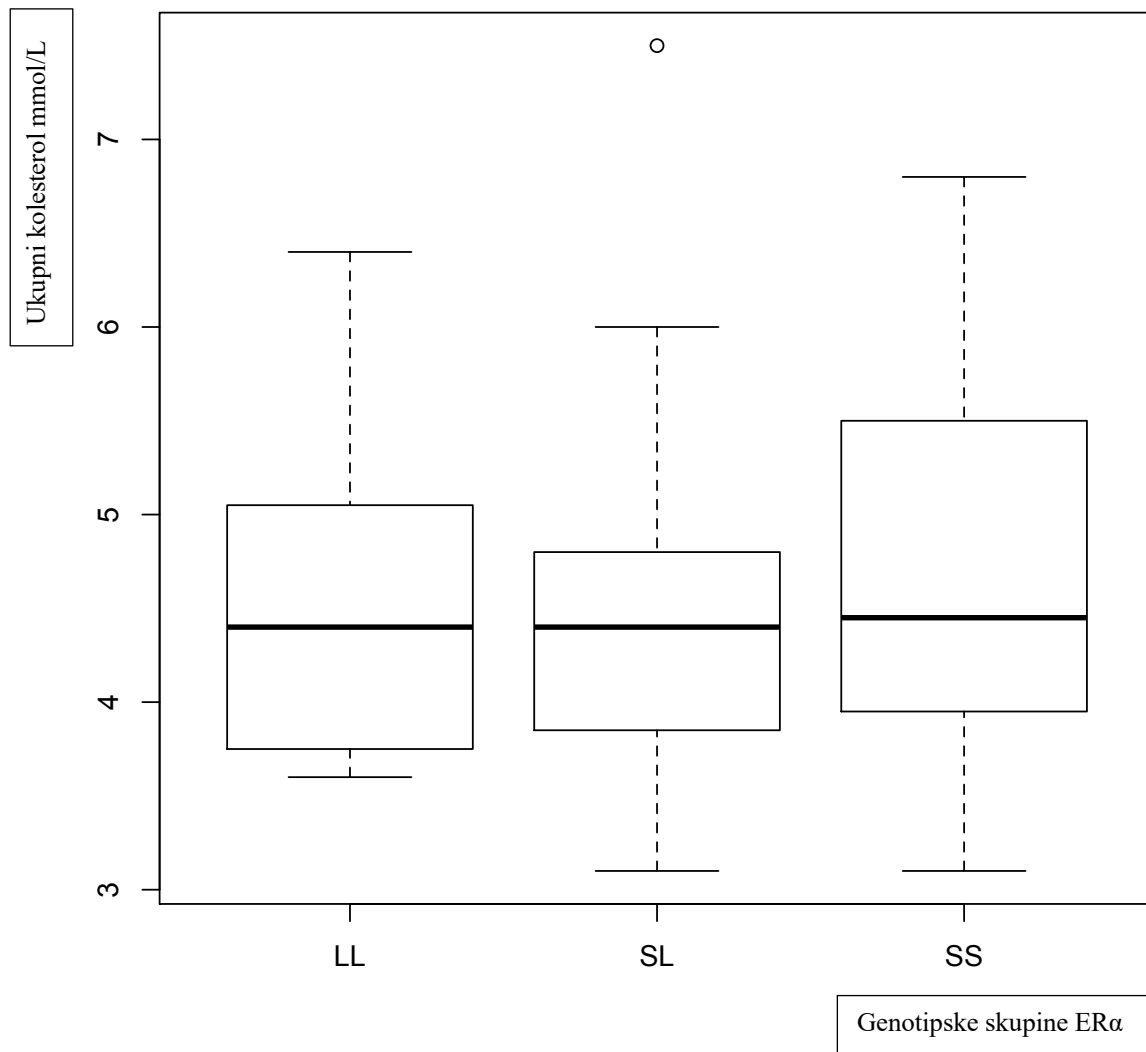


Slika 24. Usporedba alelnih frekvencija ER $\alpha$  odraslih i potomaka

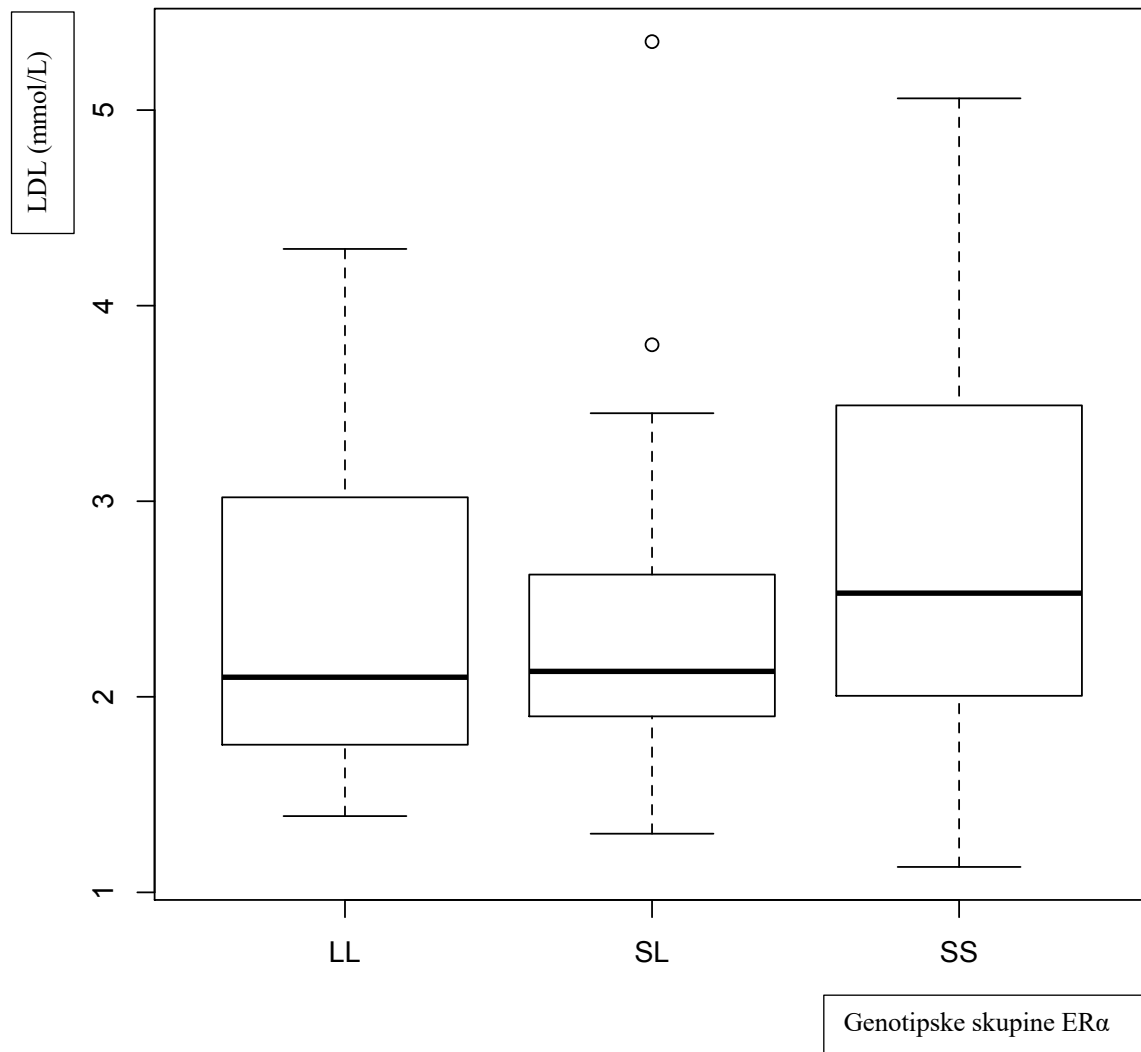
Tablica 7. Nasljeđivanje polimorfizama ER $\alpha$  prema genotipu roditelja

SS roditelj	SS potomak ( n=8; 57%)
	SL potomak ( n=6; 43%)
SL roditelj	SS potomak (n=7; 18%)
	SL potomak (n=23; 61%)
	LL potomak (n=8; 21%)
LL roditelj	SL potomak (n=9; 56%)
	LL potomak (n=7; 44%)

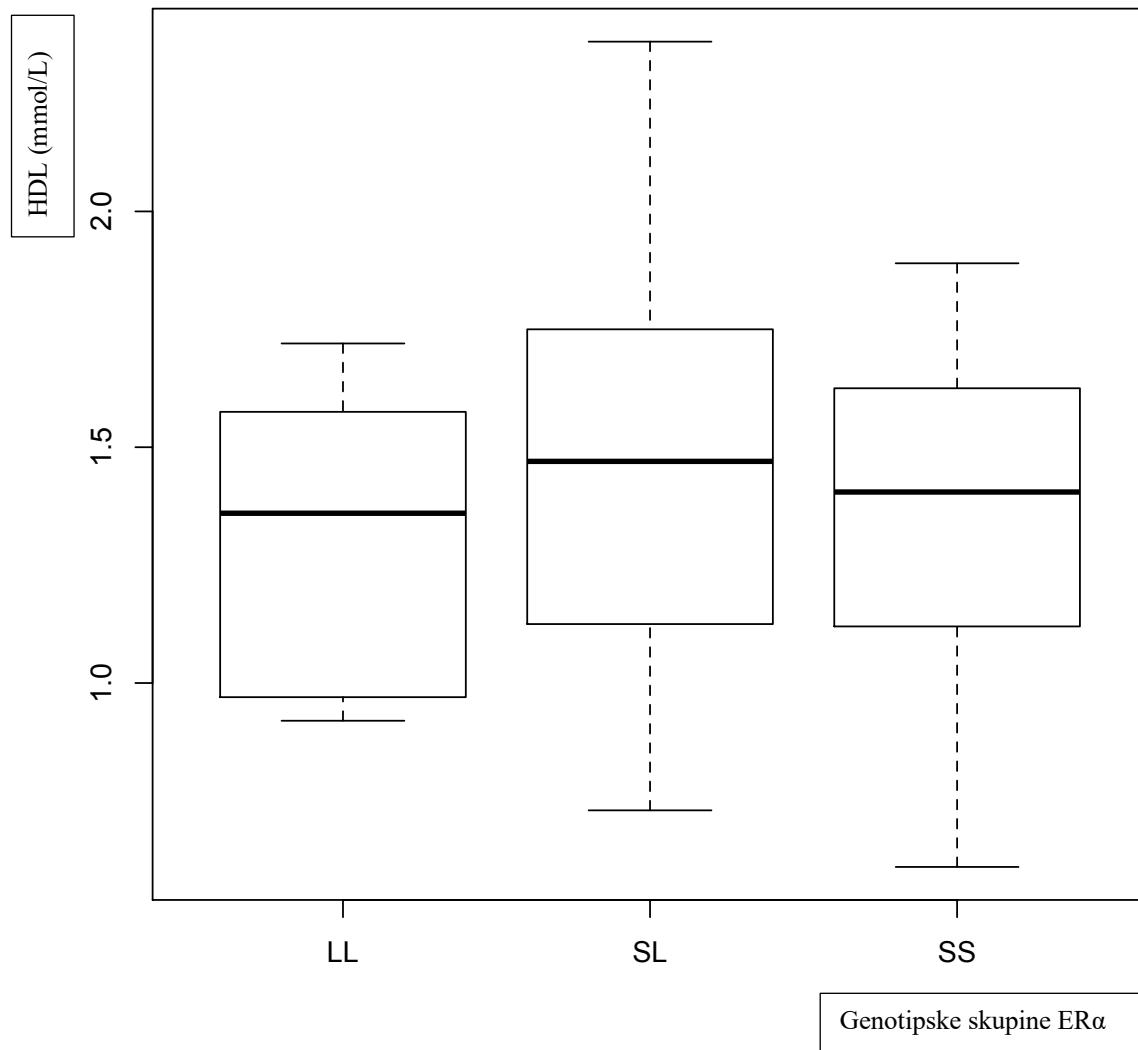




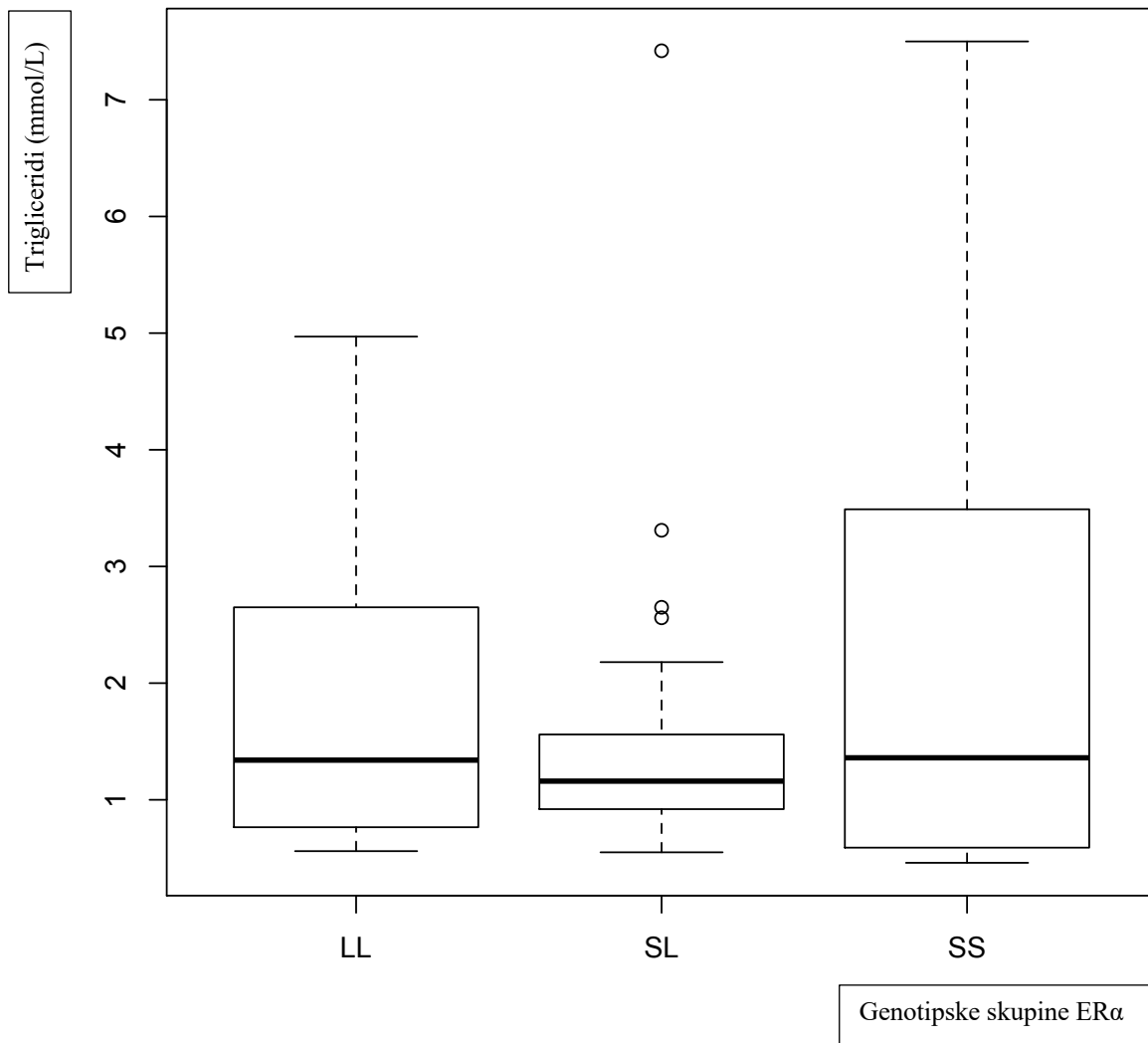
Slika 25. Vrijednosti ukupnog kolesterola u potomaka u odnosu na genotipske skupine ERα; medijan, raspon; SS 4.45 (3.10-6.80), SL 4.40 (3.10-7.50), LL 4.40 (3.70-6.40); p=0.88



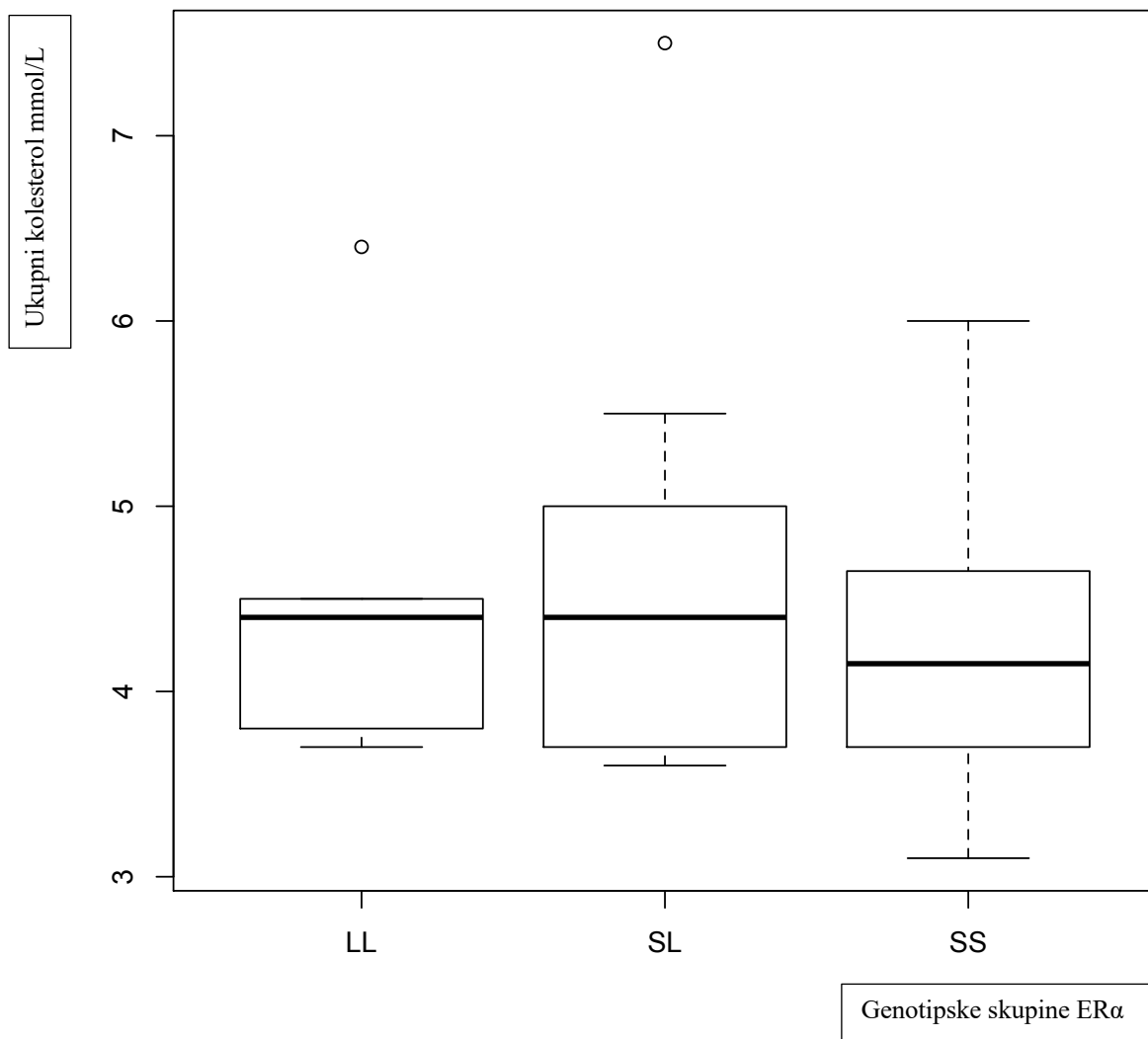
Slika 26. Vrijednosti LDL-a u potomaka u odnosu na genotipske skupine ERα; medijan, raspon; SS 2.53 (1.13-5.06), SL 2.13 (1.30-5.35), LL 2.10 (1.90-4.29); p=0.49



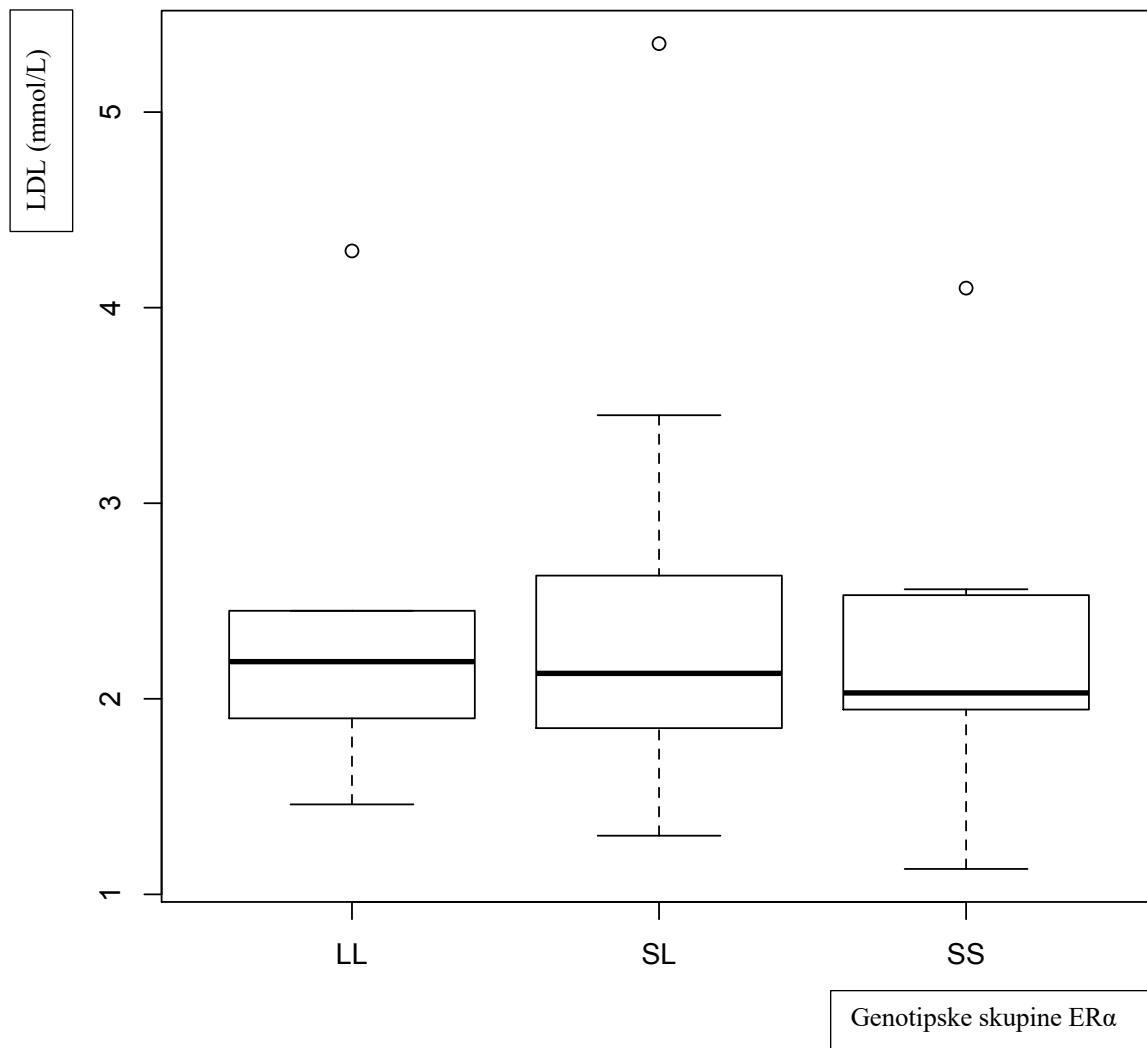
Slika 27. Vrijednosti HDL-a u potomaka u odnosu na genotipske skupine ER $\alpha$ ; medijan, raspon; SS 1.405 (0.61-1.89), SL 1.47 (0.79-2.36), LL 1.36 (0.92-1.72); p=0.49



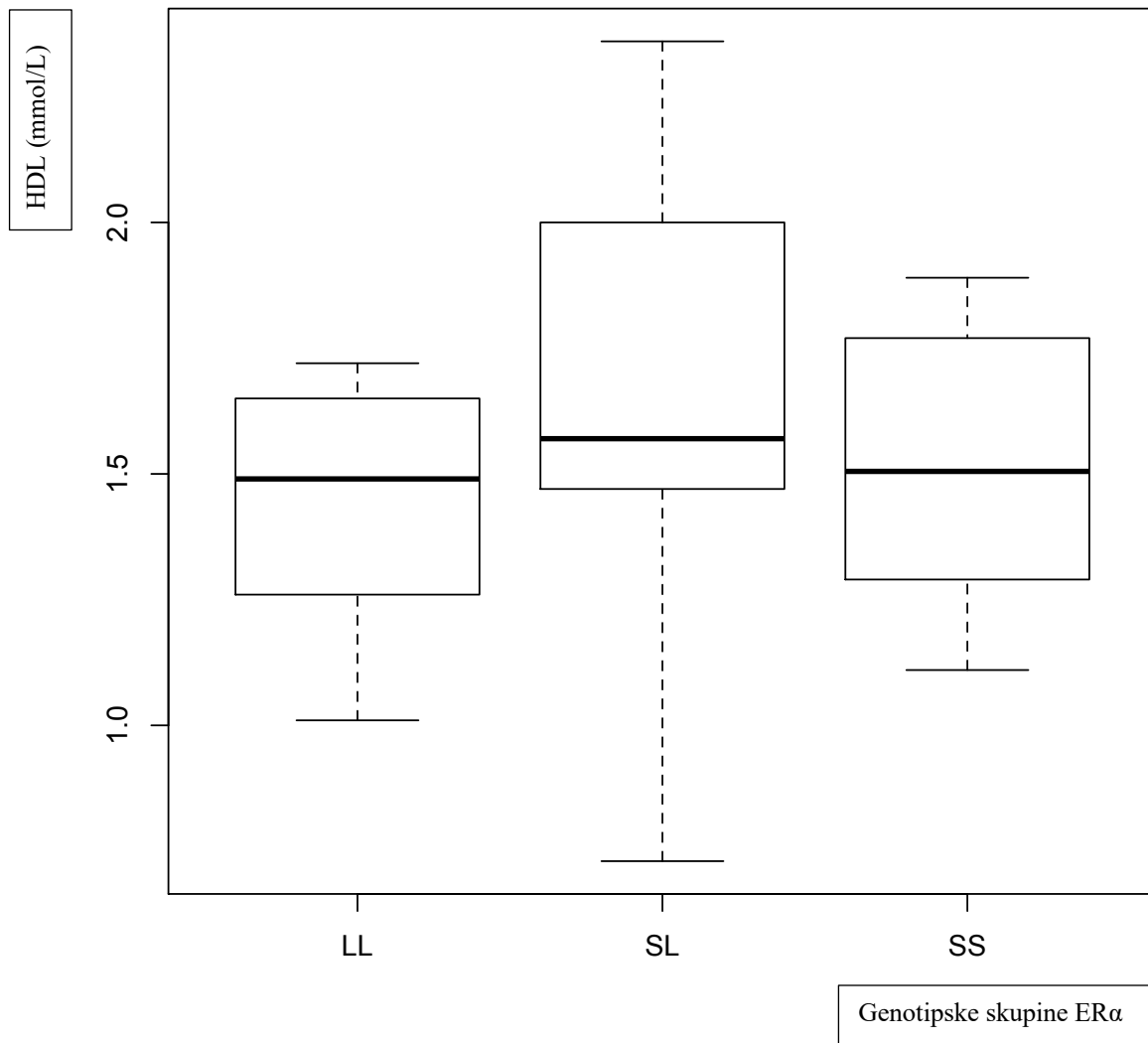
Slika 28. Vrijednosti triglicerida u potomaka u odnosu na genotipske skupine ERα; medijan, raspon; SS 1.36 (0.54-7.5), SL 1.16 (0.59-7.42), LL 1.34 (0.71-4.97); p=0.90



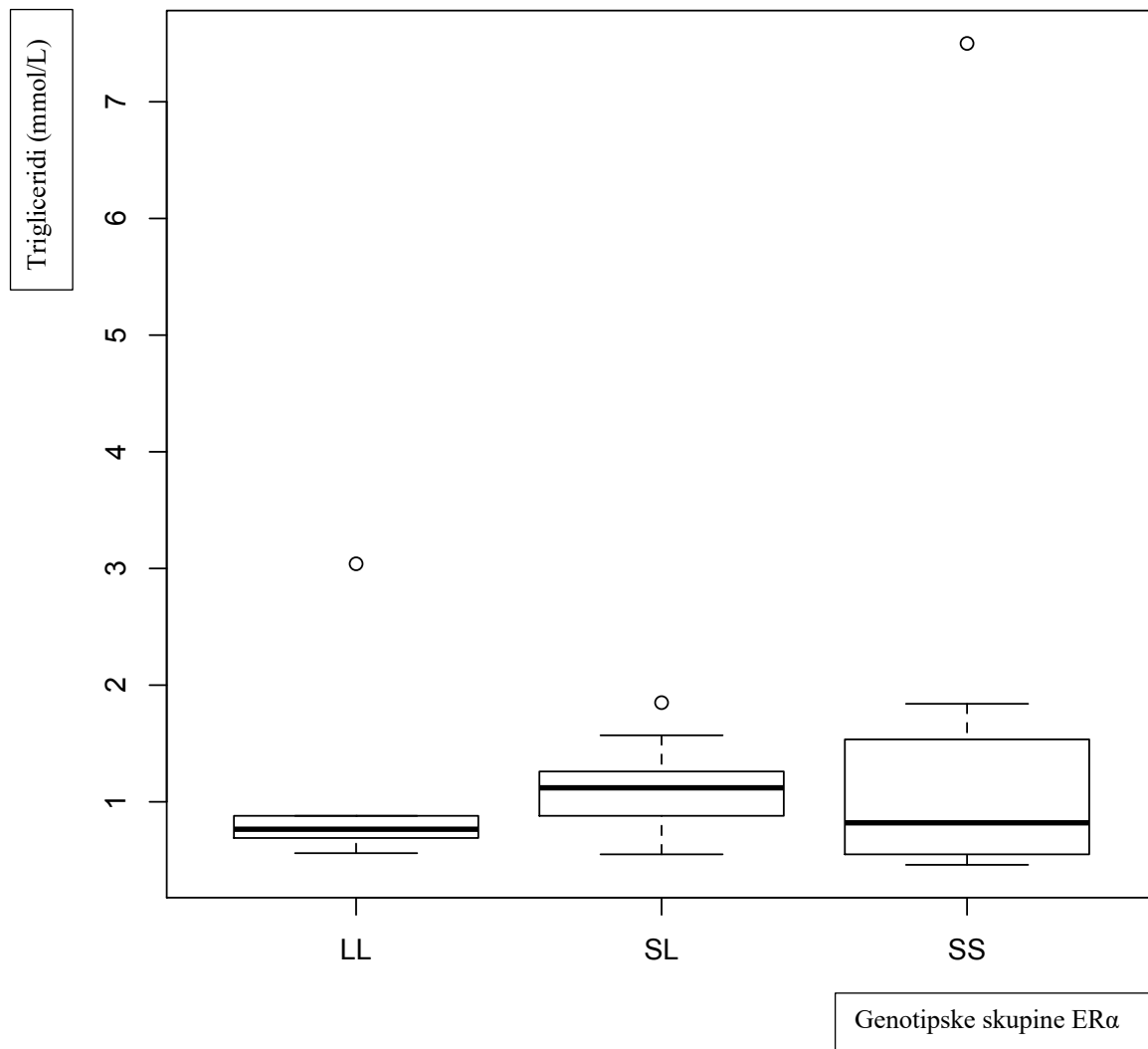
Slika 29. Vrijednosti ukupnog kolesterola u odnosu na genotipske skupine ERα kod ženskih potomaka; medijan, raspon; SS 4.15 (3.10-6.00), SL 4.40 (3.60-7.50), LL 4.40 (3.70-6.40); p=0.60



Slika 30. Vrijednosti LDL-a u odnosu na genotipske skupine ER $\alpha$  u ženskih potomaka; medijan, raspon; SS 2.03 (1.91-2.56), SL 2.13 (1.69-5.35), LL 2.19 (1.46-4.29); p=0.98

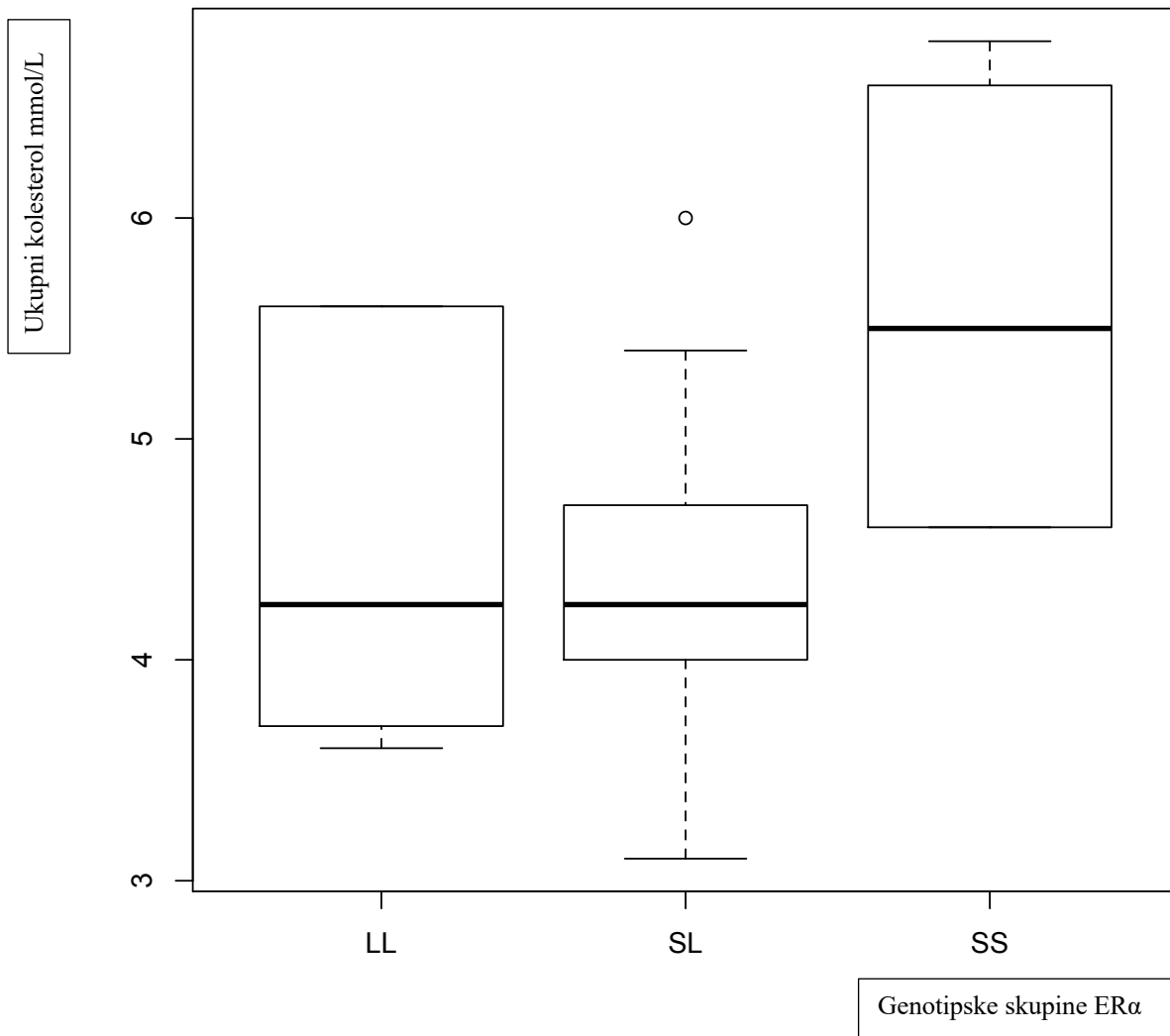


Slika 31. Vrijednosti HDL-a u odnosu na genotipske skupine ER $\alpha$  u ženskih potomaka; medijan, raspon; SS 1.505 (1.11-1.89), SL 1.57 (0.73-2.36), LL 1.59 (1.01-1.72); p=0.20

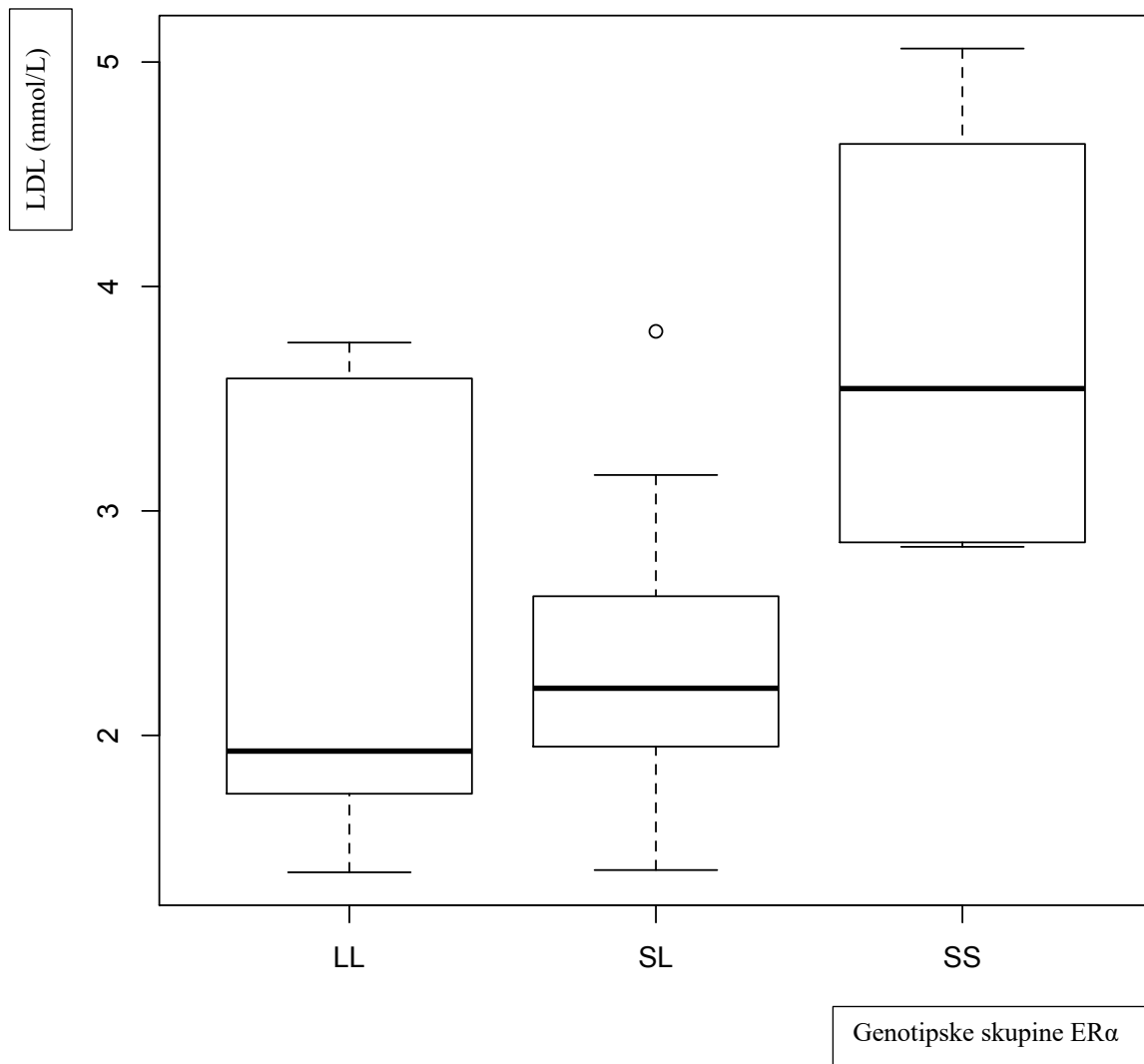


Slika 32. Vrijednosti triglicerida u odnosu na genotipske skupine ERα u ženskih potomaka; medijan, raspon; SS 0.82 (0.54-7.50), SL 1.12 (0.55-1.85), LL 0.765 (0.56-3.04); p=0.51

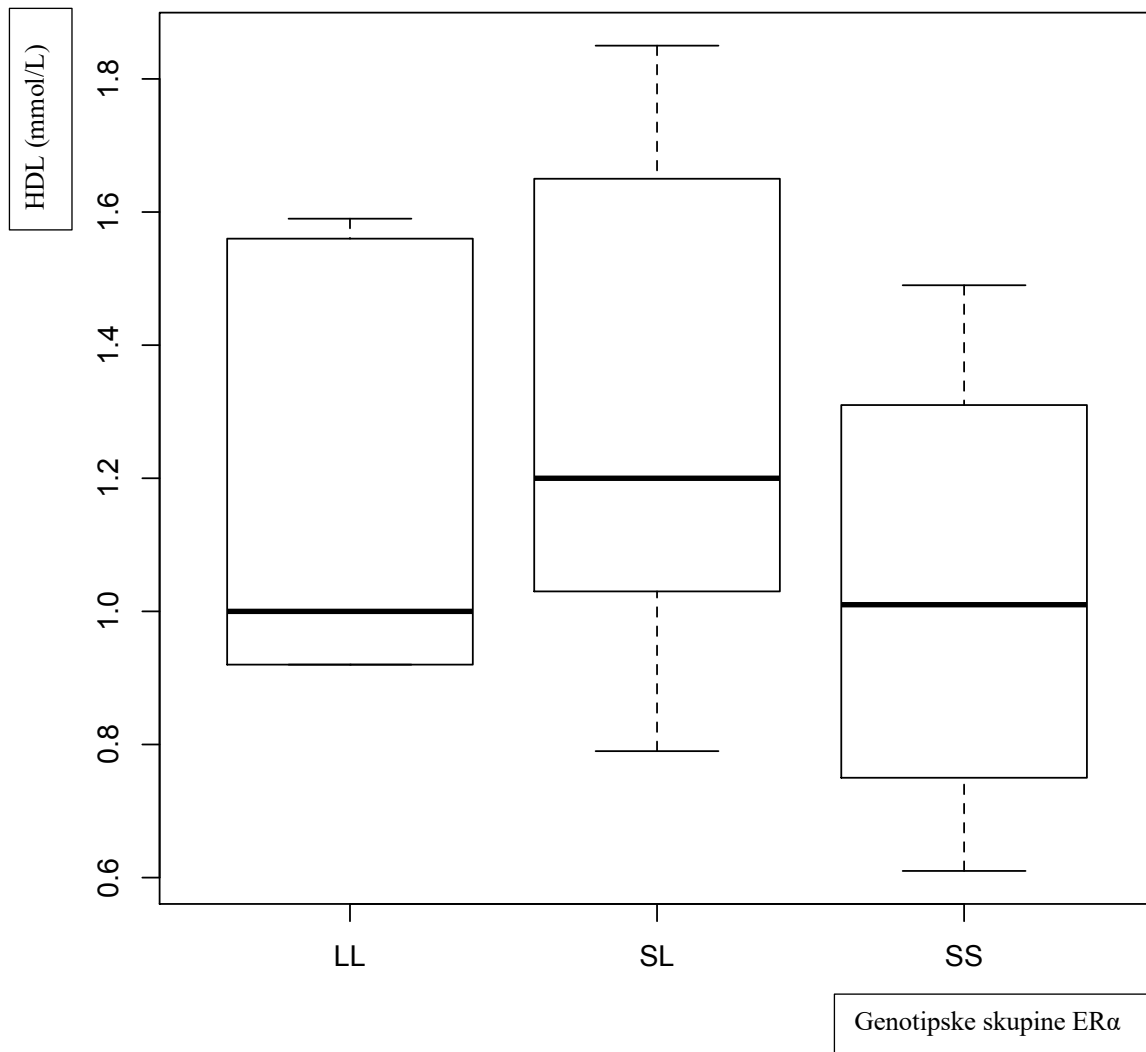




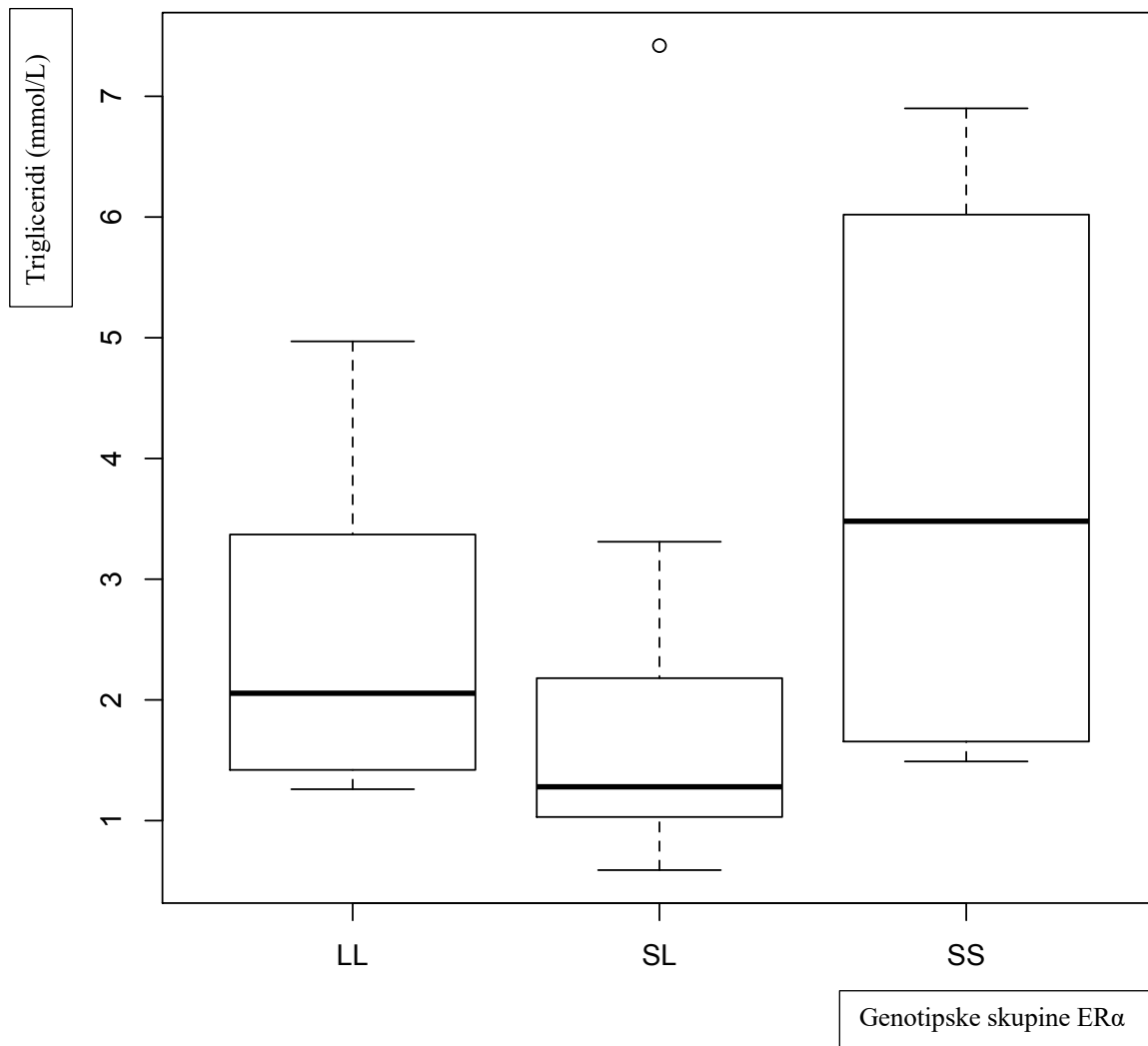
Slika 33. Vrijednosti ukupnog kolesterola u odnosu na genotipske skupine ER $\alpha$  u muških potomaka; medijan, raspon; SS 5.50 (4.60-6.80), SL 4.25 (3.10-6.00), LL 4.25 (3.70-5.60); p=0.12



Slika 34. Vrijednosti LDL-a u odnosu na genotipske skupine ER $\alpha$  u muških potomaka; medijan, raspon; SS 3.545 (2.84-5.06), SL 2.21 (1.40-3.16), LL 1.93 (1.39-3.75); p=0.04



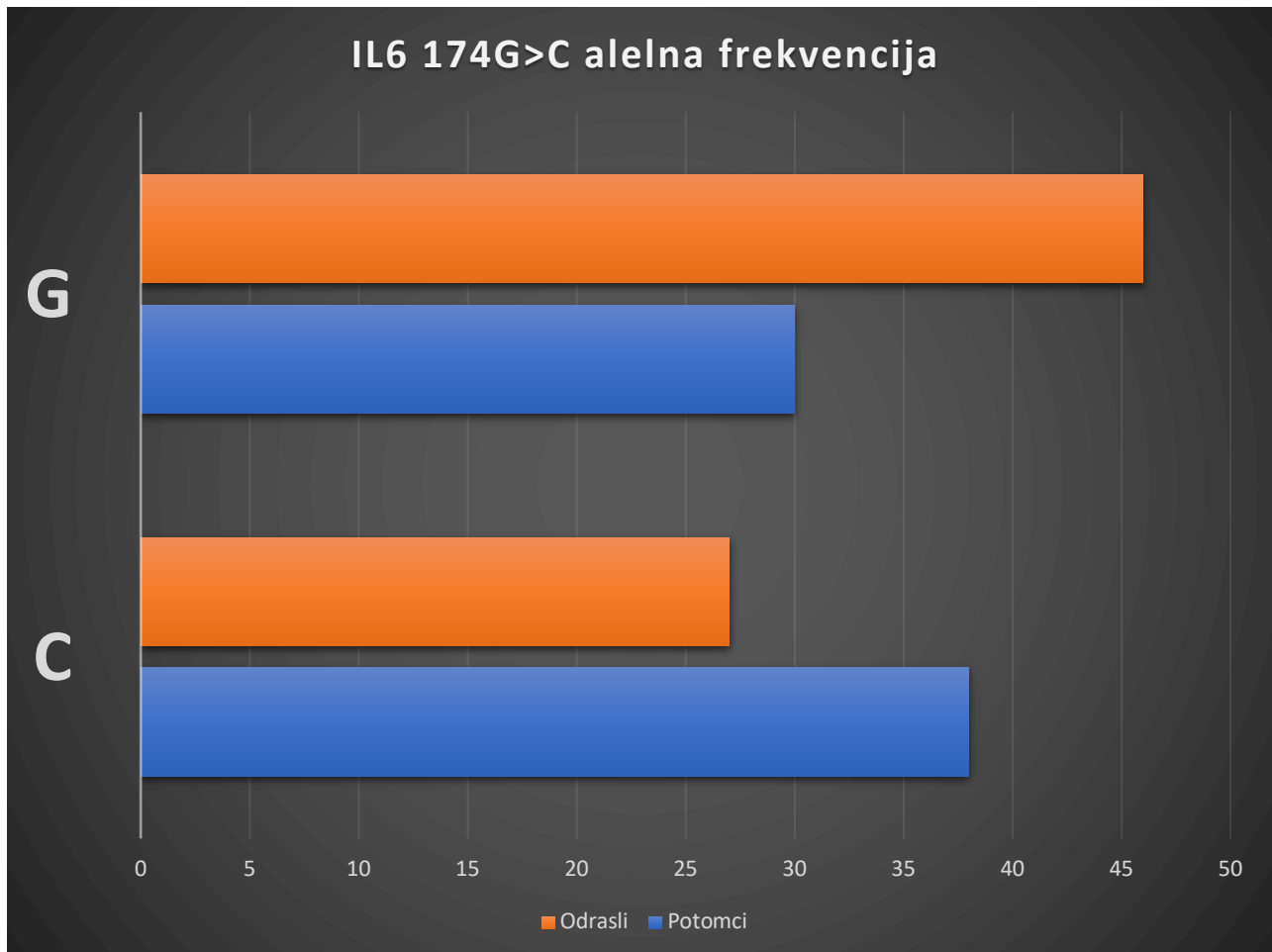
Slika 35. Vrijednosti HDL-a u odnosu na genotipske skupine ER $\alpha$  u muških potomaka; medijan, raspon; SS 1.01 (0.61-1.49), SL 1.20 (0.79-1.85), LL 1.00 (0.92-1.59); p=0.22



Slika 36. Vrijednosti triglicerida u odnosu na genotipske skupine ER $\alpha$  u muških potomaka; medijan, raspon; SS 3.48 (1.49-6.90), SL 1.28 (0.59-7.42), LL 2.055 (1.26-4.97); p=0.08

### 5.6. Polimorfizam gena IL-6 u potomaka bolesnika s ranom koronarnom bolešću

Mutacija IL-6 je pronađena u 46 potomaka (68%); GC heterozigotnu alelnu formu imalo je 32 potomka (47%), a CC homozigotnu alelnu formu 14 potomaka (21%). Divlji tip (oni s GG alelnom formom) je imalo 22 potomka (32%). Usporedba alelnih frekvencija IL-6 odraslih i potomaka prikazana je na Slici 37: G alelnu formu je imalo je 63% bolesnika i 56% potomaka a C alelnu formu 37% bolesnika i 44 % potomaka. Detaljna analiza nasljeđivanja polimorfizama IL-6 prema genotipu prikazana je u Tablici 8.



Slika 37. Usporedba alelnih frekvencija IL-6 u odraslih i njihovih potomaka

Tablica 8. Nasljeđivanje polimorfizama IL-6 prema genotipu roditelja

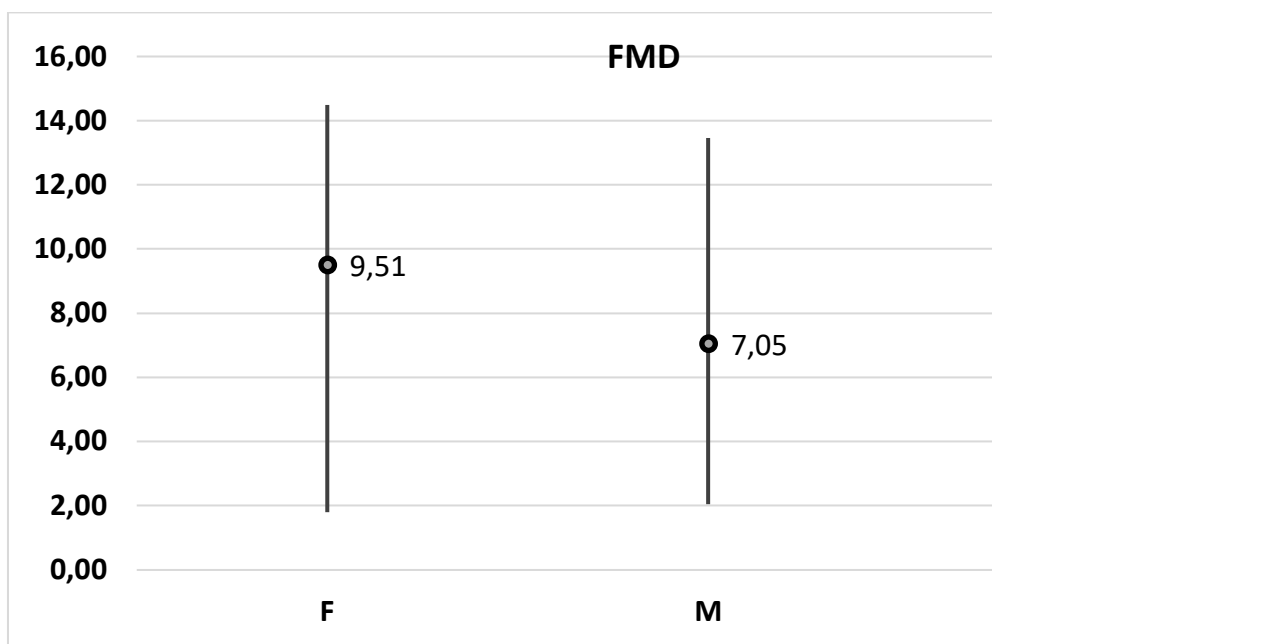
GG roditelji	GG potomak (n=16; 59%)
	GC potomak (n=11; 41%)
GC roditelji	GG potomak (n=6; 23%)
	GC potomak (n=15; 57%)
	CC potomak (n=5; 20%)
CC roditelji	GC potomak (n=6; 40%)
	CC potomak (n=9; 60%)

#### 5.7. FMD kod potomaka bolesnika s ranom koronarnom bolešću

Karakteristike studijske populacije potomaka sažete su u Tablici 9. Medijan vrijednosti FMD-a je u ženskih potomaka bio viši nego u muških (9.24% vs 7.84%), no ta razlika nije bila statistički značajna ( $p=0.29$ ) (Slika 38).

Tablica 9. Karakteristike studijske populacije potomaka

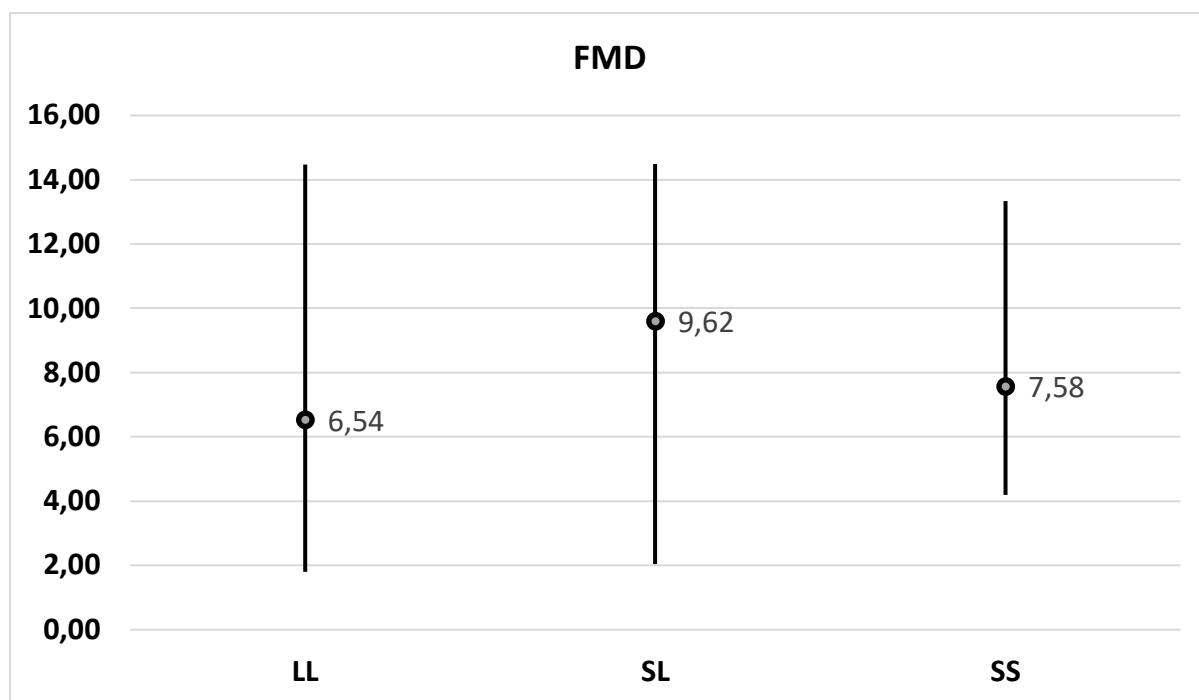
Potomci (n)	68
Spol	35 žena, 33 muškaraca
Dob (godine)	Ž 15 (8-28); M 19 (6-34)
Polimorfizam ER $\alpha$ n (%)	15 SS (22%); 38 SL (56%); 15 LL (22%)
Broj bolesnika s mutacijom ER $\alpha$ n (%)	53 (78%)
Polimorfizam IL-6 n (%)	22GG (32.3%); 32GC (47%); 14CC (20.7%)
Broj bolesnika s mutacijom IL-6 n (%)	46 (67.7%)
FMD (%)	Ž 9.24% ; M 7.84%



Slika 38. Vrijednosti FMD-a u odnosu na spol potomaka; medijan, raspon; M 7.05 (2.04-13.46); F 9.51 (1.80-14.49);  $p=0.29$

#### 5.7.1. FMD u potomaka s polimorfizmom $ER\alpha$

Potomci s „dugom“ alelnom formom genotipa  $ER\alpha$  (LL) su imali niže vrijednosti medijana FMD-a i od potomaka s „mješovitim“ alelnom formom (SL), kao i potomaka s „kratkom“ alelnom formom (SS), no ta razlika nije bila statistički značajna ( $p=0.41$ ) (Slika 39)

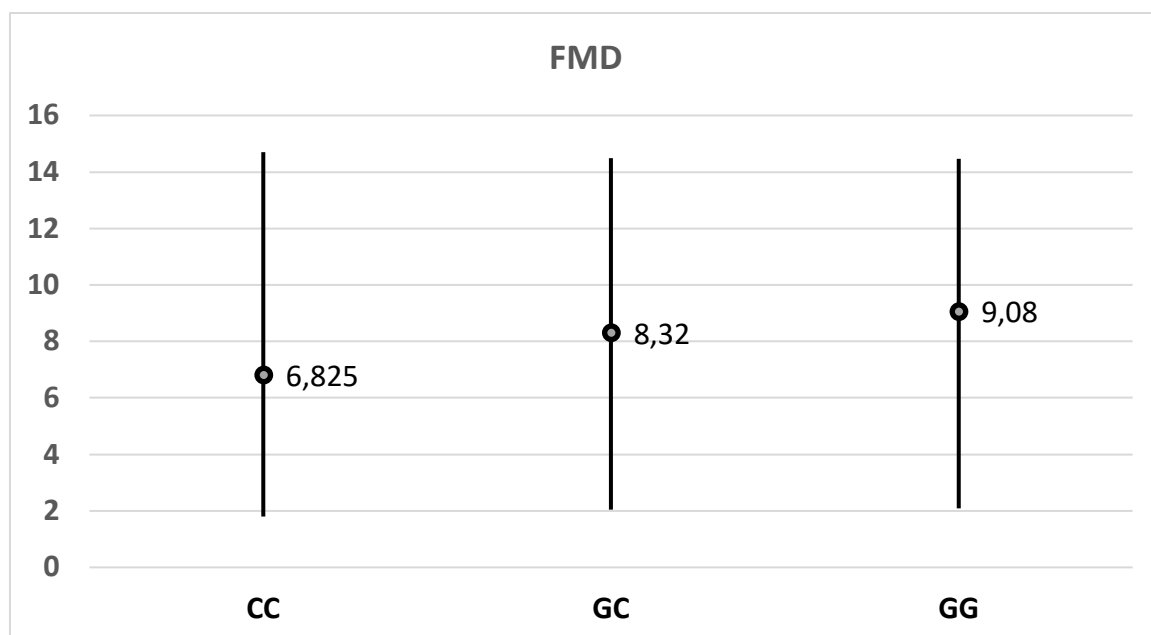


Slika 39. Vrijednosti FMD-a u odnosu na genotipske skupine ER $\alpha$ ; medijan, raspon; SS 7.58 (4.20-13.34), SL 9.62 (2.04-14.49), LL 6.54 (1.80-14.47), p=0.41

### 5.7.2. FMD kod potomaka s polimorfizmom IL-6

U potomaka s polimorfizmom IL-6 postojao je linearni trend između FMD-a i IL-6 genotipa tako da je medijan FMD-a u potomaka s CC homozigotnom alelnom formom bio niži od medijana FMD-a u potomaka s GC heterozigotnom alelnom formom, koji je pak bio niži od potomaka s divljim tipom, tj. GG alelnom formom, no ta razlika nije bila statistički značajna (p=0.96) (Slika 40)

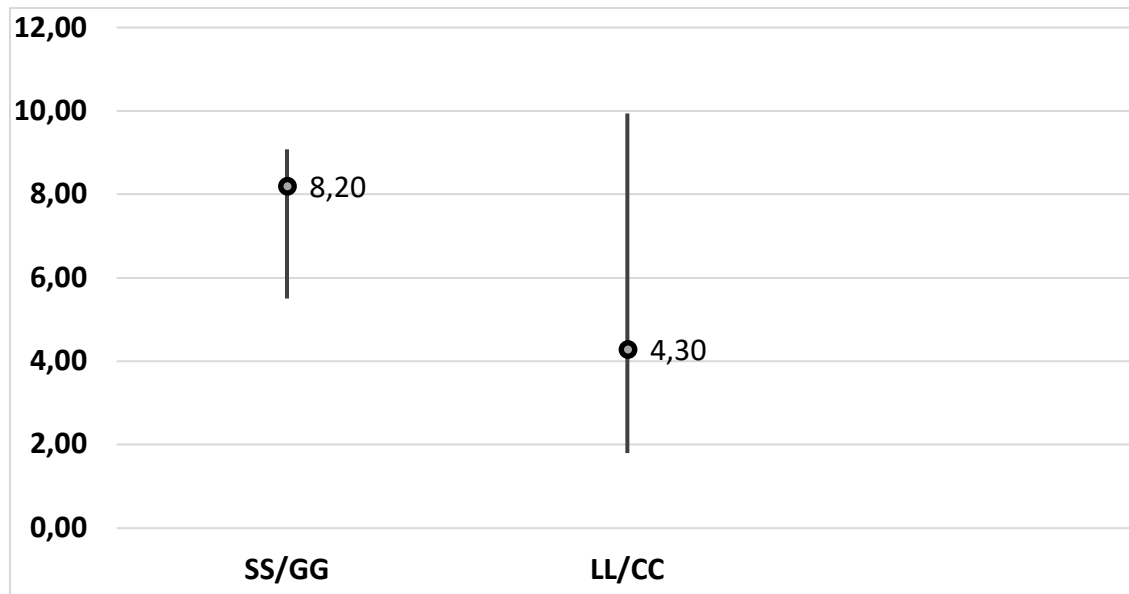




Slika 40. Vrijednosti FMD-a u odnosu na genotipske skupine IL-6; medijan, raspon; GG 9.08 (2.09-14.47), GC 8.32 (2.04-14.49), CC 6.825 (1.80-14.70),  $p=0.96$

### 5.7.3. FMD potomaka u odnosu na kombinacije polimorfizama $ER\alpha$ i polimorfizama IL-6

Najniže vrijednosti FMD-a izmjerene su u potomaka koji su naslijedili i LL alelnu formu genotipa  $ER\alpha$  i CC homozigotnu alelnu formu genotipa IL-6 (medijan 4.30, raspon, 1.80-9.94), dok je u potomaka s SS i GG alelnom formom medijan iznosio 8.20 (raspon, 5.50-9.08). (Slika 41)



Slika 41. Vrijednosti FMD-a u potomaka s nasljeđenim SS genotipom ER $\alpha$  i GG genotipom IL-6, te u potomaka s nasljeđenim LL genotipom ER $\alpha$  i CC genotipom IL-6 medijan, raspon; SS/GG 8.20 (5.50-9.08), LL/CC 4.30 (1.80-9.94)

## 6. RASPRAVA

### 6.1. Polimorfizam gena estrogenskog receptora alfa u bolesnika s ranom koronarnom bolešću i njihovih potomaka

Epidemiološke studije su pokazale da estrogen ima protektivni učinak na kardiovaskularni sustav (80, 81). Obzirom da je funkcija estrogena posredovana estrogenskim receptorima (ESR), a da je polimorfizam ESR povezan s funkcijom i ekspresijom ESR-a (82), logično je za pretpostaviti da će polimorfizam ESR utjecati na učinak estrogena na aterosklerozu (54, 83). U oba spola postoje genetske varijacije ER $\alpha$  i ER $\beta$  povezane s nizom bolesti, uključujući kardiovaskularne bolesti i preuranjenu ishemijsku bolest srca (84, 85). Obzirom na njihovu učestalost, najčešće su proučavani polimorfizmi PvuII i XbaI, točkaste mutacije u intronu 1 ER $\alpha$ , a radi se polimorfizmima jednog nukleotida (SNP, *od eng. single-nucleotid polymorphisms*), i to zamjeni timina za citozin (T/C) u PvuII polimorfizmu i zamjeni gvanina u adenozin (G/A) u XbaI polimorfizmu.

Međutim, SNP u ER $\alpha$  znatno se razlikuju u populacijama koje pripadaju različitim etničkim skupinama i zemljopisnim regijama. Posljedično su rezultati o njihovoj povezanosti s kardiovaskularnim bolestima nedosljedni, kako u međunarodnim studijama, tako i onim provedenim u populacijama iz različitih zemljopisnih regija koje pripadaju istoj etničkoj skupini. Nekoliko meta-analiza su uključile većinu postojećih studija i pokušale analizirati ovu povezanost (86-90). U meta-analizi Kjaergaarda i sur. nije nađena povezanost PvuII polimorfizma i kardiovaskularnih bolesti u 9244 ispitanika u danskoj populaciji koja je praćena tijekom 25 godina (86), dok su Wei i sur. našli povezanost ove mutacije i kardiovaskularnih bolesti u kineskih bolesnika na 1853 bolesnika i 1544 kontrole (87). Ding i sur. su analizirali 21 studiju s 9926 koronarnih bolesnika i 16710 kontrola i našli značajnu povezanost PvuII polimorfizma i koronarne bolesti, ali je analiza podgrupa također pokazala da je ova razlika značajna u azijskim, no ne

i zapadnim populacijama (88). Jiang i sur. su pak analizirali povezanost i PvuII i XbaI polimorfizma s kardiovaskularnom bolešću u 10 studija s 7029 bolesnika i 6901 zdravih kontrola, uglavnom bijelcima, i nisu potvrdili povezanost (89). Naposljetku, Zhou i sur. su analizirali 10 studija s 1742 bolesnika i 2012 kontrola na kineskoj populaciji i također nisu potvrdili povezanost PvuII polimorfizma i koronarne bolesti (90). Još jedan opisivani polimorfizam u genu za ER $\alpha$  je duljina ponavljanja jednostavne sekvence dinukleotida timina i adenzina (T/A) u promotorskoj regiji ER $\alpha$  gena uzvodno od egzona 1 (eng. *T/A repeat*), no taj je polimorfizam rijetko istraživani u kardiovaskularnih bolesnika. U više je studija duljina T/A ponavljanja pokazala povezanost s postmenopauzalnom osteoporozom (91, 92), a postoji samo nekoliko studija koje su ovaj polimorfizam ispitivale u bolesnika s koronarnom bolešću (55,56,93). U studiji Kunnasa i sur. (55) ispitivanja su provedena na 119 Finaca koji su umrli iznenadnom smrću, a obdukcijom je verificiran ACS ako je to bio uzrok smrti, te je kod svih procijenjena ateroskleroza, odnosno stupanj suženja koronarnih arterija. Analizom duljine T/A ponavljanja je potvrđeno da su muškarci s „dugom“ alelnom formom genotipa ER $\alpha$  (LL) imali značajno veći broj jako suženih koronarnih arterija, veća područja kompliciranih lezija i više kalcifikacija koronarnih arterija u usporedbi s muškarcima s „kratkom“ alelnom formom genotipa ER $\alpha$  (SS). Grupa s „mješovitom“ alelnom formom genotipa ER $\alpha$  (SL) je imala intermedijarne aterosklerotske promjene i nije se statistički razlikovala od druge dvije grupe. Također, grupa s „dugom“ alelnom formom genotipa ER $\alpha$  (LL) je imala veći rizik za infarkt miokarda, no neovisno samo o dobi i BMI, a nisu uzeti u obzir svi čimbenici koronarnog rizika. Pollak i sur. (56) su analizirali duljinu T/A ponavljanja u neselecioniranoj populaciji od 503 bolesnika (bijelaca) koji su zbog sumnje na koronarnu bolest podvrgnuti koronarografiji. Ovo je ispitivanje pokazalo da su muški ispitanici homozigoti za duge alele (LL) imali značajno veći broj suženih aterosklerotskih koronarnih segmenata i granično statistički značajno veći broj suženih koronarnih žila u odnosu na muške

ispitanike homozigote za kratke alele (SS), no samo u bolesnika mlađih od 55 godina, što je relativno očekivano, obzirom da su u starijih bolesnika izraženiji klasični kardiovaskularni rizični faktori umjesto genetskih. Ovdje je broj ispitanika bio dovoljan za multivarijatnu analizu te je ova povezanost potvrđena neovisno o spolu, dobi i glavnim rizičnim faktorima za koronarnu bolest. Naposljetku, studija Lu i sur., provedena je u odabranoj populaciji japanskih bolesnika heterozigota za obiteljsku hiperkolesterolemiju (197 muškaraca i 97 žena), pokazala je značajno veću učestalost „duge“ homozigotne alelne forme genotipa ER $\alpha$  (LL) u žena u postmenopauzi s koronarnom bolesti nego u onih bez koronarne bolesti, što nije potvrđeno u muškaraca (93). Ova je grupa autora u istoj populaciji ispitala i druge polimorfizme ER $\alpha$ , uključujući PvuII i XbaI te našla da je XbaI bio povezan s koronarnom bolesti i u postmenopauzalnih žena i muškaraca, uz još jedan novo opisani polimorfizam -1989 T/G. Stoga su autori pretpostavili da mogući mehanizam ove povezanosti leži u povezanoj neravnoteži između duljine T/A ponavljanja i drugih polimorfizama. Naime, tri su moguća mehanizma na koji polimorfizmi gena utječu na njihovu funkciju: kvalitativni (mutacija se zbiva u egzonu gena), kvantitativni (mutacija se zbiva u bilo kojoj regulatornoj regiji, npr. promotorska regija) ili povezanost s nekom drugom mutacijom koja ima neposredni učinak na bolest (neravnoteža povezanosti gena, eng. *linkage disequilibrium*). Budući da se T/A ponavljanje ne nalazi u kodirajućoj regiji ER $\alpha$ , kvalitativni utjecaj nije moguć. Kvantitativno, duljina T/A ponavljanja može imati utjecaj na korištenje alternativnih promotora, što rezultira različitom ekspresijom ER $\alpha$  u određenim tkivima, jer se T/A ponavljanje nalazi u regulatornoj regiji ER $\alpha$  gena između promotora A i B. Postoji barem sedam promotora opisanih u ER $\alpha$  genu u različitim tkivima (94), ali nije poznato koji je promotor prisutan u vaskularnim glatkim mišićnim stanicama. Zanimljivo je također da je, kada se govori o duljini T/A ponavljanja, i obrnuto od koronarnih bolesnika, za osteoporozu u postmenopauzalnih žena značajna „kratka“ alelna forma genotipa ER $\alpha$  (SS), što upućuje da je u vaskularnom sustavu, za razliku od

koštanog, uključena drugačija upotreba promotora (91). Naposljetku, u obzir dolazi i mogućnost da duljina T/A ponavljanja ne utječe na srce izravno, već preko neravnoteže povezanosti gena (eng. linkage disequilibrium) s drugim kodirajućim regijama, kako su pretpostavili Lu i suradnici.

U našem je radu analizirana duljina T/A ponavljanja u mladih bolesnika s koronarnom bolešću i nađen polimorfizam s barem jednom „dugom“ alelnom formom (LL+SL) u njih 76%, odnosno u 83% muškaraca i u 67% žena. Lu i suradnici su isto našli u 67% svih bolesnika, 67% muškaraca i 67% žena, ali su oni ispitali japansku populaciju s obiteljskom hiperkolesterolemijom. Također, ovi su postoci bili značajno viši od populacije s obiteljskom hiperkolesterolemijom, a bez koronarne bolesti (67% vs 52% u cijeloj populaciji, 67% vs 57% u muškaraca) no razlika je bila značajna samo u žena (67% vs 45%,  $p=0.01$ ). Pollak i sur. su također našli polimorfizam s barem jednom „dugom“ alelnom formom (LL+SL) u 65% populacije u kojih je rađena koronarografija zbog sumnje na koronarnu bolest, no nije poznato kolika je ta prevalencija bila u podgrupi kod koje nije nađeno znakova koronarne bolesti. Obzirom da ne postoje studije u zdrave populacije za usporedbu, iz podataka našeg rada može se iščitati visoka ukupna prevalencija ove mutacije, što je i očekivano, no čak i viša od ranije objavljenih studija. Također, prema dostupnim saznanjima, ovo je prvi rad koji je našao taj oblik polimorfizama  $ER\alpha$  u zdravih potomaka bolesnika s ranom koronarnom bolesti i također visoku prevalenciju od 78%, odnosno čak 87% u potomaka roditelja s koronarnom bolešću i prisutnim polimorfizmom s barem jednom „dugom“ alelnom formom. Iako u našoj studiji nije bilo „zdrave“ kontrole, Golubić i sur. (95) su ispitali duljinu T/A ponavljanja u hrvatskoj populaciji s izoliranom fibrilacijom atrijske te su kao kontrole koristili zdrave ispitanike bez znakova koronarne bolesti ( $n = 197$ ) i u njih našli prevalenciju od 68% „duge“ i „mješovite“ alelne forme (LL + SL). Obzirom da se radi o istoj populaciji, čak i prema zemljopisnoj regiji (Zagreb i okolica), mišljenja smo da se ove vrijednosti mogu koristiti i kao referentna populacija za ovo istraživanje.

Dakle, može se zaključiti da potomci bolesnika s koronarnom bolesti imaju visoku učestalost ove mutacije te bi u budućnosti vrijedilo detaljnije ispitati taj polimorfizam kao mogući prediktor rane koronarne bolesti.

Estrogen djeluje protektivno na kardiovaskularni sustav na dva načina; na endotelnu funkciju krvnih žila i na metabolizam lipida. Stoga je mogućnost da genske varijacije ER $\alpha$  predviđaju razinu plazmatskih lipida i apolipoproteina ispitivana u više studija. Međutim, danas postoje oprečni dokazi o povezanosti polimorfizama ER $\alpha$  i apoA-I, apoB, ukupnog kolesterola, LDL-a, HDL-a i triglicerida (96-99), kao i dokazi o povezanosti polimorfizama ER $\alpha$  i odgovora HDL-a na hormonsku nadomjesnu terapiju (53). Prema našim saznanjima, naše istraživanje je prvo koje je ispitalo povezanost duljine T/A ponavljanja i lipidograma u bolesnika s ranom koronarnom bolesti. Duljina T/A ponavljanja u ovom istraživanju nije imala utjecaj na lipidogram u čitavoj populaciji bolesnika, no kada su bolesnici podijeljeni na muškarce i žene, iznenađujuće su muški bolesnici s „kratkom“ alelnom formom (SS) genotipa ER $\alpha$  imali tendenciju viših vrijednosti triglicerida i nižih vrijednosti HDL-a, iako ta razina nije bila statistički značajna. Također, u ovom je istraživanju po prvi put ispitan utjecaj istog polimorfizma na lipidogram u potomaka bolesnika s ranom koronarnom bolešću, te je ponovno iznenađujuće nađeno da „kratka“ alelna forma (SS) genotipa ER $\alpha$  ima utjecaj na lipidogram, no opet samo u muških potomaka. Naime, SS alelna forma je u muških potomaka bolesnika s ranom koronarnom bolesti u ovoj studiji bila povezana s tendencijom viših vrijednosti ukupnog kolesterola i triglicerida, dok je razina LDL-a bila i statistički značajno veća ( $p=0.04$ ) u odnosu na muške potomke s mutacijom („duga“ i „mješovita“ alelna forma genotipa ER $\alpha$ ; SL+LL). Poznato je da do hiperlipidemije dovode i okolišni i genetski čimbenici, te da su genetski značajniji u djetinjstvu, ali je polimorfizam ER $\alpha$  i hiperlipidemija rijetko istraživana u dječjoj populaciji. Jedna je japanska studija na školskoj djeci pronašla povezanost viših vrijednosti LDL-a s Xbal polimorfizmom (uz odsutnost iste povezanosti s Pnull polimorfizmom i to na način da odsutnost restriktivnih

mjesta djeluje na ovu vezu (97). Također, poznato je da je endogena razina estrogena ovisna o dobi i spolu, pa je u Rochester studiji pokazano da pojedini polimorfizmi, kao npr. Xbal imaju utjecaj na lipidogram u ispitanika mlađih od 15 godina, i to na način da drugačije utječu na lipidogram u ženskih i muških ispitanika, dok Pvull nema isti utjecaj (100). Naime, u navedenoj je studiji Xbal polimorfizam povezan s višim vrijednostima triglicerida u mladim ženskih ispitanika te višim vrijednostima apoC II u muških ispitanika. Autori zaključuju da različite genetske varijacije ER $\alpha$  imaju pleotropni utjecaj na metabolizam i razine lipida i lipoproteina, a u to se uklapaju i rezultati našeg istraživanja. Naime, do varijacija među studijama dolazi vjerovatno i zbog često malog uzorka ispitanika, kao što je i u ovom radu, uz prethodno opisanu mogućnost da duljina T/A ponavljanja ne utječe izravno, već preko neravnoteže povezanosti gena s drugim kodirajućim regijama. Kao što je već spomenuto, u studijama povezanosti duljine T/A ponavljanja i osteoporoze, također je „kratka“ alelna forma (SS) bila povezana sa sniženom gustoćom kosti („BMD“, od eng. *bone mineral density*) i povećanom vjerojatnošću osteoporotskih fraktura u postmenopauzalnih žena u talijanskoj populaciji, a isti je oblik pokazao i značajnu povezanost s istovremenom prisutnosti Pvull i Xbal polimorfizama (91). To govori u prilog da moguće postoji *linkage disequilibrium*, odnosno neravnoteža povezanosti genotipa duljine T/A ponavljanja i drugih najčešćih polimorfizama ER $\alpha$ , i to na način da je, suprotno očekivanjima, s njima povezana SS „kratka“ alelna forma (92). Ovo bi moglo objasniti i prijašnje diskrepance studije polimorfizama ER $\alpha$  u osteoporozi, ali i metabolizmu lipida, pa i u koronarnoj bolesti.



## 6.2. Polimorfizam gena IL-6 u bolesnika s ranom koronarnom bolešću i njihovih potomaka

Prijašnja su preklinička istraživanja pokazala da IL-6 ima važan utjecaj u aterosklerotskom procesu (73, 74), kao što su klinička pokazala da su povišene serumske razine IL-6 povezane s koronarnom arterijskom bolesti (19, 75), pa se posljedično genetske varijacije IL-6 smatraju idealnim kandidatom kao genetski biomarker koronarne bolesti. Stoga su do sada funkcionalni polimorfizmi gena IL-6, i to osobito oni u promotorskoj regiji kao -174G>C i -572 G>C, ekstenzivno proučavani u koronarnoj bolesti, ali su rezultati bili oprečni. U posljednjih desetak godina postoji nekoliko meta-analiza koje su analizom svih dostupnih studija pokušale dovesti do definitivnih zaključaka (101-103). Prva od njih (101) je objavljena 2013. i uključila je 27 studija s 11580 bolesnika i 17103 kontrole te našla da polimorfizam -174G>C ne povećava rizik od koronarne bolesti (22 studije i 27812 ispitanika), za razliku od polimorfizma -572 G>C (13 studija, 9498 ispitanika), ali ni ova razlika nije potvrđena kada je analiza ograničena samo na europske populacije. Iduća meta-analiza iz 2015. je uključila 42 studije na 15145 ispitanika i 21496 kontrole i pronašla da polimorfizam -174G>C moguće povećava rizik koronarne bolesti kod bijelaca uz ograničavajući faktor heterogenosti studija, dok polimorfizam -572 G>C ne utječe na ovaj rizik kod bijelaca, a moguće je da ga smanjuje u kineskoj populaciji uz ograničavajući faktor manjeg broja studija (102). Naposljetku, meta-analiza iz 2018. je uključila 57 studija, a među njima je polimorfizam -174G>C analiziran u 47 studija na 15914 bolesnika i 18552 kontrole, a polimorfizam -572 G>C u 30 studija na 7806 ispitanika i 11636 kontrola te je za oba potvrđena povezanost s koronarnom arterijskom bolesti (103). Analize pak pojedinih populacija su pokazale da su oba polimorfizma značajna u azijskoj populaciji, dok je polimorfizam -174G>C povezan i s značajnim rizikom od koronarne bolesti u bijelaca, a polimorfizam -572 G>C s istim rizikom u afričkoj populaciji, te je heterogenost studija značajno smanjena subanalizama na ovaj način (103). Stoga je u našem radu na populaciji

bolesnika s ranom koronarnom bolesti analiziran polimorfizam -174G>C (GC i CC alelna forma) koji je potvrđen u 56% bolesnika. Iznenadujuće, u direktnih potomaka bolesnika s ranom koronarnom bolešću mutacija je nađena u njih čak 66%. Galimudi i sur. (104) su isti polimorfizam analizirali u bolesnika s koronarnom bolesti i njihovih rođaka 'u prvom koljenu' (eng. *'first degree relatives'*) i pronašli mutaciju u 64% bolesnika s koronarnom bolesti, 56% rođaka, dok je u zdravih kontrola ista mutacija bila prisutna u samo njih 43%. Nedostatak zdravih kontrola je i glavni nedostatak naše studije, no prema dostupnim saznanjima, po prvi puta je analiziran ovaj polimorfizam u djece bolesnika s ranom koronarnom bolesti i na ovaj način moguće ukazano na vrijedan rani biomarker za razvoj koronarne bolesti. Naime, poznato je da rizik za koronarnu bolest koji proizlazi iz genetskog uzroka u prosjeku proizlazi iz istog genetskog uzroka unutar iste obitelji (105). U ovoj studiji nije određivana serumska koncentracija IL-6, no ranije spomenuta studija (Galimudi i sur.) je pokazala da ona ovisi o prisutnosti mutacije na način da homozigoti (CC) imaju više koncentracije IL-6 od heterozigota (GC) i onih s „divljim” tipom (GG) i to tako da su koncentracije najniže kod zdravih kontrola, više u rođaka u prvom koljenu, a najviše u bolesnika s koronarnom bolesti, što još jednom potvrđuje ulogu IL-6 u patogenezi koronarne bolesti. Osim toga, IL-6 regulira sintezu CRP-a u jetri, a u ovom radu je određivana razina CRP-a u odnosu na genotip IL-6. CRP u plazmi je dobar surogat razine IL-6, vjerovatno zato jer je ekspresija gena CRP osjetljiva na male promjene razine IL-6 (78). Iako je medijan razine CRP-a u bolesnika s „divljim” tipom IL-6 u ovoj studiji bio nešto niži (3.03) od bolesnika s homozigotnom i heterozigotnom alelnom formom (GC + CC; 4.20), ova razlika nije bila statistički značajna. No znatno veći broj koronarnih bolesnika s homozigotnom i heterozigotnom alelnom formom je imao povišene vrijednosti CRP-a u odnosu na referentne vrijednosti (<5 g/dL) u usporedbi s bolesnicima s „divljim” tipom, odnosno njih 32% u odnosu na 18%. Isto su pokazali i Galimudi i sur., u čijoj je studiji razina CRP-a bila značajno viša u bolesnika s koronarnom

bolešću u odnosu na zdrave kontrole. Također, razina CRP-a se pokazala značajno višom i u rođaka bolesnika s koronarnom bolešću u usporedbi sa zdravim kontrolama. Nažalost u ovom radu nije ispitana razina CRP-a u potomaka s nasljeđenim polimorfizmom IL-6, što bi dodatno doprinjelo prijašnjim saznanjima i moglo ukazivati na njihov povećani rizik od koronarne bolesti u budućnosti. Osobito zato što je u prospektivnim istraživanjima pokazano da visoka razina CRP-a trostruko povećava rizik od ACS-a u zdravih muškaraca, ali i u manje rizičnih skupina kao što su žene (106). Stoga se danas sve više pozornosti u liječenju ateroskleroze usmjerava ne samo na korekciju lipidograma, već i na protuupalno liječenje. Naime, recentna su randomizirana istraživanja pokazala da anti-citokinska i protu-upalna terapija snižavanjem razina IL-6 i CRP-a u plazmi može smanjiti i stopu kardiovaskularnih događaja, i to osobito ako se razina CRP-a snizi na manje od 2 g/dL (107, 108). Naposljetku, najnoviji podaci pokazuju da je ziltivekimab (novo anti-IL-6 monoklonsko protutijelo) vrlo učinkovit i siguran lijek za snižavanje CRP-a i to na način da učinak ovisi o dozi (109), a to saznanje je otvorilo put početku ispitivanja tog lijeka u prevenciji kardiovaskularnih događaja u populacijama visokog rizika (NCT05021835).

### 6.3. FMD kao pokazatelj endotelne disfunkcije u potomaka bolesnika s ranom koronarnom bolešću

Kao što je ranije opisano, endotelna disfunkcija ima ključnu ulogu u pokretanju procesa ateroskleroze koji prethodi asimptomatskim promjenama na koronarnim arterijama, a koje pak prethode kliničkim manifestacijama koronarne bolesti. Funkcija endotela može se procijeniti neinvazivno, na perifernim arterijama, pomoću ultrazvučnog testa protokom posredovane dilatacije (FMD-om). FMD predstavlja dilataciju provodne arterije ovisnu o endotelu, u velikoj mjeri posredovanu s NO, a kao odgovor na namjerno izazvano povećanje protoka krvi i žilni stres. FMD dobro korelira s funkcijom endotela koronarnih arterija, pod

utjecajem je kardiovaskularnih čimbenika rizika i neovisno predviđa ishod kardiovaskularnih bolesti. Sukladno tome, FMD je dobar alat za ispitivanje patofiziologije kardiovaskularnih bolesti i moguće identificiranje bolesnika s povećanim rizikom za buduće kardiovaskularne događaje. Također, ima vrijednost u ispitivanju akutnih i dugoročnih utjecaja fizioloških i farmakoloških intervencija na ljudima. Glavni nedostatak tog testa predstavlja slaba reproducibilnost, no dokazano je da se pouzdana mjerenja mogu postići kada se slijede standardizirani protokoli. Postoji nekoliko meta-analiza koje su analizirale dostupne studije i potvrdile prognostičku vrijednost FMD-a za kardiovaskularne bolesti (110-113). One zajedno pokazuju da svako povećanje FMD-a za 1% smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti za 8-13%, i to u populacijama visokog i niskog rizika, iako je rizik izraženiji u bolesnika s već verificiranom kardiovaskularnom bolesti. Posljednja od ovih meta-analiza je objavljena 2015., te je ona sveobuhvatnija od ostalih, jer je uključila 35 FMD studija između 2007. i 2014.godine i 17 280 bolesnika (112). Od toga je ukupno 16 studija provedeno u istočnoj Aziji (Kina, Južna Koreja i Japan), 13 studija u Europi (Austrija, Danska, Grčka, Italija, Srbija, Španjolska i Švedska) i 8 u Sjevernoj Americi (Kanada i Sjedinjene Američke Države). Također, između tih 35 studija, 13 je provedeno na populacijama bez kardiovaskularnih bolesti, a 22 na bolesnicima s već razvijenim kardiovaskularnim bolestima. Studije su bile heterogene no rizik za predviđanje kardiovaskularnih bolesti bio je značajan po skupinama, kao i ukupni rizik (za 1% porasta FMD-a: neprilagođeni je iznosio RR 0.88, 95% CI 0.86–0.91, a prilagođeni RR 0.88, 95% CI 0.84–0.91, odnosno porast za jednu standardnu devijaciju smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti za 50%). Također, poremećeni FMD povezan je s klasičnim rizičnim faktorima za kardiovaskularne bolesti kao što su dob, hipertenzija i debljina, dok u studiji koja je uključivala Framingham Heart Study kohortu (n=7031) nije dokazana povezanost s hiperlipidemijom, pušenjem i dijabetesom (114). No, FMD nije uspio pokazati dodatnu vrijednost na klasične kardiovaskularne faktore u smislu

bolje diskriminacije i rekvalifikacije (115). U multietničkoj studiji ateroskleroze (MESA od eng. Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis) FMD nije povećao diskriminativnu moć ili indeks neto reklasifikacije u usporedbi s Framingham rizičnim skorom (116). Pa ipak, niska reproducibilnost FMD-a u kojoj je korelacijski koeficijent bio 0.54 (gori nego u ostalim studijama sa zdravim dobrovoljcima (117, 118) i kardiovaskularnim bolesnicima (119, 120) mogla je pridonijeti ovim negativnim rezultatima. Alternativno, FMD možda jednostavno odražava složeni rizik koji utječe na funkciju krvnih žila i stoga ne pruža inkrementalno predviđanje rizika. Europsko kardiološko društvo mišljenja je da je FMD vrijedan istraživački alat (120), no zbog loše standardizacije trenutno nije preporučen za procjenu kardiovaskularnog rizika (razina dokaza III) (121, 122). Ipak danas postoji konzenzus stručnjaka u sklopu Europskog kardiološkog društva za izvođenje FMD-a namijenjen standardizaciji izvođenja ove pretrage i potencijalnom budućem omogućavanju njegove kliničke upotrebe (79).

Cilj našeg rada bio je ispitati FMD u zdravoj populaciji djece s pozitivnom obiteljskom anamnezom i s nasljednim genetskim rizičnim faktorima za koronarnu bolest – polimorfizmima gena za ER $\alpha$  i IL-6. Dobiveni rezultati pokazali su trend nižeg FMD-a u bolesnika s nasljeđenom homozigotnom alelnom formom bilo genotipa ER $\alpha$  (LL) bilo IL-6 (CC), no ta razlika nije bila statistički značajna. Najniže su vrijednosti FMD-a izmjerene u bolesnika koji su naslijedili homozigotnu formu i genotipa ER $\alpha$  i IL-6 (LL + CC) – medijan vrijednosti FMD-a u ovih bolesnika iznosio je 4.30 (raspon, 1.80-9.94), što je niže od normalnih vrijednosti FMD-a izmjerenih u većini studija, iako vrijednosti znatno variraju između pojedinih ustanova te ih je teško uspoređivati. U ranije spomenutoj meta-analizi, srednja je vrijednost FMD-a varirala od 4.7 do 9.1% (medijan 5.8, interkvartilni raspon 4.8-8.7), čak i u bolesnika s kardiovaskularnim bolestima (112). Nedavna je studija nastojala odrediti referentne vrijednosti FMD-a analizom 1579 zdravih pojedinaca u 44 studije, no oni su, za razliku od ovog istraživanja, bili odrasli ispitanici od 18-76 godina (123). Ta je studija pokazala

normalnu distribuciju FMD-a među studijama i obrnutu korelaciju s dobi, BMI, glukozom, kolesterolom, krvnim tlakom i promjerom brahijalne arterije u univarijatnim analizama. U multivarijatnoj su analizi kao prediktori lošijeg FMD-a potvrđeni dob, BMI, pušenje i promjer brahijalne arterije. Osobe u visokoj FMD tercili (>6,8%) bile su mlađe, imale su manji promjer brahijalne arterije, niži krvni tlak i kolesterol. U osoba s niskim i srednjim fatalnim kardiovaskularnim rizikom (SCORE), 26% odnosno 53% osoba imalo je FMD vrijednosti u niskoj tercili (<5,4%). Nakon dodavanja podataka od 385 bolesnika sa stabilnom koronarnom bolešću, ROC analiza ( $c = 0,841$ ,  $p < 0,001$ ) pokazala je da FMD od >6,5% isključuje koronarnu bolest s 95% osjetljivošću i 60% specifičnošću, a FMD <3,1% isključuje 95% zdravih osoba s 31% osjetljivošću i 95% specifičnošću. Također, meta-analiza i meta-regresija 82 klinička ispitivanja s 3509 ispitanika u 11 zemalja, koristeći sličnu metodologiju, pokazala je da je, unatoč značajnoj heterogenosti, FMD u zdravih odraslih osoba u prosjeku iznosi 6,4% (95% CI: 6,2% , 6,7%) bez značajnih razlika između zemalja, ali sa značajnim smanjenjem vezanim uz dob (-0,3% po desetljeću).

No, unatoč raširenoj upotrebi FMD-a, uključujući pedijatrijske studije, nema objavljenih referentnih normativnih vrijednosti FMD-a u djece, tako da je teško uspoređivati 'abnormalni' FMD u ovom istraživanju i između pojedinih studija. Postoji jedna studija koja je procjenjivala povezanost dobi, spola i FMD-a u zdrave djece i adolescenata (124). Ta je studija pokazala da postoje razlike u FMD-u vezane uz dob i spol, no tek nakon šesnaeste godine – odnosno u dječaka i mladića se prati sniženje FMD-a nakon puberteta i tek u dobi od 17 i 18 godina imaju značajno niži FMD od djevojčica i djevojaka iste dobi. To dovodi do zaključka da je za djecu od 6-16 godina prikladna jedna te ista referentna vrijednost neovisna o spolu– između 7.7 i 8.2 %. U našoj smo populaciji također primijetili niže vrijednosti FMD-a u ženskih potomaka u usporedbi s muškim, no ova je usporedba otežana činjenicom da je medijan dobi muških potomaka bio 18 godina, a ženskih 15 godina. No, medijan dobi cijele populacije u ovom

istraživanju je iznosio 16 godina; te prema gore spomenutoj studiji djeca koja su naslijedila homozigotnu formu bilo genotipa za ER $\alpha$  bilo za IL-6 (LL ili CC) imaju patološke vrijednosti FMD-a (medijan 6.54 u LL alelna forme genotipa ER $\alpha$ , a 6.825 u CC alelna forme genotipa IL-6), dok je medijan vrijednosti FMD-a za djecu s obje homozigotne forme i ER $\alpha$  i IL-6 (LL+CC) znatno ispod referentnih vrijednosti (medijan 4.30). Ova vrijednost je i gotovo dvostruko niža od djece s oba „divlja” tipa genotipa ER $\alpha$  i IL-6, kod kojih je medijan FMD-a iznosio 8.20 i prema gore spomenutoj studiji bio unutar referentnih vrijednosti. Odnosno, rezultati našeg ispitivanja govore u prilog mogućeg postojanja endotelne disfunkcije u potomaka bolesnika s ranom koronarnom bolesti koji su naslijedili homozigotnu formu genotipa bilo za ER $\alpha$  bilo za IL-6 (LL ili CC) te vjerovatne endotelne disfunkcije u potomaka bolesnika s ranom koronarnom bolesti koji su naslijedili homozigotne forme oba genotipa (LL+CC).

Prema dostupnim saznanjima, naše istraživanje je prvo koje je analiziralo FMD u djece s nasljeđenim genetskim rizičnim faktorima za koronarnu bolest u obliku polimorfizama ER $\alpha$  i IL-6. Ranije studije su ispitivale endotelnu disfunkciju u djece s klasičnim rizičnim faktorima kao što su dijabetes, debljina i hiperlipidemija. Tako je recentna meta-analiza analizirala FMD u djece s dijabetesom tip 1 i uključila 19 studija s 1245 bolesnika i 872 kontrola te pokazala da je FMD značajno niži u djece s dijabetesom u usporedbi sa zdravim kontrolama, odnosno dokazala da endotelna disfunkcija u osoba s dijabetesom kao rizičnim faktorom za aterosklerozu počinje u djetinjstvu (125). Također, ta je studija pokazala da je razlika u FMD-u povezana s višim razinama LDL-a u djece s dijabetesom, a slično su pokazale i studije u djece s debljinom. Naime, većina studija u djece s debljinom je potvrdila niže vrijednosti FMD-a u usporedbi s djecom s normalnim BMI-om, a također djeca s prekomjernom težinom i višim vrijednostima LDL-a su imali niže vrijednosti FMD-a u odnosu na kontrole (126). Također je pokazano, i to prospektivno, da vrijednost FMD-a opada tijekom

praćenja u djece s nasljednom hiperkolesterolemijom, a neovisni prognostički faktori za ovaj pad u FMD-u predstavljaju muški spol, ulazak u pubertet i porast u BMI (127).

Prema dostupnim saznanjima, ne postoje studije koje su analizirale FMD u zdravih osoba s nasljednim genetskim rizičnim faktorima za koronarnu bolest u obliku duljine T/A ponavljanja gena za ER $\alpha$ , a postoji tek jedna studija koja je ispitala FMD u zdravih dobrovoljaca s polimorfizmom gena za IL-6 koji je analiziran u ovom radu (-174G > C) (128). Ta je studija pokazala da IL-6 polimorfizam (homozigotna forma CC) utječe na endotelnu funkciju i snižava vrijednosti FMD-a, no samo u muških osoba.

Iako su rezultati ovog istraživanja u skladu s prijašnjim studijama, važno je istaknuti glavni nedostatak prijašnjih studija, pa tako i ovog rada, a to je otežana reproducibilnost FMD-a. Iako u svrhu standardizacije postoji europski konzenzus čije smo preporuke slijedili u ovom radu (sažete su u Tablici 1), ipak je bilo prepreka koje su ujedno i najveće ograničenje ovog istraživanja. Naime, ispravno izvođenje FMD-a podrazumijeva mnoge čimbenike uključujući adekvatnu pripremu ispitanika, standardizaciju protokola, odgovarajuću tehniku, analizu i edukaciju operatera.

Priprema ispitanika je važna jer mnogo čimbenika može utjecati na FMD, kao što su hrana, alkohol, pušenje, suplementi, lijekovi, fizička aktivnost i mentalni stres (129-132). Stoga se preporuča da su ispitanici prije izvođenja FMD-a natašte barem 6 sati, da nisu fizički vježbali barem 24 sata te da nisu uzimali kofein, alkohol, vitamin C, polifenole i suplemente barem 12 sati prije FMD-a. Ispitanicima i njihovim roditeljima ovo je bilo detaljno objašnjeno, no treba uzeti u obzir da se radilo o djeci i stoga se ne može s potpunom sigurnošću govoriti da je priprema bila uvijek sukladna s propisanim, odnosno općim preporukama. Nadalje, obzirom da akutni stres može poremetiti FMD (132,133), test se izvodio u tihoj, ugodnoj prostoriji nakon standardnog perioda odmora u supinaciji u trajanju od 10 min, a obzirom na dnevne varijacije FMD-a (134), svi su testovi



učinjeni u jutarnjim satima. No, ono na što se nije mogli utjecati, a moglo je utjecati na rezultate su ostali faktori koji dokazano utječu na FMD, kao npr. vanjska temperatura, kalendarski dio godine te onečišćenje zraka (135-137). Naposljetku, dokazane su i varijacije u FMD-u ovisno o menstrualnom ciklusu (138), no logistički je bilo nemoguće izvesti test svim ženskim potomcima s menstruacijom u istom dijelu ciklusa.

Što se tiče protokola snimanja, to je također bilo u skladu s preporukama Europskog konsenzusa, gdje se preporuča distalni položaj manžete od ispitivane arterije. Naime, iako neke studije govore u prilog proksimalnog položaja s argumentom da okluzija većeg područja može dovesti do jače dilatacije i povećati snagu testa (139, 140), a postoje i meta-analize koje govore da nema razlike između proksimalnog i distalnog položaja (141), distalni se položaj ipak preporučuje iz razloga što je ovdje odgovor na okluziju 70% posredovan s NO, za razliku od proksimalnog gdje je to samo 30%, a u većoj mjeri drugim medijatorima (142). Budući da se FMD mjeri kao razlika u odnosu na bazalni promjer krvne žile, važno je ispravno izmjeriti bazalni promjer, te se preporuča izmjeriti onaj prije napuhivanja manžete, obzirom da se pokazalo da postoje varijacije u promjeru pri kraju ishemije (odnosno kraju vremena napuhane manžete). Naime, neke su studije pokazale vazokonstrikciju arterija u tom trenutku, dok su druge pokazale da kod mlađih bolesnika u istom trenutku promjer arterije može biti i veći u odnosu na onaj prije napuhivanja manžete (143). Preporučeno trajanje okluzije je 5 minuta obzirom da kraće vrijeme može dovesti do neadekvatne dilatacije (144). Također, obzirom da postoje vremenske varijacije za trenutak najvećeg promjera, osobito u usporedbi sa zdravom populacijom (145-148), nastojali smo dilataciju kontinuirano mjeriti 3 minute nakon otpuštanja manžete.

No, na FMD uz endotelnu disfunkciju može utjecati i funkcionalnost vaskularnih glatkih mišićnih stanica, pa smanjena funkcionalnost može rezultirati smanjenim kapacitetom odgovora na NO, dok pojačani odgovor glatkih mišićnih stanica

može biti prisutan u endotelnoj disfunkciji (149, 150). Stoga smjernice preporučaju i ispitivanje endotel-neovisne disfunkcije, a to se može učiniti uz pomoć testa s primjenom gliceril-trinitrata sublingvalno, najbolje 10 minuta nakon FMD testa. Obzirom da su ispitanici bili djeca, a nuspojave primjene gliceril-trinitrata uključuju hipotenziju i glavobolju, u ovom istraživanju nije ispitivana endotel-neovisna disfunkcija.

Nadalje, tehnika korištena za FMD je odgovarala preporukama: mjeren je promjer brahijalne arterije koristeći B-modalitet ultrazvuka visoke rezolucije, kao i brzinu pulsog vala dopplerom s kutom insonacije od 60 stupnjeva, kako bi oba modaliteta mogla održati osnovne principe i optimalna mjerenja (151), a analiza je bila automatizirana zbog brojnih prednosti nad manualnim računanjem (152-155). No, treba naglasiti da je korišten software s automatiziranim algoritmima za izračun najvećeg promjera, koji FMD odmah izražava kao relativnu (u %), a ne apsolutnu (u mm) promjenu promjera, bez izražavanja srednje brzine i stope sile smicanja, koje je prema preporukama preporučeno izraziti.

Naposljetku, najvažniji razlog za varijabilnost FMD-a među studijama je iskustvo laboratorija i ispitivača, te je reproducibilnost dokazano bolja u “iskusnijih” laboratorija (118). Činjenica da FMD-a nije standardna pretraga u laboratoriju je također mogla utjecati na rezultate, no unatoč tome, ispitivanje je izvođeno pod vodstvom iskusnog ultrasoničara koji izvođenjem više od 100 ultrazvuka godišnje spada u kategoriju kompetentnih izvođača FMD-a (156).

Pa ipak, unatoč navedenim izazovima, FMD je u ovom ispitivanju u najvećoj mjeri učinjen u skladu s postojećim preporukama, te smo mišljenja da je reproducibilnost FMD-a u našoj studiji bila zadovoljavajuća, a tome u prilog govore i dobiveni rezultati koji su u skladu s postavljenom hipotezom i ranije objavljenim studijama.

## 7. ZAKLJUČCI

### 1. Polimorfizam $ER\alpha$ ima visoku učestalost u bolesnika s ranom koronarnom bolešću i njihovih potomaka.

U ovom istraživanju je ispitivan polimorfizam duljine T/A ponavljanja gena  $ER\alpha$  i pronađen polimorfizam s barem jednom „dugom“ alelnom formom (LL+SL) u 76% bolesnika s ranom koronarnom bolešću, što je viša prevalencija od one opisane u općoj populaciji. Također, po prvi put je određeno postojanje ovog polimorfizma u potomaka bolesnika s ranom koronarnom bolešću, te polimorfizam s barem jednom „dugom“ alelnom formom (LL+SL) pronađen u 78% svih potomaka, odnosno u čak 87% potomaka roditelja s koronarnom bolesti i prisutnom barem jednom „dugom“ alelnom formom. Ovo upućuje na moguću ulogu tog polimorfizma u patogenezi rane koronarne bolesti, no potrebne su daljnje studije da bi se ona ispitala.

### 2. Polimorfizam $ER\alpha$ utječe na lipidogram bolesnika s ranom koronarnom bolešću i njihovih potomaka.

Prema dostupnim saznanjima, u ovom je istraživanju po prvi put ispitana povezanost polimorfizma duljine T/A ponavljanja gena  $ER\alpha$  i lipidograma u bolesnika s ranom koronarnom bolešću i njihovih potomaka. Muški bolesnici s „divljim“ tipom (s „kratkim“ alelnom formom, SS) imaju tendenciju viših vrijednosti triglicerida i nižih vrijednosti HDL-a, a muški potomci bolesnika s ranom koronarnom bolešću s istom SS „kratkim“ alelnom formom tendenciju viših vrijednosti ukupnog kolesterola i triglicerida te statistički značajno višu razinu LDL-a u odnosu na muške potomke s „dugom“ (LL) i „miješovitom“ (SL) alelnom formom. Ova povezanost govori u prilog mogućeg utjecaja duljine T/A ponavljanja na lipidogram putem *linkage disequilibrium-a* odnosno neravnoteže

povezanosti duljine T/A ponavljanja i drugih polimorfizama ER $\alpha$ , no ovu je vezu potrebno dodatno istražiti.

### **3. Polimorfizam IL-6 ima visoku učestalost u bolesnika s ranom koronarnom bolešću i njihovih potomaka.**

Homozigotna (CC) i heterozigotna (GC) alelna forma istraživanih polimorfizama IL-6 (174G>C) nađena je u 56% bolesnika s ranom koronarnom bolešću, te u čak 66% potomaka bolesnika s ranom koronarnom bolešću, što je značajno više od ranije opisanih kontrola. Iako bez kontrolne skupine, po prvi puta je analiziran taj polimorfizam u potomaka bolesnika s ranom koronarnom bolešću te moguće ukazano na vrijedan rani biomarker za razvoj koronarne bolesti koji zahtijeva daljnja istraživanja.

### **4. Polimorfizam IL-6 moguće utječe na plazmatske razine CRP-a u bolesnika s ranom koronarnom bolešću i njihovih potomaka**

U ovom istraživanju je 32% bolesnika s ranom koronarnom bolešću i homozigotnom (CC) ili heterozigotnom (GC) alelnom formom ispitivanog polimorfizma IL-6 imalo povišene vrijednosti CRP-a u odnosu na referentne vrijednosti (<5 mg/L) u usporedbi s 18% bolesnika s ranom koronarnom bolešću s „divljim“ tipom (GG alelna forma). Ispitivanje razine CRP-a u potomaka s nasljeđenim polimorfizmom IL-6 moglo bi biti predmet daljnjih istraživanja, što bi dodatno doprinjelo ranijim saznanjima i moglo ukazivati na njihov povećani rizik od koronarne bolesti u budućnosti.

**5. Potomci bolesnika s ranom koronarnom bolešću koji su naslijedili homozigotnu formu polimorfizma ER $\alpha$  i/ili homozigotnu formu polimorfizma IL-6 imaju snižene vrijednosti FMD-a**

Potomci bolesnika s ranom koronarnom bolešću s homozigotnom formom polimorfizma ER $\alpha$  (LL, „duga“ alelna forma) i IL-6 (CC alelna forma) imali su niže medijane izmjerenih vrijednosti FMD-a u odnosu na heterozigote i one s „divljim“ tipom, iako ne statistički značajno. Potomci s istovremeno prisutne homozigotne forme oba polimorfizma imali su gotovo dvostruko niži medijan vrijednosti FMD-a od potomaka s „divljim“ tipom oba polimorfizma - odnosno FMD od 4,30% naspram 8,20%. Prema jedinoj ranijoj studiji FMD-a u dječjoj populaciji, vrijednost izmjerena u ovom istraživanju u potomaka s homozigotnom formom jednog ili oba polimorfizma je ispod referentnih vrijednosti, dok je vrijednost izmjerena u potomaka s „divljim“ tipom unutar istih. Ovo govori u prilog moguće već prisutne endotelne disfunkcije u djece bolesnika s ranom koronarnom bolesti i potencijalne vrijednosti FMD-a u njenom detektiranju, ali su potrebna dodatna ispitivanja.

## 8. SAŽETAK

Estrogeni štite od endotelne disfunkcije te djeluju na metabolizam lipida, a određeni su polimorfizmi u genu  $ER\alpha$  u ranijim studijama povezivani s koronarnom bolešću. IL-6 pak ima centralnu ulogu u procesu upale, te je polimorfizam gena za IL-6 kao i plazmatske koncentracije IL-6 i CRP-a ranije povezan s ACS-om. Funkcija endotela se može procijeniti neinvazivno i na perifernim arterijama, pomoću ultrazvučnog testa FMD. Cilj ovog istraživanja bio je analizirati povezanost polimorfizma gena  $ER\alpha$  (duljina T/A ponavljanja) i polimorfizma gena IL-6 (174G>C) u potomaka bolesnika s ranom koronarnom bolešću s endotelnom disfunkcijom korištenjem FMD metode. Pritom je analizirana i prevalencija ovih polimorfizama u obje populacije, povezanost polimorfizma gena  $ER\alpha$  i patoloških vrijednosti lipidograma, kao i povezanost polimorfizma gena IL-6 i patoloških vrijednosti plazmatskog CRP-a. Rezultati ovog rada su pokazali visoku pojavnost heterozigotne i homozigotne „duge“ alelne forme polimorfizma  $ER\alpha$  u bolesnika s ranom koronarnom bolesti - u čak 76% njih te visoku pojavnost heterozigotne i homozigotne alelne forme polimorfizma IL-6, prisutne u 56% bolesnika. Pritom je prvi puta istražena učestalost ovih polimorfizama u djece potomaka ranih koronarnih bolesnika, koja je nađena u 78% za polimorfizam  $ER\alpha$  i 66% za polimorfizam IL-6. Također, „kratka“ alelna forma polimorfizma  $ER\alpha$  („divlji“ tip) u ovom radu imala je utjecaj na vrijednosti plazmatskih lipida u muških bolesnika i muških potomaka koji su imali statistički značajno više vrijednosti LDL-a. Isto tako, prisustvo homozigotne i heterozigotne alelne forme polimorfizma IL-6 bilo je povezano s povišenim vrijednostima CRP-a u 32% bolesnika s ranom koronarnom bolešću naspram njih 18% s „divljim“ tipom. Potomci bolesnika s ranom koronarnom bolešću s nasljeđene obje homozigotne forme polimorfizma  $ER\alpha$  i IL-6 su imali najniže izmjerene vrijednosti FMD-a s dvostruko nižim medijanom od potomaka s „divljim“ tipom oba polimorfizma. Zaključno, ova studija govori u prilog

moćuće uloge polimorfizma gena ER $\alpha$  i IL-6 u endotelnoj disfunkciji prema pokazateljima dobivenim FMD metodom, no potrebna su dodatna istraživanja kako bi se procijenila njihova potencijalna upotreba kao biomarkera rane koronarne bolesti.

## 9. SUMMARY

### **Correlation of estrogen receptor alfa gene and interleukin 6 polymorphism with endothelial function in asymptomatic descendants of patients with early coronary disease and acute coronary syndrome**

Zoran Miovski, 2023.

Estrogens protect from endothelial dysfunction as well as affect lipid metabolism and certain polymorphisms in the ER $\alpha$  gene have been associated with coronary disease in earlier studies. IL-6 plays a central role in the inflammation process, and polymorphism of the IL-6 gene as well as plasma concentrations of IL-6 and CRP, were also associated with ACS in previous studies. Endothelial function can be assessed non-invasively on peripheral arteries, using the FMD test. The aim of this research was to analyze the association of ER $\alpha$  gene polymorphism (T/A repeat length) and IL-6 gene polymorphism (174G>C) in the offspring of patients with early coronary disease and endothelial dysfunction using the FMD method. This study analyzed the prevalence of these polymorphisms in both populations, as well as the association of ER $\alpha$  gene polymorphism with pathological lipidogram values, as well as the association of IL-6 gene polymorphism with pathological plasma CRP values. Study showed a high incidence of heterozygous and homozygous "long" allelic forms of the ER $\alpha$  polymorphism in patients with early coronary disease - in as many as 76% of them, and a high incidence of heterozygous and homozygous allelic forms of the IL-6 polymorphism, present in 56% of patients. This study is the first to investigate the frequency of these polymorphisms in the children early coronary patients, and found them in 78%



for the ER $\alpha$  polymorphism and 66% for the IL-6 polymorphism. Also, the "short" allelic form of the ER $\alpha$  polymorphism ("wild" type) in our study had an impact on plasma lipid values in male patients and male offsprings, who had significantly higher LDL values. Likewise, the presence of homozygous and heterozygous allelic forms of the IL-6 polymorphism was associated with increased CRP values in 32% of patients with early coronary disease compared to 18% with the "wild" type. The offspring of patients with early coronary disease who inherited both homozygous forms of the ER $\alpha$  and IL-6 polymorphisms had the lowest measured FMD values with a median twice as low as the offspring with the "wild" type of both polymorphisms. In conclusion, this study supports the possible role of ER $\alpha$  and IL-6 polymorphism in the endothelial dysfunction detected with FMD, but additional studies are needed in order to investigate their potential use as a biomarker of early coronary disease.

## 10. POPIS LITERATURE

1. Bueno H. Epidemiology of acute coronary syndromes. In: Camm JA, Lown B, Serruys PW, editor. ESC CardioMed: Oxford University Press; 2018.
2. Wilkins E, Wickramasinghe K, Bhatnagar P, Leal J, Luengo-Fernandez R, Burns R i sur. European Cardiovascular Disease Statistics 2017.
3. HZJZ. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2017.godinu.
4. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA i sur. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation*. 2018;138(20):e618-e51.
5. Kumar A, Cannon CP. Acute coronary syndromes: diagnosis and management, part I. *Mayo Clin Proc*. 2009;84(10):917-38.
6. Wissler RW, Strong JP. Risk factors and progression of atherosclerosis in youth. PDAY Research Group. Pathological Determinants of Atherosclerosis in Youth. *Am J Pathol*. 1998;153(4):1023-33.
7. Davies MJ. The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart*. 2000;83(3):361-6.
8. Andersson C, Naylor M, Tsao CW, Levy D, Vasan RS. Framingham Heart Study: JACC Focus Seminar, 1/8. *J Am Coll Cardiol*. 2021;77(21):2680-92.
9. Kinlay S, Libby P, Ganz P. Endothelial function and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol*. 2001;12(4):383-9.
10. Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation*. 1994;90(2):775-8.
11. van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is

- characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation*. 1994;89(1):36-44.
12. Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J*. 1993;69(5):377-81.
  13. Sukhova GK, Schönbeck U, Rabkin E, Schoen FJ, Poole AR, Billingham RC i sur. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation*. 1999;99(19):2503-9.
  14. Herman MP, Sukhova GK, Libby P, Gerdes N, Tang N, Horton DB i sur. Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling. *Circulation*. 2001;104(16):1899-904.
  15. Schoenhagen P, Ziada KM, Kapadia SR, Crowe TD, Nissen SE, Tuzcu EM. Extent and direction of arterial remodeling in stable versus unstable coronary syndromes : an intravascular ultrasound study. *Circulation*. 2000;101(6):598-603.
  16. von Birgelen C, Klinkhart W, Mintz GS, Papatheodorou A, Herrmann J, Baumgart D i sur. Plaque distribution and vascular remodeling of ruptured and nonruptured coronary plaques in the same vessel: an intravascular ultrasound study in vivo. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37(7):1864-70.
  17. Rauch U, Osende JJ, Fuster V, Badimon JJ, Fayad Z, Chesebro JH. Thrombus formation on atherosclerotic plaques: pathogenesis and clinical consequences. *Ann Intern Med*. 2001;134(3):224-38.
  18. Tanaka A, Shimada K, Sano T, Namba M, Sakamoto T, Nishida Y i sur. Multiple plaque rupture and C-reactive protein in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(10):1594-9.

19. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*. 2000;101(15):1767-72.
20. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-26.
21. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J i sur. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation*. 2003;108(14):1664-72.
22. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J i sur. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation*. 2003;108(15):1772-8.
23. Early effects of tissue-type plasminogen activator added to conventional therapy on the culprit coronary lesion in patients presenting with ischemic cardiac pain at rest. Results of the Thrombolysis in Myocardial Ischemia (TIMI IIIA) Trial. *Circulation*. 1993;87(1):38-52.
24. Sullivan E, Kearney M, Isner JM, Topol EJ, Losorda DW. Pathology of Unstable Angina: Analysis of Biopsies Obtained by Directional Coronary Atherectomy. *J Thromb Thrombolysis*. 1994;1(1):63-71.
25. Moreno PR, Bernardi VH, López-Cuéllar J, Murcia AM, Palacios IF, Gold HK i sur. Macrophages, smooth muscle cells, and tissue factor in unstable angina. Implications for cell-mediated thrombogenicity in acute coronary syndromes. *Circulation*. 1996;94(12):3090-7.
26. Fosang AJ, Smith PJ. Human genetics. To clot or not. *Nature*. 2001;413(6855):475-6.
27. Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC i sur. A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med*. 1996;334(17):1090-4.

28. Conti CR, Brawley RK, Griffith LS, Pitt B, Humphries JO, Gott VL i sur. Unstable angina pectoris: morbidity and mortality in 57 consecutive patients evaluated angiographically. *Am J Cardiol.* 1973;32(6):745-50.
29. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H i sur. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2018;39(2):119-77.
30. Collet JP, Thiele H, Barbato E, Barthélémy O, Bauersachs J, Bhatt DL i sur. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J.* 2021;42(14):1289-367.
31. Knuuti J, Wijns W, Saraste A, Capodanno D, Barbato E, Funck-Brentano C i sur. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. *Eur Heart J.* 2020;41(3):407-77.
32. McEvoy JW, Blaha MJ, DeFilippis AP, Lima JA, Bluemke DA, Hundley WG i sur. Cigarette smoking and cardiovascular events: role of inflammation and subclinical atherosclerosis from the MultiEthnic Study of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(3):700-9.
33. Dessì M, Noce A, Bertucci P, Manca di Villahermosa S, Zenobi R, Castagnola V i sur. Atherosclerosis, dyslipidemia, and inflammation: the significant role of polyunsaturated Fatty acids. *ISRN Inflamm.* 2013;2013:191823.
34. Roever LS, Resende ES, Diniz AL, Penha-Silva N, Veloso FC, Casella-Filho A i sur. Abdominal Obesity and Association With Atherosclerosis Risk Factors: The Uberlândia Heart Study. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(11):e1357.

35. Alexander RW. Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension*. 1995;25(2):155-61.
36. Colwell JA, Lopes-Virella M, Halushka PV. Pathogenesis of atherosclerosis in diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 1981;4(1):121-33.
37. Towfighi A, Zheng L, Ovbiagele B. Sex-specific trends in midlife coronary heart disease risk and prevalence. *Arch Intern Med*. 2009;169(19):1762-6.
38. Vrijenhoek JE, Den Ruijter HM, De Borst GJ, de Kleijn DP, De Vries JP, Bots ML i sur. Sex is associated with the presence of atherosclerotic plaque hemorrhage and modifies the relation between plaque hemorrhage and cardiovascular outcome. *Stroke*. 2013;44(12):3318-23.
39. Spence JD, Pilote L. Importance of sex and gender in atherosclerosis and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2015;241(1):208-10.
40. Panagiotakos DB. Family history of coronary heart disease as a predictor of the incidence and progression of coronary artery calcification. *Atherosclerosis*. 2014;233(1):30-1.
41. Farhat MY, Lavigne MC, Ramwell PW. The vascular protective effects of estrogen. *Faseb j*. 1996;10(5):615-24.
42. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med*. 2002;346(5):340-52.
43. Mendelsohn ME. Genomic and nongenomic effects of estrogen in the vasculature. *Am J Cardiol*. 2002;90(1a):3f-6f.
44. Hodgins JB, Krege JH, Reddick RL, Korach KS, Smithies O, Maeda N. Estrogen receptor alpha is a major mediator of 17beta-estradiol's atheroprotective effects on lesion size in Apoe<sup>-/-</sup> mice. *J Clin Invest*. 2001;107(3):333-40.

45. Losordo DW, Kearney M, Kim EA, Jekanowski J, Isner JM. Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women. *Circulation*. 1994;89(4):1501-10.
46. Post WS, Goldschmidt-Clermont PJ, Wilhide CC, Heldman AW, Sussman MS, Ouyang P i sur. Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. 1999;43(4):985-91.
47. Sudhir K, Chou TM, Chatterjee K, Smith EP, Williams TC, Kane JP i sur. Premature coronary artery disease associated with a disruptive mutation in the estrogen receptor gene in a man. *Circulation*. 1997;96(10):3774-7.
48. Albagha OM, McGuigan FE, Reid DM, Ralston SH. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and bone mineral density: haplotype analysis in women from the United Kingdom. *J Bone Miner Res*. 2001;16(1):128-34.
49. Andersen TI, Heimdal KR, Skrede M, Tveit K, Berg K, Børresen AL. Oestrogen receptor (ESR) polymorphisms and breast cancer susceptibility. *Hum Genet*. 1994;94(6):665-70.
50. Nicolaiew N, Cancel-Tassin G, Azzouzi AR, Grand BL, Mangin P, Cormier L i sur. Association between estrogen and androgen receptor genes and prostate cancer risk. *Eur J Endocrinol*. 2009;160(1):101-6.
51. Lehrer S, Rabin J, Kalir T, Schachter BS. Estrogen receptor variant and hypertension in women. *Hypertension*. 1993;21(4):439-41.
52. Matsubara Y, Murata M, Kawano K, Zama T, Aoki N, Yoshino H i sur. Genotype distribution of estrogen receptor polymorphisms in men and postmenopausal women from healthy and coronary populations and its relation to serum lipid levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17(11):3006-12.
53. Herrington DM, Howard TD, Hawkins GA, Reboussin DM, Xu J, Zheng SL i sur. Estrogen-receptor polymorphisms and effects of estrogen

- replacement on high-density lipoprotein cholesterol in women with coronary disease. *N Engl J Med.* 2002;346(13):967-74.
54. Lehtimäki T, Kunnas TA, Mattila KM, Perola M, Penttilä A, Koivula T *i sur.* Coronary artery wall atherosclerosis in relation to the estrogen receptor 1 gene polymorphism: an autopsy study. *J Mol Med (Berl).* 2002;80(3):176-80.
55. Kunnas TA, Laippala P, Penttilä A, Lehtimäki T, Karhunen PJ. Association of polymorphism of human alpha oestrogen receptor gene with coronary artery disease in men: a necropsy study. *Bmj.* 2000;321(7256):273-4.
56. Pollak A, Rokach A, Blumenfeld A, Rosen LJ, Resnik L, Dresner Pollak R. Association of oestrogen receptor alpha gene polymorphism with the angiographic extent of coronary artery disease. *Eur Heart J.* 2004;25(3):240-5.
57. Miller VM, Mulvagh SL. Sex steroids and endothelial function: translating basic science to clinical practice. *Trends Pharmacol Sci.* 2007;28(6):263-70.
58. Davies PF, Spaan JA, Krams R. Shear stress biology of the endothelium. *Ann Biomed Eng.* 2005;33(12):1714-8.
59. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y *i sur.* A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 1988;332(6163):411-5.
60. Lüscher TF, Yang Z, Tschudi M, von Segesser L, Stulz P, Boulanger C *i sur.* Interaction between endothelin-1 and endothelium-derived relaxing factor in human arteries and veins. *Circ Res.* 1990;66(4):1088-94.
61. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID *i sur.* Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet.* 1992;340(8828):1111-5.



62. Hashimoto M, Kozaki K, Eto M, Akishita M, Ako J, Iijima K i sur. Association of coronary risk factors and endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery. *Hypertens Res.* 2000;23(3):233-8.
63. Gokce N, Keaney JF, Jr., Hunter LM, Watkins MT, Nedeljkovic ZS, Menzoian JO i sur. Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41(10):1769-75.
64. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Jr., Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42(7):1149-60.
65. Anderson TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol.* 1999;34(3):631-8.
66. Raitakari OT, Celermajer DS. Testing for endothelial dysfunction. *Ann Med.* 2000;32(5):293-304.
67. Celermajer DS. Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol.* 1997;30(2):325-33.
68. Clarkson P, Celermajer DS, Powe AJ, Donald AE, Henry RM, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilatation is impaired in young healthy subjects with a family history of premature coronary disease. *Circulation.* 1997;96(10):3378-83.
69. Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, Pandian NG, Rand WM, Udelson JE i sur. Peripheral vascular endothelial function testing as a noninvasive indicator of coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38(7):1843-9.
70. Yeboah J, Folsom AR, Burke GL, Johnson C, Polak JF, Post W i sur. Predictive value of brachial flow-mediated dilation for incident cardiovascular events in a population-based study: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Circulation.* 2009;120(6):502-9.

71. Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*. 2000;101(16):1899-906.
72. Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*. 1990;265(3):621-36.
73. Rus HG, Vlaicu R, Niculescu F. Interleukin-6 and interleukin-8 protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall. *Atherosclerosis*. 1996;127(2):263-71.
74. Seino Y, Ikeda U, Ikeda M, Yamamoto K, Misawa Y, Hasegawa T i sur. Interleukin 6 gene transcripts are expressed in human atherosclerotic lesions. *Cytokine*. 1994;6(1):87-91.
75. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med*. 2000;342(12):836-43.
76. Sinisalo J, Paronen J, Mattila KJ, Syrjälä M, Alfthan G, Palosuo T i sur. Relation of inflammation to vascular function in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 2000;149(2):403-11.
77. Hingorani AD, Cross J, Kharbanda RK, Mullen MJ, Bhagat K, Taylor M i sur. Acute systemic inflammation impairs endothelium-dependent dilatation in humans. *Circulation*. 2000;102(9):994-9.
78. Humphries SE, Luong LA, Ogg MS, Hawe E, Miller GJ. The interleukin-6 -174 G/C promoter polymorphism is associated with risk of coronary heart disease and systolic blood pressure in healthy men. *Eur Heart J*. 2001;22(24):2243-52.
79. Thijssen DHJ, Bruno RM, van Mil A, Holder SM, Fajta F, Greyling A i sur. Expert consensus and evidence-based recommendations for the assessment of flow-mediated dilation in humans. *Eur Heart J*. 2019;40(30):2534-47.

80. Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson J. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2015;29(4):557-68.
81. Vuorinen A, Odermatt A, Schuster D. Reprint of "In silico methods in the discovery of endocrine disrupting chemicals". *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015;153:93-101.
82. Kishi T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kawashima K i sur. A functional polymorphism in estrogen receptor alpha gene is associated with Japanese methamphetamine induced psychosis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2009;33(5):895-8.
83. Mansur Ade P, Nogueira CC, Strunz CM, Aldrighi JM, Ramires JA. Genetic polymorphisms of estrogen receptors in patients with premature coronary artery disease. *Arch Med Res.* 2005;36(5):511-7.
84. Shearman AM, Cupples LA, Demissie S, Peter I, Schmid CH, Karas RH i sur. Association between estrogen receptor alpha gene variation and cardiovascular disease. *Jama.* 2003;290(17):2263-70.
85. Shearman AM, Cooper JA, Kotwinski PJ, Miller GJ, Humphries SE, Ardlie KG i sur. Estrogen receptor alpha gene variation is associated with risk of myocardial infarction in more than seven thousand men from five cohorts. *Circ Res.* 2006;98(5):590-2.
86. Kjaergaard AD, Ellervik C, Tybjaerg-Hansen A, Axelsson CK, Grønholdt ML, Grande P i sur. Estrogen receptor alpha polymorphism and risk of cardiovascular disease, cancer, and hip fracture: cross-sectional, cohort, and case-control studies and a meta-analysis. *Circulation.* 2007;115(7):861-71.
87. Wei CD, Zheng HY, Wu W, Dai W, Tong YQ, Wang M i sur. Meta-analysis of the association of the rs2234693 and rs9340799 polymorphisms of estrogen receptor alpha gene with coronary heart disease risk in Chinese Han population. *Int J Med Sci.* 2013;10(4):457-66.

88. Ding J, Xu H, Yin X, Zhang FR, Pan XP, Gu YA i sur. Estrogen receptor  $\alpha$  gene PvuII polymorphism and coronary artery disease: a meta-analysis of 21 studies. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2014;15(3):243-55.
89. Jiang N, Yang G, Peng CL. ESR1 gene polymorphisms PvuII (rs2234693T>C) and XbaI (rs9340799A>G) may not be directly correlated with cardiovascular disease risk. *Genet Mol Res*. 2015;14(4):13932-44.
90. Zhou W, He KH, Chen MH. Correlation between polymorphisms in the estrogen receptor  $\alpha$  gene and coronary heart disease: A meta-analysis. *Genet Mol Res*. 2016;15(3).
91. Sano M, Inoue S, Hosoi T, Ouchi Y, Emi M, Shiraki M i sur. Association of estrogen receptor dinucleotide repeat polymorphism with osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;217(1):378-83.
92. Becherini L, Gennari L, Masi L, Mansani R, Massart F, Morelli A i sur. Evidence of a linkage disequilibrium between polymorphisms in the human estrogen receptor alpha gene and their relationship to bone mass variation in postmenopausal Italian women. *Hum Mol Genet*. 2000;9(13):2043-50.
93. Lu H, Higashikata T, Inazu A, Nohara A, Yu W, Shimizu M i sur. Association of estrogen receptor-alpha gene polymorphisms with coronary artery disease in patients with familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(5):817-23.
94. Grandien K, Berkenstam A, Gustafsson JA. The estrogen receptor gene: promoter organization and expression. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997;29(12):1343-69.
95. Golubić K, Šmalcelj A, Sertić J, Juričić L. Estrogen receptor 1 gene (TA)<sub>n</sub> polymorphism is associated with lone atrial fibrillation in men. *Croat Med J*. 2014;55(1):38-44.
96. Gallagher CJ, Langefeld CD, Gordon CJ, Campbell JK, Mychaleckyj JC, Bryer-Ash M i sur. Association of the estrogen receptor-alpha gene with the metabolic syndrome and its component traits in African-American

- families: the Insulin Resistance Atherosclerosis Family Study. *Diabetes*. 2007;56(8):2135-41.
97. Kikuchi T, Hashimoto N, Kawasaki T, Uchiyama M. Association of serum low-density lipoprotein metabolism with oestrogen receptor gene polymorphisms in healthy children. *Acta Paediatr*. 2000;89(1):42-5.
98. Sosa M, Jódar E, Arbelo E, Domínguez C, Saavedra P, Torres A i sur. Serum lipids and estrogen receptor gene polymorphisms in male-to-female transsexuals: effects of estrogen treatment. *Eur J Intern Med*. 2004;15(4):231-7.
99. Demissie S, Cupples LA, Shearman AM, Gruenthal KM, Peter I, Schmid CH i sur. Estrogen receptor-alpha variants are associated with lipoprotein size distribution and particle levels in women: the Framingham Heart Study. *Atherosclerosis*. 2006;185(1):210-8.
100. Klos KL, Boerwinkle E, Ferrell RE, Turner ST, Morrison AC. ESR1 polymorphism is associated with plasma lipid and apolipoprotein levels in Caucasians of the Rochester Family Heart Study. *J Lipid Res*. 2008;49(8):1701-6.
101. Yin YW, Li JC, Zhang M, Wang JZ, Li BH, Liu Y i sur. Influence of interleukin-6 gene -174G>C polymorphism on development of atherosclerosis: a meta-analysis of 50 studies involving 33,514 subjects. *Gene*. 2013;529(1):94-103.
102. Hou H, Wang C, Sun F, Zhao L, Dun A, Sun Z. Association of interleukin-6 gene polymorphism with coronary artery disease: an updated systematic review and cumulative meta-analysis. *Inflamm Res*. 2015;64(9):707-20.
103. Zhang H, Liu C, Zhao B, Zhou X. An Evidence-Based Meta-Analysis on the Roles of Functional Interleukin-6 Polymorphisms in Coronary Artery Disease. *J Interferon Cytokine Res*. 2018;38(9):370-7.
104. Galimudi RK, Spurthi MK, Padala C, Kumar KG, Mudigonda S, Reddy SG i sur. Interleukin 6(-174G/C) variant and its circulating levels in coronary

- artery disease patients and their first degree relatives. *Inflammation*. 2014;37(2):314-21.
105. Williams RR, Hunt SC, Heiss G, Province MA, Bensen JT, Higgins M i sur. Usefulness of cardiovascular family history data for population-based preventive medicine and medical research (the Health Family Tree Study and the NHLBI Family Heart Study). *Am J Cardiol*. 2001;87(2):129-35.
106. Ridker PM, Buring JE, Shih J, Matias M, Hennekens CH. Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation*. 1998;98(8):731-3.
107. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C i sur. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med*. 2017;377(12):1119-31.
108. Ridker PM, Everett BM, Pradhan A, MacFadyen JG, Solomon DH, Zaharris E i sur. Low-Dose Methotrexate for the Prevention of Atherosclerotic Events. *N Engl J Med*. 2019;380(8):752-62.
109. Ridker PM, Devalaraja M, Baeres FMM, Engelmann MDM, Hovingh GK, Ivkovic M i sur. IL-6 inhibition with ziltivekimab in patients at high atherosclerotic risk (RESCUE): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet*. 2021;397(10289):2060-9.
110. Inaba Y, Chen JA, Bergmann SR. Prediction of future cardiovascular outcomes by flow-mediated vasodilatation of brachial artery: a meta-analysis. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2010;26(6):631-40.
111. Ras RT, Streppel MT, Draijer R, Zock PL. Flow-mediated dilation and cardiovascular risk prediction: a systematic review with meta-analysis. *Int J Cardiol*. 2013;168(1):344-51.
112. Matsuzawa Y, Kwon TG, Lennon RJ, Lerman LO, Lerman A. Prognostic Value of Flow-Mediated Vasodilation in Brachial Artery and Fingertip Artery for Cardiovascular Events: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Heart Assoc*. 2015;4(11).

113. Xu Y, Arora RC, Hiebert BM, Lerner B, Szwajcer A, McDonald K i sur. Non-invasive endothelial function testing and the risk of adverse outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2014;15(7):736-46.
114. Hamburg NM, Palmisano J, Larson MG, Sullivan LM, Lehman BT, Vasani RS i sur. Relation of brachial and digital measures of vascular function in the community: the Framingham heart study. *Hypertension*. 2011;57(3):390-6.
115. Peters SA, den Ruijter HM, Bots ML, Moons KG. Improvements in risk stratification for the occurrence of cardiovascular disease by imaging subclinical atherosclerosis: a systematic review. *Heart*. 2012;98(3):177-84.
116. Yeboah J, McClelland RL, Polonsky TS, Burke GL, Sibley CT, O'Leary D i sur. Comparison of novel risk markers for improvement in cardiovascular risk assessment in intermediate-risk individuals. *Jama*. 2012;308(8):788-95.
117. Ghiadoni L, Faina F, Salvetti M, Cordiano C, Biggi A, Puato M i sur. Assessment of flow-mediated dilation reproducibility: a nationwide multicenter study. *J Hypertens*. 2012;30(7):1399-405.
118. van Mil AC, Greyling A, Zock PL, Geleijnse JM, Hopman MT, Mensink RP i sur. Impact of volunteer-related and methodology-related factors on the reproducibility of brachial artery flow-mediated vasodilation: analysis of 672 individual repeated measurements. *J Hypertens*. 2016;34(9):1738-45.
119. Charakida M, de Groot E, Loukogeorgakis SP, Khan T, Lüscher T, Kastelein JJ i sur. Variability and reproducibility of flow-mediated dilatation in a multicentre clinical trial. *Eur Heart J*. 2013;34(45):3501-7.
120. Vlachopoulos C, Xaplanteris P, Aboyans V, Brodmann M, Cífková R, Cosentino F i sur. The role of vascular biomarkers for primary and secondary prevention. A position paper from the European Society of Cardiology Working Group on peripheral circulation: Endorsed by the Association for Research into Arterial Structure and Physiology (ARTERY) Society. *Atherosclerosis*. 2015;241(2):507-32.

121. Goff DC, Jr., Lloyd-Jones DM, Bennett G, Coady S, D'Agostino RB, Gibbons R i sur. 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014;129(25 Suppl 2):S49-73.
122. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL i sur. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts)Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J*. 2016;37(29):2315-81.
123. Heiss C, Rodriguez-Mateos A, Bapir M, Skene SS, Sies H, Kelm M. Flow-mediated dilation reference values for evaluation of endothelial function and cardiovascular health. *Cardiovasc Res*. 2022.
124. Hopkins ND, Dengel DR, Stratton G, Kelly AS, Steinberger J, Zavala H i sur. Age and sex relationship with flow-mediated dilation in healthy children and adolescents. *J Appl Physiol (1985)*. 2015;119(8):926-33.
125. Cao L, Hou M, Zhou W, Sun L, Shen J, Chen Y i sur. Decreased Flow-Mediated Dilatation in Children With Type 1 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Angiology*. 2021;72(10):908-15.
126. Cote AT, Harris KC, Panagiotopoulos C, Sandor GG, Devlin AM. Childhood obesity and cardiovascular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(15):1309-19.
127. Bruzzi P, Predieri B, Madeo S, Lami F, Iughetti L. Longitudinal evaluation of endothelial markers in children and adolescents with familial hypercholesterolemia. *Acta Biomed*. 2021;92(5):e2021343.



128. Brull DJ, Leeson CP, Montgomery HE, Mullen M, deDivitiis M, Humphries SE i sur. The effect of the Interleukin-6-174G > C promoter gene polymorphism on endothelial function in healthy volunteers. *Eur J Clin Invest.* 2002;32(3):153-7.
129. Thijssen DH, Black MA, Pyke KE, Padilla J, Atkinson G, Harris RA i sur. Assessment of flow-mediated dilation in humans: a methodological and physiological guideline. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;300(1):H2-12.
130. Dawson EA, Green DJ, Cable NT, Thijssen DH. Effects of acute exercise on flow-mediated dilatation in healthy humans. *J Appl Physiol (1985).* 2013;115(11):1589-98.
131. Papamichael CM, Aznaouridis KA, Karatzis EN, Karatzi KN, Stamatelopoulos KS, Vamvakou G i sur. Effect of coffee on endothelial function in healthy subjects: the role of caffeine. *Clin Sci (Lond).* 2005;109(1):55-60.
132. Hijmering ML, Stroes ES, Olijhoek J, Hutten BA, Blankestijn PJ, Rabelink TJ. Sympathetic activation markedly reduces endothelium-dependent, flow-mediated vasodilation. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39(4):683-8.
133. Thijssen DH, de Groot P, Kooijman M, Smits P, Hopman MT. Sympathetic nervous system contributes to the age-related impairment of flow-mediated dilation of the superficial femoral artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291(6):H3122-9.
134. ter Avest E, Holewijn S, Stalenhoef AF, de Graaf J. Variation in non-invasive measurements of vascular function in healthy volunteers during daytime. *Clin Sci (Lond).* 2005;108(5):425-31.
135. Donald AE, Charakida M, Falaschetti E, Lawlor DA, Halcox JP, Golding J i sur. Determinants of vascular phenotype in a large childhood population: the Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC). *Eur Heart J.* 2010;31(12):1502-10.

136. Widlansky ME, Vita JA, Keyes MJ, Larson MG, Hamburg NM, Levy D i sur. Relation of season and temperature to endothelium-dependent flow-mediated vasodilation in subjects without clinical evidence of cardiovascular disease (from the Framingham Heart Study). *Am J Cardiol.* 2007;100(3):518-23.
137. Briet M, Collin C, Laurent S, Tan A, Azizi M, Agharazii M i sur. Endothelial function and chronic exposure to air pollution in normal male subjects. *Hypertension.* 2007;50(5):970-6.
138. Williams MR, Westerman RA, Kingwell BA, Paige J, Blombery PA, Sudhir K i sur. Variations in endothelial function and arterial compliance during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(11):5389-95.
139. Doshi SN, Naka KK, Payne N, Jones CJ, Ashton M, Lewis MJ i sur. Flow-mediated dilatation following wrist and upper arm occlusion in humans: the contribution of nitric oxide. *Clin Sci (Lond).* 2001;101(6):629-35.
140. Berry KL, Skyrme-Jones RA, Meredith IT. Occlusion cuff position is an important determinant of the time course and magnitude of human brachial artery flow-mediated dilation. *Clin Sci (Lond).* 2000;99(4):261-7.
141. Green DJ, Jones H, Thijssen D, Cable NT, Atkinson G. Flow-mediated dilation and cardiovascular event prediction: does nitric oxide matter? *Hypertension.* 2011;57(3):363-9.
142. Green DJ, Dawson EA, Groenewoud HM, Jones H, Thijssen DH. Is flow-mediated dilation nitric oxide mediated?: A meta-analysis. *Hypertension.* 2014;63(2):376-82.
143. Thijssen DH, van Bommel MM, Bullens LM, Dawson EA, Hopkins ND, Tinken TM i sur. The impact of baseline diameter on flow-mediated dilation differs in young and older humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295(4):H1594-8.
144. Leeson P, Thorne S, Donald A, Mullen M, Clarkson P, Deanfield J. Non-invasive measurement of endothelial function: effect on brachial artery

- dilatation of graded endothelial dependent and independent stimuli. *Heart*. 1997;78(1):22-7.
145. Black MA, Cable NT, Thijssen DH, Green DJ. Importance of measuring the time course of flow-mediated dilatation in humans. *Hypertension*. 2008;51(2):203-10.
146. Liuni A, Luca MC, Lisi M, Dragoni S, di Stolfo G, Mariani JA i sur. Observations of time-based measures of flow-mediated dilation of forearm conduit arteries: implications for the accurate assessment of endothelial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299(3):H939-45.
147. Padilla J, Johnson BD, Newcomer SC, Wilhite DP, Mickleborough TD, Fly AD, et al. Adjusting flow-mediated dilation for shear stress stimulus allows demonstration of endothelial dysfunction in a population with moderate cardiovascular risk. *J Vasc Res*. 2009;46(6):592-600.
148. Thijssen DH, Tinken TM, Hopkins N, Dawson EA, Cable NT, Green DJ. The impact of exercise training on the diameter dilator response to forearm ischaemia in healthy men. *Acta Physiol (Oxf)*. 2011;201(4):427-34.
149. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C i sur. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995;91(5):1314-9.
150. Joannides R, Richard V, Haefeli WE, Benoist A, Linder L, Lüscher TF i sur. Role of nitric oxide in the regulation of the mechanical properties of peripheral conduit arteries in humans. *Hypertension*. 1997;30(6):1465-70.
151. Oates C. *Cardiovascular Haemodynamics and Doppler Waveforms Explained*. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2001.
152. Williamson EB, Bronas UG, Dengel DR. Automated edge detection versus manual edge measurement in analysis of brachial artery reactivity: a comparison study. *Ultrasound Med Biol*. 2008;34(9):1499-503.
153. Harris RA, Nishiyama SK, Wray DW, Richardson RS. Ultrasound assessment of flow-mediated dilation. *Hypertension*. 2010;55(5):1075-85.

154. Mancini GB, Yeoh E, Abbott D, Chan S. Validation of an automated method for assessing brachial artery endothelial dysfunction. *Can J Cardiol.* 2002;18(3):259-62.
155. Preik M, Lauer T, Heiss C, Tabery S, Strauer BE, Kelm M. Automated ultrasonic measurement of human arteries for the determination of endothelial function. *Ultraschall Med.* 2000;21(5):195-8.
156. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA i sur. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39(2):257-65.

## 11. ŽIVOTOPIS

Zoran Miovski je rođen 14.10.1982. u Pehčevu, Republici Makedoniji. Osnovnu školu i prirodoslovno-matematičku XV. gimnaziju završio je u Zagrebu, a diplomirao na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2007.godine.

Od 2010. godine zaposlen je na Klinici za bolesti srca i krvnih žila KBC-a Zagreb, gdje 2014. godine postaje specijalist interne medicine, a 2017. godine završava subspecijalizaciju iz kardiologije.

Tijekom specijalizacije i subspecijalizacije educirao se u vanjskim i domaćim centrima iz područja intervencijske kardiologije i angiologije. Uže područje interesa su mu kompleksne perkutane koronarne intervencije, koronarna fiziologija te periferna arterijska bolest.

Od 2019. godine voditelj je Laboratorija za kateterizaciju srca Specijalne bolnice Agram u Zagrebu, a od 2021.godine zaposlen je i u Zavodu za intervencijsku kardiologiju Klinike za bolesti srca i krvnih žila KBC-a Rijeka. Autor je i koautor više znanstvenih i stručnih radova. Dobitnik je nekoliko stručnih nagrada iz područja intervencijske kardiologije i sudjeluje u više međunarodnih kliničkih ispitivanja.

Ponosan je otac kćeri Sofije.