

# Povezanost polimorfizma osteoprotegrin gena s učestalošću aortalne stenozе

---

Legčević, Zoran

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:105:424327>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2021-12-03**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Zoran Legčević

POVEZANOST POLIMORFIZMA OSTEOPROTEGRIN GENA S UČESTALOŠĆU AORTALNE  
STENOZE

Diplomski rad



Zagreb, 2016.

„Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za epigenetiku i molekularnu medicinu Zavoda za medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u sklopu znanstvenog projekta „Povezanost polimorfizma RANK/RANKL/OPG i PTX3 gena s učestalošću aortalne stenozе“, pod vodstvom *doc. dr. sc. Frane Paića* i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2015./2016.“

1. Sažetak .....	4
2. Summary .....	4
3. Uvod .....	4
4. Hipoteza .....	11
5. Ciljevi rada .....	12
6. Ispitanici i metode .....	12
7. Rezultati .....	16
8. Rasprava .....	18
9. Zaključci .....	20
10. Zahvale .....	21
11. Literatura .....	21
12. Životopis .....	31

## **1. SAŽETAK**

Brojna istraživanja pokazala su prisutnost različitih genetskih promjena kod pacijenata sa aortalnom stenozom. U ovom radu ispitan je utjecaj rs3102735 (C/T tranzicija, supstitucija) SNP polimorfizma OPG gena na učestalost aortalne stenoze. Ispitivana populacija (n= 223) obuhvaća 92 pacijenta sa dijagnosticiranom aortalnom stenozom i 131 zdrava dobrovoljca koji čine kontrolnu skupinu ispitanika. Nije uočena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova i alela rs3102735 (C/T tranzicija, supstitucija) SNP polimorfizma OPG gena između AVS pacijenata i kontrolne skupine ispitanika.

## **2. SUMMARY**

Numerous research studies have shown association of genetic polymorphism with the prevalence of aortic valve stenosis. In this study we investigated the influence of rs3102735 (C/T transition, substitution) SNP polymorphism of OPG gene on incidence of aortic valve stenosis. Study population (n= 223) encompasses 92 aortic valve stenosis patients and 131 healthy control subjects. We did not detect any statistically significant difference in genotype or allele frequencies of rs3102735 between AVS patients and healthy control group.

## **3. UVOD**

Aortalna stenoza definirana kao suženje lumena ušća aorte u svojoj pozadini može imati više uzročnih čimbenika (1-5).

U osnovi se radi o stečenim, aktivnim ili pasivnim degenerativnim procesima te urođenim ili prirođenim, genetski determiniranim promjenama tkivne strukture aortalnih zalistaka odnosno stenozama aortalnih zalistaka- AVS (engl. aortic valve stenosis) (6).

Osim što predstavlja najučestaliji oblik degenerativne bolesti srčanih zalistaka te nakon hipertenzije i bolesti koronarnih arterija čini treći vodeći uzrok kardiovaskularnih oboljenja, AVS je ujedno i glavna indikacija kirurške zamjene aortalnih zalistaka među odraslim stanovništvom Europe, Australije i Sjeverne Amerike te druga vodeća indikacija operativnih zahvata na srcu (7, 8).

Nepotpuni prikazi AVS datiraju još iz 17 stoljeća. U svom djelu „Bolesti srca i aorte“ izdanom 1845. godine poznati Irski liječnik William Stokes među prvima navodi specifične patohistološke karakteristike oboljenja (9). Unatoč tome, prvi detaljan opis AVSa u pisanoj literaturi zabilježen je 1904. godine u radu JG Monckeberga, a kao glavni razlog nastajanja navode se reumatska vrućica i u manjoj mjeri degenerativne promjene uzrokovane starošću pacijenta (10).

S vremenom je porast udjela starijeg stanovništva u ukupnoj populaciji razvijenih zemalja, poboljšanje standarda i promjene prehrambenih navika uz povećanje konzumacije visoko kalorijskih namirnica bogatih kolesterolom te pad prevalencije srčanih oboljenja zbog reumatske vrućice (agresivni tretman pencilin-senzitivnih  $\beta$  hemolitičkih Streptokoka grupe A) doveo do promjena u etiologiji nastanka AVS (11, 12).

Zbog toga se danas u razvijenim zemljama (Europe, Australije i Sjeverne amerike) kao glavni uzrok razvoja aortalne stenozе javlja degenerativna kalcifikaciju aortnih zalistaka dok reumatska vrućica stoji u pozadini tek 10% slučajeva (13-16). Nasuprot tome, reumatska vrućica i dalje predstavlja glavni razlog nastanka AVSa u ekonomski nerazvijenim zemljama svijeta (16).

Drugi vodeći razlog nastanka AVSa u razvijenim zemljama svijeta predstavlja razvoj bikuspidalnog aortalnog zalistka (engl. bicuspic aortic valve stenosis, BAVS). Riječ je o prirođenoj srčanoj greški koja se javlja u otprilike 1-2 % stanovništva s nešto većom prevalencijom unutar muškog spola (17-19).

Do razvoja aortalne stenozе dolazi kod 50-70% pacijenata sa bikuspidalnim aortnim zalistkom (17-19).

Premda se glavni patobiološki procesi koji stoje u pozadini razvoja CAVSa odnosno BAVSa značajno preklapaju, bolest se kod pacijenata sa bikuspidalnim zalistkom javlja 1-2 dekade prije (između 50–60 godina života) nego kod pacijenata sa trikuspidalnim aortalnim zalistkom (17-19).

Shodno tome stratifikacija uzročnih čimbenika aortalne stenoze značajno varira s obzirom na dob pacijenata. Kod pacijenata mlađih od 70 godina života kalcifikacija kongenitalnih bikuspidalnih aortalnih zalistaka odgovorna je za polovinu kirurških slučajeva. Nasuprot tome, kod osoba starijih od 70 godina degenerativna kalcificirajuća stenoza trikuspidalnih aortalnih zalistaka čini gotovo 48% svih operacijskih zahvata (20).

Bez obzira na uzrok morbiditet i mortalitet povezan s ovom bolešću kontinuirano raste te paralelno sa izraženim povećanjem starosne dobi stanovništva poprima karakteristike epidemije, predstavljajući sve veće medicinsko i ekonomsko opterećenje zdravstvenog sustava ekonomski razvijenih država zapadnog svijeta (21)

Naime, prema nedavno objavljenoj meta analizi populacijskih studija izvršenih u Europi i Sjevernoj Americi zbirna prevalencija AVSa te prevalencija naprednog oblika bolesti u starijoj populaciji ( $\geq 75$  godina) procijenjena je na 12.4% odnosno 3.4% (22).

Nadalje, sa sadašnjim trendom demografskih promjena te popratnim starenjem populacije procjenjuje se da bi do 2050 godine broj pacijenata sa uznapredovalim stadijem bolesti mogao narasti na 2.1 milion u Europi te 1.4 milion pacijenata u Sjevernoj Americi (22).

Dodajmo k tomu i činjenicu da će još naglašenije demografske promjene u Africi, Aziji i Južnoj Americi te jednom prikupljeni podaci zasigurno drastično povećati sveukupni broj AVS pacijenata u svijetu (15, 22,23).

Patohistološki AVS predstavlja kronično sporo progredirajuće patološko stanje koje se manifestira progresivnim zadebljanjem i biomineralizacijom aortalnih zalistaka (6). U ranom te klinički uglavnom neprimjetnom stadiju bolest se manifestira u vidu aortalne skleroze odnosno blagim zadebljanjem aortalnih zalistaka koje ne dovodi do poremećaja hemodinamike (opstrukcije krvnog

protoka) (21, 24). Kasnije, u uznapredovanom stadiju bolesti dolazi do aortalne stenoze koja se manifestira uznapredovalom kalcifikacijom aortalnih zalistaka, njihovom sve manjom pokretljivošću i opstrukcijom hemodinamike srca rezultirajući maladaptivnom hipertrofijom lijevog ventrikula, fibrozom miokarda te dijastoličkom i sistoličkom disfunkcijom te posljedičnim zatajivanjem srca (21).

Učestalost aortalne skleroze iznosi 26% kod pacijenata srednje starosne dobi od 72 godine i oko 40 % pacijenata između 75. i 85. godina života dok AVS pogađa oko 2 % pacijenata srednje starosti od 72. godine i 13 % pacijenata između 75. i 85. godina života. Već je i sama aortalna skleroza povezana sa 50% povećanjem rizika pojave infarkta miokarda i smrtnog ishoda uslijed kardiovaskularnih oboljenja (25).

AVS se dugo vremena smatrala pasivnom, degenerativnom promjenom povezanom isključivo s starošću pacijenta.

Prevladavala je hipoteza o prirodnom, vremenski uvjetovanom trošenju tkiva aortalnih zalistaka zbog oštećenja prouzročenih njihovom stalnom izloženošću opetovanom mehaničkom i hemodinamičkom stresu kojeg prati pasivna biomineralizacija odnosno taloženje kalcija uz oštećena, dezorganizirana kolagenska vlakna ili apoptotične ostatke stanica. Stoga se AVS vrlo često i u literaturi navodio kao neregulirani „degenerativni“ ili „senilni“ patobiološki proces. No, novija epidemiološka istraživanja pokazala su da 25-45% osoba starih između 80-90 godina života ne pokazuje nikakve znakove kalcifikacije aortalnih zalistaka.

Sve više prikupljenih podataka ukazuje na činjenicu da AVS nije tek pasivna posljedica starosti već da se radi o aktivnom patobiološkom procesu za kojeg je moguće utvrditi inicijacijske biokemijske, humoralne, genetičke i kliničke čimbenike rizika i predispozicije te stanične i molekularno biološke putove koji posreduju i upravljaju tijekom bolesti (26).

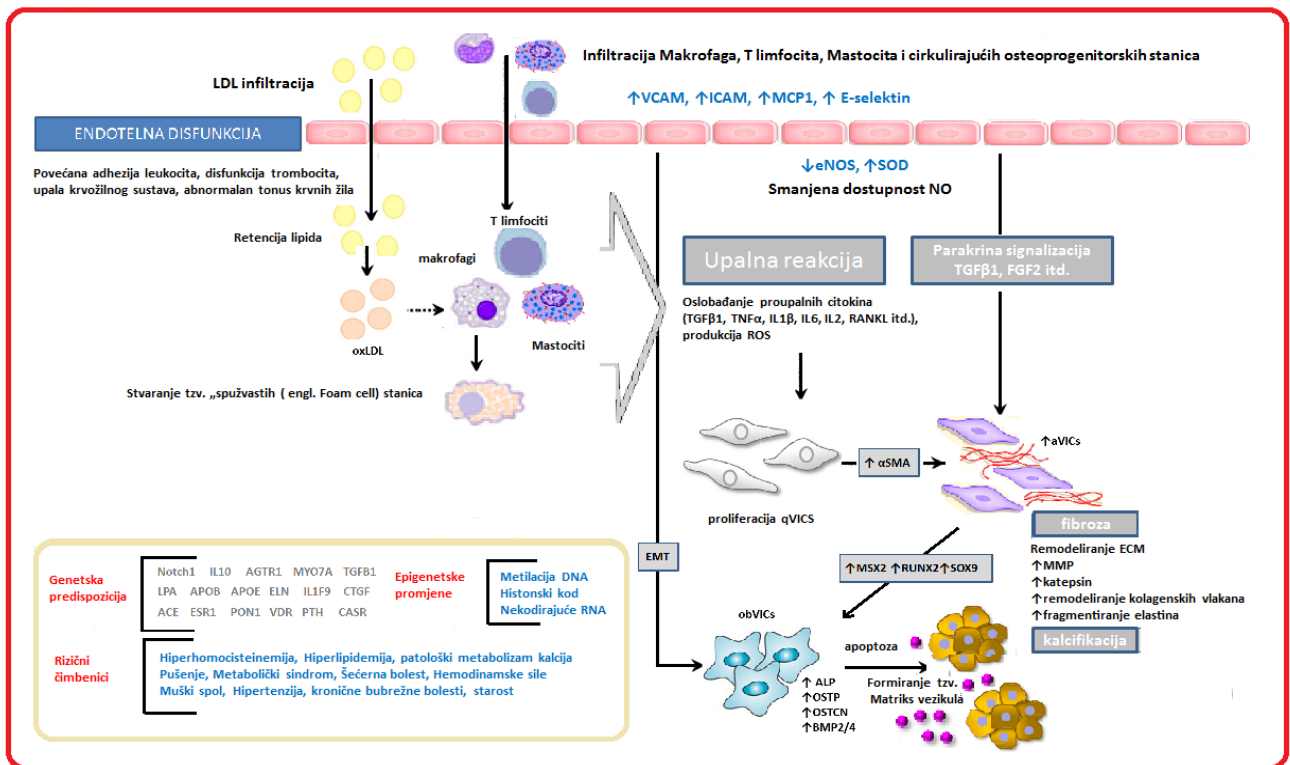
Smatra se da do patoloških promjena aortalnih zalistaka dolazi uslijed oštećenja endotelne stanice (AVEC- aortic valvular endothelial cells) i transformacije intersticijskih stanica aortalnih zalistaka



(AVIC- aortic valvular interstitial cells). Kombinacijom mehaničkog stresa i rizičnih faktora (hipertenzija, starosna dob, pušenje, povećani BMI, hiperkolesterolemija, hiperhomocisteinemia, dijabetes, metabolički sindrom, patološke koncentracije kalcija, fosfora i kreatina u serumu, muški spol, hemodinamički stres) dolazi do destrukcije endotelnog pokrova i subendotelne infiltracije aterogenih lipida praćene invazijom monocita-makrofaga, mastocita i T limfocita, pojave oksidacijskog stresa, akumulacije oksidiranih lipida i apolipoproteina, oslobađanja proinflammatoryh citokina i aktivacije renin-angiotenzin-aldosteron sistema te promjena u ekspresiji matriks metaloproteinaza i promotora neovaskularizacije i kalcifikacije (*Slika 1*) (6).

Aktivnošću navedenih čimbenika dolazi do endotelno-mezenhimske transformacije endotelnih stanica i angiogeneze, infiltracije cirkulirajućih osteoprogenitorskih stanica, remodeliranja ekstracelularnog matriksa te aktivacije, proliferacije i osteogene diferencijacije AVIC stanica rezultirajući na kraju nepravilnim zadebljanjem, rigidnošću, distorzijom, fibrozom i biomineralizacijom zalistaka te formiranjem ektopičnog hrskavičnog i koštanog tkiva (6). Navedene patohistološke promjene su obično koncentrirane na hemodinamski predisponiranoj strain aortalnih zalistaka (pars fibrosa) te izraženije kod pacijenata s uznapredovalim stadijem bolesti.

No unatoč brojnim do sada objavljenim podacima prikupljenim iz patološki promijenjenog tkiva pacijenata te *in vivo* studijama na različitim animalnim modelima kao i *in vitro* eksperimentima sa kulturama AVEC i AVIC stanica humanog i animalnog podrijetla ključni patofiziološki mehanizmi koji stoje u pozadini nastanka i progresije ovog ozbiljnog oboljenja još uvijek su nedovoljno poznati.



**Slika 1. Patohistogeneza AVSa.** Tijekom vremena neispravan mehanizam popravka lezija nastalih u tkivu aortalnih zalistaka (po svemu sudeći prisutan u nekim pacijentima) u koordinaciji sa stalno djelujućim hemodinamski izazvanim mehaničkim stresom (engl. shear stress and transvalvular pressure) i prisutnim rizičnim aterosklerotskim čimbenicima dovodi do endotelne disfunkcije praćene prekidom subendotelne bazalne membrane, izvanstraničnim nakupljanjem aterogenih lipoproteina te invazijom/infiltracijom i aktivacijom monocitno-makrofagne stanične loze, mastocita i T limfocita. To dovodi do unutarstaničnog nakupljanja lipida u makrofazima odnosno formiranja tzv. spužvastih stanica (engl. foamy cells), nastanka oksidacijskog stresa uz nagomilavanje oksidiranih lipida i apolipoproteina te povećanje razine brojnih profibrinogenih i proupalnih čimbenika uz istovremenu inhibiciju plazmatskih ili lokalno prisutnih proteinskih inhibitora kalcifikacije. Djelujući zajedno navedeni čimbenici promoviraju neovaskularizaciju, upalnu reakciju i kalcifikaciju međustaničnog matriksa u tkivu aortalnih zalistaka. Usporedna transformacija fiziološki neaktivnih/mirujućih qVICs (engl. quiescent VICs) u aktivne miofibroblastima slične VIC stanice (aVICs; engl. active VICs) u intersticiju aortalnih zalistaka i njihova daljnja diferencijacija u osteoblastima slične stanice (obVICs; engl. osteoblast-like VICs) uz istovremeno aktiviranje proosteogenih signalnih putova smatra se jednim od središnjih mehanizama koji dovode do inicijacije i progresije AVSa. Podskupina aortalnih valvularnih endotelnih stanica (VECs; engl. valvular endothelial cells) uključenih u tzv. proces endotelno-mezenchimске transformacije (EMT; engl. endothelial to mesenchymal transformation) i/ili cirkulirajućih osteoprogenitorskih stanica može također pridonijeti kalcifikaciji/osifikaciji međustaničnog matriksa aortalnih zalistaka bilo svojom direktnom rediferencijacijom u osteoblastima slične stanice ili indirektno promoviranjem aktivacije i osteogene transdiferencijacije intersticijskih VIC stanica putem parakrine signalizacije. U donjem desnom uglu navedeni su neki od poznatih genetski i epigenetski čimbenici odgovornih za nastanak i razvoj aortalne stenozе te glavni rizični čimbenici uključeni u razvoj i progresiju bolesti.

Trenutno ne postoje razvijeni klinički pristupi za terapiju i zaustavljanje progresije AVSa, a kirurška AVR (engl. aortic valve replacement) ili mnaje invazivna TAVR (engl. transcatheter aortic valve

replacement) zamjena oštećenih aortalnih zalistaka mehaničkom ili biološkom protezom predstavlja zasad jedini modalitet njenog liječenja u uznapredovalom stadiju bolesti (27-31).

Nažalost zbog poodmakle dobi ili brojnih komorbiditeta za više od 30% pacijenata operativni zahvat na srcu nije indiciran pa se njihova skrb svodi uglavnom na palijativnu njegu (32).

Stoga bi bolje razumijevanje molekularnih mehanizama koji stoje u pozadini patohistogeneze i progresije AVSa moglo znatno pridonijeti razvoju novih prognostičkih i dijagnostičkih testova te razvitku poželjnih neinvazivnih modaliteta liječenja.

Brojna istraživanja pokazala su prisutnost različitih genetskih promjena [ primjerice polimorfizam VDR gena (Bsm1 B/b); polimorfizam promotorske (-1082,-819,-592) regije IL10 gena; polimorfizam promotorske (-447) regije CTGF gena; PvuII polimorfizam ER $\alpha$ /ESR1 gena; AocI polimorfizam TGFB1 gena; XbaI polimorfizam APOB; APOAI i APOE (apoE2, apoE4) gena, prevalencija AA genotipa PTH gena, mutacije (R1108X, H1505del, p.T596M i p.P1797H) NOTCH1 gena; 32bp delecija CCR5 gena), rs1205 C>T polimorfizam CRP ( engl. C-reactive protein gene) gena, smanjena transkripcija i translacija regulatornih gena staničnog ciklusa p21WAF1/CIP1 i 14-3-3 $\sigma$ ] kod pacijenata sa stenozom aortalnih zalistaka (33-47).

Neke od tih promjena povezane su sa relativno visokom [primjerice polimorfizam apoB (XbaI, rs1042031, and rs6725189), ACE (rs4340), IL10 (rs1800896 and rs1800872), i LPA (rs10455872) gena ] ili umjerenom [PvuII polimorfizam ER $\alpha$ /ESR1 gena, rs1042636 polimorfizam CaSR gena, rs3024491, rs3021094, rs1554286, i rs3024498 polimorfizam unutar IL10 gena, rs662 polimorfizam PON1 gena, rs2276288 polimorfizam MYO7A gena, rs5194 polimorfizam AGTR1 gena, rs2071307 polimorfizam ELN gena, te rs17659543 i rs13415097 polimorfizam unutar nukleotidne sekvence IL1F9 gena] dozom dokaza, dok za druge [rs1544410 polimorfizam VDR gena, E2 iE4 aleli apoE gena, rs6254 polimorfizam PTH gena te rs1800871 polimorfizam IL10 gena] postoji relativno mali broj pokazatelja njihove povezanosti sa učestalošću aortalne stenozе (46).

Pored toga, za brojne molekularne čimbenike iznimno važne u procesu nastanka i razvoja aortalne stenozе trenutno ne postoje podaci koji bi povezali eventualnu prisutnost genskih polimorfizma odgovornih za njihovu povećanu odnosno umanjenu razinu (u odnosu na zdrave ispitanike) u tkivu patološki promjenjenih aortalnih zalistaka ili u krvnoj plazmi pacijenata u odnosu na kontrolne ispitanike.

U skupinu tih proteinskih čimbenika spada i osteoprotegrin (OPG). OPG je sekrecijski bazični glikoprotein te član šire obitelji TNF (engl. tumor necrosis factor) receptora te važan čimbenik RAN/RANKL/OPG signalnog puta bitnog za osteoblastogenezu, razvoj kostiju i kalcifikaciju kardiovaskularnog sustava (48-50). Nedavna otkrića pokazala su da serumska koncentracija OPG proteina korelira sa ozbiljnošću ateroskleroze te osobito sa progresijom kardiovaskularnih oboljenja (51-57). Koncentracija OPG proteina također je u skorije vrijeme povezana i sa funkcijom endotelnih i valvularnih intersticijskih stanica kod pacijenata sa aortalnom stenozom te dobro korelira ne samo sa stupnjem bolesti već i sa dugoročnim postoperativnim ishodom AVS pacijenata (58-69). Do sada je zabilježeno više različitih polimorfizama u nukleotidnom slijedu OPG gena (49,70-76).

Konkretni cilj ovog rada je istražiti eventualnu povezanost rs3102735 SNP polimorfizma (engl. single nucleotide polymorphism) OPG gena (TNRSF11B, engl.- tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b ) sa učestalošću aortalne stenozе.

#### **4. HIPOTEZA**

Prethodni radovi pokazali su da je razina osteoprotegrina značajno povećana u pacijentima sa aortalnom stenozom i dobro korelira ne samo sa stupnjem bolesti već i sa dugoročnim postoperativnim ishodom AVS pacijenata.

Za pretpostaviti je da različiti polimorfizmi prisutni unutar nukleotidne sekvence OPG gena imaju bitan utjecaj na njegovu aktivnost te mogu pridonjeti uočenoj razlici u razini OPG proteina između

pacijenata i kontrolne skupine ispitanika odnosno mogu predstavljati molekularnu podlogu povezanu sa učestalosti aortalne stenoze.

## **5. CILJEVI RADA**

Cilj ove studije je izvršiti genotipizaciju rs3102735 (C/T tranzicija, supstitucija) SNP polimorfizma OPG gena te odrediti distribuciju tri moguće genotipske varijante kako bi se utvrdilo sljedeće:

- distribucija rs3102735 SNP polimorfizma u zdravoj populaciji;
- distribucija rs3102735 SNP polimorfizma u skupini AVS pacijenata;
- statističkom usporedbom prikupljenih podataka odrediti da li postoji povezanost rs3102735 SNP polimorfizam OPG gena sa učestalošću aortalne stenoze

## **6. MATERIJALI I METODE**

### ***6.1. Ispitanici***

Ovom studijom obuhvćena su 92 pacijenta sa aortalnom stenozom dijagnosticirana u Kliničkoj Bolnici Merkur u Zagrebu u periodu od 01.07. 2015- 01.07. 2016 godine.

Bolesnici sa dijagnosticiranom bolešću koronarnih krvnih žila, sistemskim upalnim reakcijama, renalnom insuficijencijom, hiperparatiroidizmom ili aortalnom stenozom uslijed BAVS, Marfanovog sindroma ili reumatske bolesti nisu uvršteni u istraživanje.

Kontrolnu skupinu čine zdravi dobrovoljni ispitanici (n=131) bez povijesti bolesti srčanih zalistak.

Od svih ispitanika pribavljen je potpisani informirani pristanak a dozvolu za provedeno istraživanje dalo je lokalno etičko tijelo Kliničke Bolnice Merkur, Zagreb.

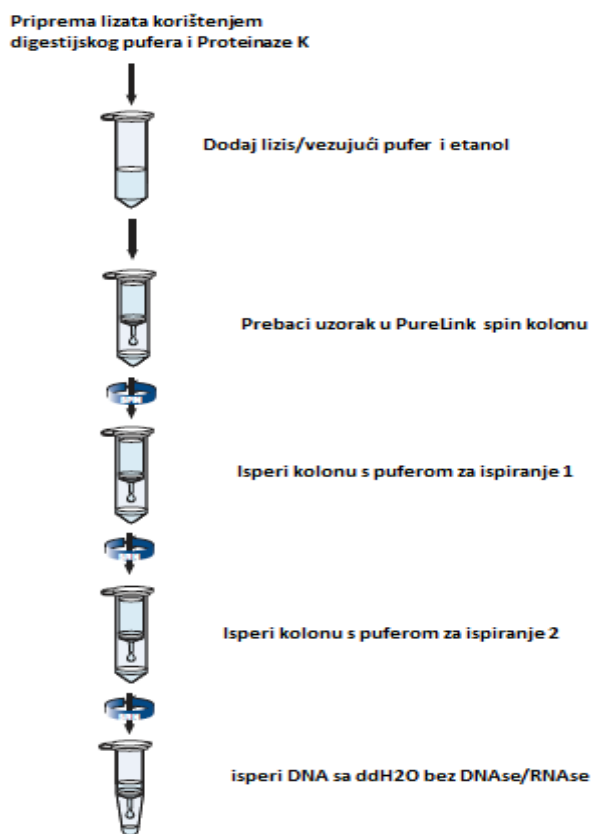
## 6.2. Skupljanje uzoraka pune krvi

Za potrebe izolacije genomske DNA svim ispitanicima uključenim u ovu studiju venepunkcijom je uzet uzorak 5 ml pune krvi u epruvete u kojima se nalazio antikoagulans kalijeva EDTA (Etilendiamintetraoctena kiselina; Komplekson II).

Krv je do daljnje analize pohranjena na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 6.3. Izolacija DNA i genotipizacija

Humana genomska DNA izolirana je iz 250  $\mu\text{l}$  pune krvi korištenjem PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA) slijedeći upute proizvođača (*Slika 2*).



**Slika 2.** Kratki prikaz izolacije genomske DNA iz pune krvi uporabom PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA).

Kvantiteta i kvaliteta izolirane genomske DNA izvršena je spektrofotometrijom uporabom Nanodrop aparata (Thermo Fisher Scientific Inc. USA) slijedeći upute proizvođača.

Analiza rs3102735 SNP polimorfizma OPG (TNRSF11B) gena izvršena je korištenjem komercijalnih gen specifičnih početnica odnosno TaqMan® SNP Genotyping Assay (rs3102735; Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA; SNP type: Intron; Context Sequence [VIC/FAM] CTCTAGGGTTCGCTGTCTCCCCCAT [C/T] AATTCCTGGTCTAGAAGTTAGACT).

Kvantitativni RT-PCR proveden je korištenjem TaqMan Universal master mix II and Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA) slijedeći upute proizvođača. Amplifikacija je izvršena uporabom qRT-PCR ploče sa 96 jažica korištenjem slijedećih parametara qRT-PCR reakcije: 50 °C 2 min, 95 °C 15 s i 62.50 °C 1 min 30 s. Sve reakcije izvedene su u triplicatu a kao kontrola korišteni su uzorci s poznatim rs3102735 (C/T tranzicija, supstitucija) SNP polimorfizma OPG gena. Korištene su slijedeće početnice:

Analiza rezultata kvantitativnog RT-PCR-a i određivanje genotipskih varijanti ispitanika izvršena je u skladu sa instrukcijama korištenog qRT-PCR aparata Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA) te odgovarajućeg računalnog softvera.

#### **6.4. Statistička obrada podataka**

Prije statističke analize varijable su testirane na normalnu distribuciju uporabom D'Agostino-Pearson omnibus statističkog testa. Varijable su prezentirane kao srednja vrijednost  $\pm$  SD ako su distribuirane normalno ili kao median i raspon ako su distribuirane neparametrijski. Frekvencije genotipova i alela analizirane su metodom Chi-square testa ( $\chi^2$ ). Rezultati rs3102735 (C/T tranzicija, supstitucija) SNP polimorfizma OPG gena testirani su s obzirom na Hardy-Weinberg ravnotežu u skupini pacijenata i kontrolnoj skupini zdravih ispitanika.

Usporedba grupa provedena je nesparenim t testom i one-way ANOVA (engl., analysis of variance) ili neparametrijskim Kruskal-Wallis (za analizu razlike između većeg broja skupina) i Mann-Whitney testom (usporedba rezultata između dvije skupine) za nesparene podatke. Korelacija između dviju varijabli određena je uporabom linearne regresijske analize i Pearsonovog korelacijskog koeficijenta za parametrijski distribuirane varijable dok je Spearmanov korelacijski test korišten za analizu neparametrijski distribuiranih varijabli.

Statistička analiza podataka izvršena je uporabom komercijalno dostupnog softvera IBM SPSS Statistics softvera (IBM SPSS Statistics Version 22, USA). Svi statistički testovi su dvostrani (engl., two-sided). Konvencionalna vrijednost  $P < 0.05$  korištena je za određivanje statističke signifikantnosti podataka.

## **7. REZULTATI**

### ***7.1. Demografske karakteristike ispitanika***

Ispitivana populacija (n= 223) obuhvaća 92 pacijenta sa dijagnosticiranom aortalnom stenozom i 131 zdrava dobrovoljca koji čine kontrolnu skupinu ispitanika. S obzirom na spol vidljiva je statistički značajna razlika između dviju promatranih skupina. Pacijenti sa dijagnosticiranim AVS: 59 (64.13%) muškarci , 33 (35.87 %) žene ; kontrolna skupina : 66 ( 50.32%) muškarci, 65 (49.62 %) žene ;  $P < 0.05$ .

### ***7.2. Distribucija genotipova i alela rs3102735 (C/T tranzicija, supstitucija) SNP polimorfizma OPG gena kod AVS pacijenata i zdravih kontrolnih ispitanika***

Distribucija genotipova rs3102735 (C/T tranzicija, supstitucija) SNP polimorfizma OPG gena ispitana je s obzirom na Hardy-Weinberg ravnotežu i nisu opažena odstupanja niti unutar AVS skupine ko ni unutar kontrolne skupine ispitanika (*Tablica 1*).



SNP	Chi <sup>2</sup> AVS	Pearson p AVS	Fisher p AVS	Chi <sup>2</sup> kontrola	Pearson p kontrola	Fisher p kontrola	Chi <sup>2</sup> svi ispitanici	Pearson p svi ispitanici	Fisher p svi ispitanici
rs3102735	0.322	0.851	0.951	0.604	0.739	0.94	0.752	0.686	0.858

**Tablica 1.** Hardy-Weinberg ravnoteža distribucije rs3102735 genotipova u AVS i kontrolnoj skupini ispitanika

Distribucija genotipova i alela unutar AVS i kontrolne skupine ispitanika prikazana je u **Tablici 2**, a distribucija genotipova s obzirom na spol prikazana je na **Tablici 3 i Slici 3**.

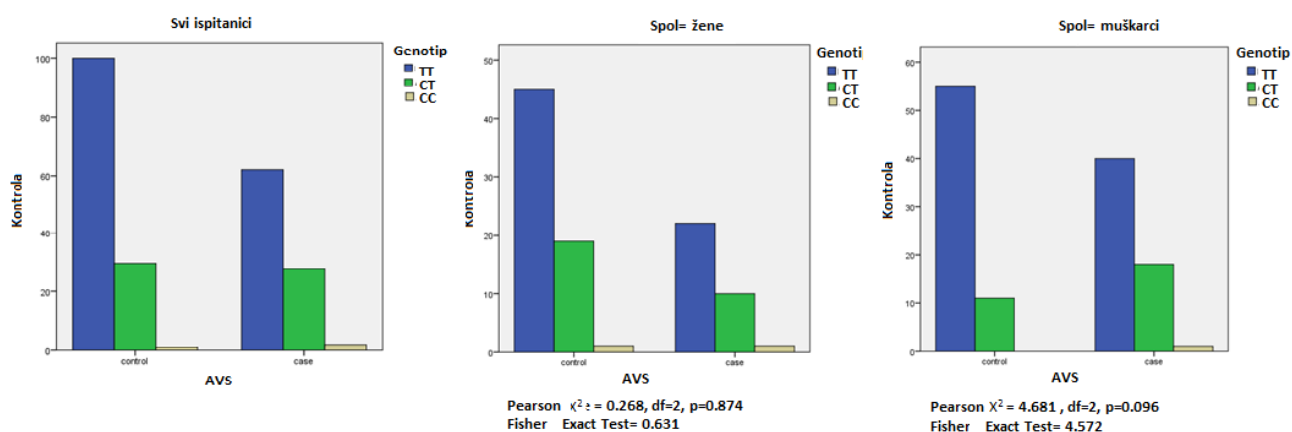
Kao što je vidljivo iz priloženih podataka nije zabilježena statistički značajna razlika s obzirom na distribuciju genotipova i alela kako između AVS pacijenata i kontrolne skupine pa tako ni između podskupina podijeljenih s obzirom na spol.

rs3102735 SNP	genotipovi			aleli		Statistički pokazatelji
	CC	CT	TT	C	T	
AVS	2	28	62	32	152	OR=1.513158 %95 CI=[0.889665~2.573604] Chi2 = 2.357553; df=1 Fisher's p = 0.124741 Pearson's p = 0.124669
Kontrola	1	30	100	32	230	Chi2 =2.573980; df=2 Fisher's p = 0.276192 Pearson's p = 0.276101

**Tablica 2.** Distribucija genotipova i alela unutar AVS i kontrolne skupine ispitanika.

Spol				GENOTIP			Ukupno
				TT	CT	CC	
žene	kontrola	broj	45	19 <sub>a</sub>	1	65	
		%	69.2%	29.2%	1.5%	100.0%	
	AVS	broj	22	10	1	33	
		%	68.4%	29.6%	2.0%	100.0%	
	Ukupno	broj	67	29	2	98	
		%	68.4%	29.6%	2.0%	100.0%	
muškarci	kontrola	broj	55	11	0	66	
		%	83.3%	16.7%	0.0%	100.0%	
	AVS	broj	40	18	1	59	
		%	67.8%	30.5%	1.7%	100.0%	
	Ukupno	broj	95	29	1	125	
		%	76.0%	23.2%	0.8%	100.0%	
Ukupno	kontrola	broj	100	30	1	131	
		%	76.3%	22.9%	0.8%	100.0%	
	AVS	broj	62	28	2	92	
		%	67.4%	30.4%	2.2%	100.0%	
	Ukupno	broj	162	58	3	223	
		%	72.6%	26.0%	1.3%	100.0%	

**Tablica 3.** Distribucija genotipova unutar AVS i kontrolne skupine ispitanika s obzirom na spol



**Slika 3.** Distribucija genotipova i alela unutar AVS i kontrolne skupine ispitanika s obzirom na spol ispitanika

## 8. RASPRAVA

U ovoj studiji izvršena je analiza povezanosti rs3102735 (C/T tranzicija, supstitucija) intronskog SNP polimorfizma OPG gena sa učestalošću aortalne stenoze. Nije zabilježena statistički značajna razlika s obzirom na distribuciju genotipova i alela kako između AVS pacijenata i kontrolne skupine pa tako ni između podskupina podijeljenih s obzirom na spol. Međutim s obzirom na relativno mali broj ispitanika uključenih u studiju nije moguće izvući sveobuhvatnije zaključke. S obzirom da se navedeni polimorfizam nalazi unutar intronske DNA sekvence OPG gena potrebno je izvršiti dodatne analize i to prvenstveno poznatih polimorfizama OPG gena smještenih u egzonima odnosno kodnom području osteoprotegrinskog gena kako bi

se mogao izvesti sveobuhvatni zaključak s obzirom na utjecaj OPG polimorfizma na učestalost aortalne stenoze.

S obzirom na povezanost polimorfizma OPG gena sa učestalošću kardiovaskularnih bolesti nedavno objavljena meta analiza 7 populacijskih studija utvrdila je usku povezanost rs2073617 T>C and rs2073618 G>C polimorfizma u kodnom području OPG gena sa pojavnošću kardiovaskularnih bolesti (49). No nakon provedene analize s obzirom na etničku pripadnost ispitanika statistički značajna korelacija OPG polimorfizma uočena je samo kod Azijata dok isti podaci nisu potvrđeni za pripadnike bjelačkih populacija (49).

S obzirom na specifične kardiovaskularne bolesti polimorfizam kodnih područja OPG gena do sada je povezan sa koronarnom aterosklerozom (rs2073618) kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom pojavnošću hipertrofije lijevog srca kod pacijenata sa esencijalnom hipertenzijom (1181CC genotip), povećanim rizikom za razvoj periferne okluzivne bolesti arterija i kritične ishemije ekstremiteta kod pacijenata sa dijabetesom tipa II (T245G, T950C, i G1181C polimorfizam), serumskom razinom OPG proteina kod pacijenata sa razvojem karotidnog aterosklerotskog plaka (GG genotip T245G polimorfizma, CC genotip T950C polimorfizma i CC genotip G1181C polimorfizma), morfologijom koronarnih arterija, kalcifikacijom aorte (rs9594782), dijastoličkim krvnim tlakom kod starijih muškaraca (rs11573901), debljinom intima-medije karotidne arterije kod hipertenzivnih pacijenata (promotorska regija gena) (*Brändström H, Stiger F, Kahan T, Melhus H, Nyström F, Öhman KP, Malmqvist K, Lind L, Kindmark A. A single nucleotide polymorphism in the promoter region of the osteoprotegerin gene is related to intima-media thickness of the carotid artery in hypertensive patients. The Swedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation vs Atenolol (SILVHIA). Blood Press. 2004;13(3):152-7.*), kao i funkcijom i morfologijom vaskulature i kod po svemu sudeći zdravih osoba (T/C tranicija locirana 129 bp uzvodno od TATA-regije OPG gena) (71- 81).

Sve navedeno ukazuje na važnost OPG polimorfizma u fiziološkom i patofiziološkom funkcioniranju kardiovaskularnog sustava te dodatno indicira potrebu za danjim studijama koje će za cilj imati analizu potencijalne povezanosti polimorfizma kodnog slijeda OPG gena sa učestalošću i kliničkim manifestacijama aortalne stenoze.

## 9. ZAKLJUČCI

- rs3102735 SNP polimorfizam smješten u nekodirajućem intronskom slijedu OPG (TNRSF11B) gena nije povezan sa učestalošću aortalne stenozе u ispitanoj Hrvatskoj populaciji AVS pacijenata.
- nije zabilježena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova i alela rs3102735 SNP polimorfizma OPG gena između AVS i kontrolnih ispitanika kako s obzirom na ukupan broj ispitanika tako ni s obzirom na stratifikaciju pacijenata i kontrolnih ispitanika prema spolu.
- S obzirom na brojne literaturne navode o povezanosti polimorfizma kodirajućih i promotorskih regija OPG gena sa različitim kardiovaskularnim bolestima kao i sa funkcijom i strukturom krvožilnog sustava i kod naočigled zdravih ispitanika nužno je provesti daljnje studije tih polimorfizama u skupini pacijenata sa aortalnom stenozom kako bi se utvrdila njihova eventualna povezanost sa inicijacijom, progresijom i kliničkim manifestacijama AVSa.

## **10. ZAHVALE**

Zahvaljujem se djelatnicima Zavoda za medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na stimulativnoj atmosferi i pomoći koju su mi pružili tijekom izrade ovoga rada, a posebno mentoru Frani Paiću na stručnom vodstvu.

## 11. LITERATURA

1. Miller JD, Weiss RM, Heistad DD. Calcific aortic valve stenosis: methods, models, and mechanisms. *Circ Res.* 2011;108(11):1392-412.
2. Yetkin E, Waltenberger J. Molecular and cellular mechanisms of aortic stenosis. *Int J Cardiol.* 2009;135(1):4-13.
3. Helske S, Kupari M, Lindstedt KA, Kovanen PT. Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process. *Curr Opin Lipidol.* 2007;18(5):483-91.
4. Parolari A, Loardi C, Mussoni L, Cavallotti L, Camera M, Biglioli P, Tremoli E, Alamanni F. Nonrheumatic calcific aortic stenosis: an overview from basic science to pharmacological prevention. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2009;35(3):493-504.
5. Mookadam F, Jalal U, Wilansky S. Aortic valve disease: preventable or inevitable? *Future Cardiol.* 2010;6(6):777-83.
6. Yutzey KE, Demer LL, Body SC, Huggins GS, Towler DA, Giachelli CM, Hofmann-Bowman MA, Mortlock DP, Rogers MB, Sadeghi MM, Aikawa E. Calcific aortic valve disease: a consensus summary from the Alliance of Investigators on Calcific Aortic Valve Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014; 34(11):2387-93.
7. Levinson GE, Alpert JS: Aortic stenosis, in Alpert JS, Dalen JE, Rahimtoola SH (eds): *Valvular Heart Disease*, 3rd ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2000; p 183.
8. Freeman RV, Otto CM. Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation.* 2005; 111(24):3316-26.
9. William Stokes .*The Diseases of the Heart and the Aorta.*1845.
10. MönckebergJG. Der normale histolog ische Bau und die Sklerose der Aortenklappen. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol.* 1904; 176:472–514.

11. Selzer A. Changing aspects of the natural history of valvular aortic stenosis. *N Engl J Med.* 1987 Jul 9;317(2):91-8.
12. Passik CS, Ackermann DM, Pluth JR, Edwards WD: Temporal changes in the causes of aortic stenosis: A surgical pathologic study of 646 cases. *Mayo Clin Proc* 1987; 62:119.
13. Iung B, Vahanian A. Epidemiology of valvular heart disease in the adult. *Nat Rev Cardiol.* 2011; 8(3):162-72.
14. Gohlke-Bärwolf C, Minners J, Jander N, Gerdtts E, Wachtell K, Ray S, Pedersen TR. Natural history of mild and of moderate aortic stenosis-new insights from a large prospective European study. *Curr Probl Cardiol.* 2013; 38(9):365-409.
15. Thaden JJ, Nkomo VT, Enriquez-Sarano M. The global burden of aortic stenosis. *Prog Cardiovasc Dis.* 2014; 56(6):565-71.
16. Kupari M, Lindroos M, Iivanainen AM, et al. Congestive heart failure in old age: prevalence, mechanisms and 4-year prognosis in the Helsinki Ageing Study. *J Intern Med* 1997;241:387–94.
17. Fedak PWM, Verma S, David TE, et al: Clinical and pathophysiological implications of a bicuspid aortic valve. *Circulation* 2002; 106:900.
18. Siu SC, Silversides CK. Bicuspid aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol.* 2010 Jun 22;55(25):2789-800.
19. Otto CM. calcification of bicuspid aortic valves. *Heart* 2002,88:321-322
20. Mihaljevic T, Sayeed M R , Stamou S C , Paul S. Pathophysiology of Aortic Valve Disease. Cohn Lh, ed. *Cardiac Surgery in the Adult.* New York: McGraw-Hill, 2008:825-840.
21. Otto CM, Prendergast B. Aortic-valve stenosis--from patients at risk to severe valve obstruction. *N Engl J Med.* 2014; 371(8):744-56.
22. Osnabrugge RL, Mylotte D, Head SJ, Van Mieghem NM, Nkomo VT, LeReun CM, Bogers AJ, Piazza N, Kappetein AP. Aortic stenosis in the elderly: disease prevalence and number of

- candidates for transcatheter aortic valve replacement: a meta-analysis and modeling study. *J Am Coll Cardiol.* 2013; 62(11):1002-12.
23. Goldberg SH, Elmariah S, Miller MA, Fuster V. Insights into degenerative aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol.* 2007; (13):1205-13.).
24. Coffey S, Cox B, Williams MJ. The prevalence, incidence, progression, and risks of aortic valve sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2014; 63(25 Pt A):2852-61. *Mol Biol Rep.* 2014; 41(9):5645-63.
25. Otto CM, Burwash IG, Legget ME, et al. Prospective study of asymptomatic valvular aortic stenosis. Clinical, echocardiographic, and exercise predictors of outcome. *Circulation* 1997; 95:2262–70.
26. Garg V. Molecular genetics of aortic valve disease. *Curr Opin Cardiol.* 2006; 21(3):180-4.
27. Bonow RO, Leon MB, Doshi D, Moat N. Management strategies and future challenges for aortic valve disease. *Lancet.* 2016 Mar 26; 387(10025):1312-23.
28. Czarny MJ1, Resar JR. Diagnosis and management of valvular aortic stenosis. *Clin Med Insights Cardiol.* 2014; 8(Suppl 1):15-24.
29. Lindman BR, Bonow RO, Otto CM. Current management of calcific aortic stenosis. *Circ Res.* 2013; 113(2):223-37.
30. Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP 3rd, Guyton RA, O'Gara PT, Ruiz CE, Skubas NJ, Sorajja P, Sundt TM 3rd, Thomas JD; American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2014; 63(22):2438-88.
- Cao C, Liou KP, Pathan FK, Virk S, McMonnies R, Wolfenden H, Indraratna P. Transcatheter Aortic Valve Implantation versus Surgical Aortic Valve Replacement: Meta-



- Analysis of Clinical Outcomes and Cost-Effectiveness. *Curr Pharm Des*. 2016 Feb 19. [Epub ahead of print]
31. Puri R, Iung B, Cohen DJ, Rodés-Cabau J. TAVI or No TAVI: identifying patients unlikely to benefit from transcatheter aortic valve implantation. *Eur Heart J*. 2016 Jan 26. pii: ehv756. [Epub ahead of print]
  32. Yurek LA, Jakub KE, Menacho MM. Severe Symptomatic Aortic Stenosis in Older Adults: Pathophysiology, Clinical Manifestations, Treatment Guidelines, and Transcatheter Aortic Valve Replacement (TAVR). *J Gerontol Nurs*. 2015 Jun; 41(6):8-13.
  33. Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, Grossfeld PD, Srivastava D. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature*. 2005;437(7056):270-4.
  34. Mohamed SA, Aherrahrou Z, Liptau H, Erasmi AW, Hagemann C, Wrobel S, Borzym K, Schunkert H, Sievers HH, Erdmann J. Novel missense mutations (p.T596M and p.P1797H) in NOTCH1 in patients with bicuspid aortic valve. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Jul 14;345(4):1460-5.
  35. O'Brien KD. Epidemiology and genetics of calcific. aortic valve disease. *J Investig Med*. 2007;55(6):284-91.
  36. Golubnitschaja O, Yeghiazaryan K, Skowasch D, Schild H, Bauriedel G. p21WAF1/CIP1 and 14-3-3 sigma gene expression in degenerated aortic valves: a link between cell cycle checkpoints and calcification. *Amino Acids*. 2006 Oct;31(3):309-16.
  37. Ortlepp JR, Hoffmann R, Ohme F, Lauscher J, Bleckmann F, Hanrath P. The vitamin D receptor genotype predisposes to the development of calcific aortic valve stenosis. *Heart*. 2001 Jun;85(6):635-8., 18.

38. Novaro GM, Sachar R, Pearce GL, Sprecher DL, Griffin BP. Association between apolipoprotein E alleles and calcific valvular heart disease. *Circulation*. 2003 Oct 14;108(15):1804-8.
39. Ortlepp JR, Pillich M, Mevissen V, Krantz C, Kimmel M, Autschbach R, Langebartels G, Erdmann J, Hoffmann R, Zerres K. APOE alleles are not associated with calcific aortic stenosis. *Heart*. 2006 Oct;92(10):1463-6.
40. Anger T, Ekici AB, Daniel WG, Garlichs CD. Gene polymorphisms leading to calcified and stenotic aortic valves. *Herz*. 2006 Oct;31(7):635-43.
41. Avakian SD, Annicchino-Bizzacchi JM, Grinberg M, Ramires JA, Mansura AP. Apolipoproteins AI, B, and E polymorphisms in severe aortic valve stenosis. *Clin Genet*. 2001 Nov;60(5):381-4.
42. Nordström P, Glader CA, Dahlén G, Birgander LS, Lorentzon R, Waldenström A, Lorentzon M. Oestrogen receptor alpha gene polymorphism is related to aortic valve sclerosis in postmenopausal women. *J Intern Med*. 2003 Aug;254(2):140-6.
43. Schmitz F, Ewering S, Zerres K, Klomfass S, Hoffmann R, Ortlepp JR. Parathyroid hormone gene variant and calcific aortic stenosis. *J Heart Valve Dis*. 2009 May;18(3):262-7.
44. Ortlepp JR, Schmitz F, Mevissen V, Weiss S, Huster J, Dronskowski R, Langebartels G, Autschbach R, Zerres K, Weber C, Hanrath P, Hoffmann R. The amount of calcium-deficient hexagonal hydroxyapatite in aortic valves is influenced by gender and associated with genetic polymorphisms in patients with severe calcific aortic stenosis. *Eur Heart J*. 2004 Mar;25(6):514-22.
45. Thanassoulis G, Campbell CY, Owens DS, Smith JG, Smith AV, Peloso GM, Kerr KF, Pechlivanis S, Budoff MJ, Harris TB, Malhotra R, O'Brien KD, Kamstrup PR, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A, Allison MA, Aspelund T, Criqui MH, Heckbert SR, Hwang SJ, Liu Y, Sjogren M, van der Pals J, Kälsch H, Mühleisen TW, Nöthen MM, Cupples LA, Caslake

- M, Di Angelantonio E, Danesh J, Rotter JI, Sigurdsson S, Wong Q, Erbel R, Kathiresan S, Melander O, Gudnason V, O'Donnell CJ, Post WS; CHARGE Extracoronary Calcium Working Group. Genetic associations with valvular calcification and aortic stenosis. *N Engl J Med*. 2013;368(6):503-12.
46. Arsenault BJ, Boekholdt SM, Dubé MP, Rhéaume E, Wareham NJ, Khaw KT, Sandhu MS1, Tardif JC. Lipoprotein(a) levels, genotype, and incident aortic valve stenosis: a prospective Mendelian randomization study and replication in a case-control cohort. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014;7(3):304-10., Smith JG, Luk K, Schulz CA, Engert JC, Do R, Hindy G, Rukh G, Dufresne L, Almgren P, Owens DS, Harris TB, Peloso GM, Kerr KF, Wong Q, Smith AV, Budoff MJ, Rotter JI, Cupples LA, Rich S, Kathiresan S, Orho-Melander M, Gudnason V, O'Donnell CJ, Post WS, Thanassoulis G; Cohorts for Heart and Aging Research in Genetic Epidemiology (CHARGE) Extracoronary Calcium Working Group. Association of low-density lipoprotein cholesterol-related genetic variants with aortic valve calcium and incident aortic stenosis. *JAMA*. 2014;312(17):1764-71.
47. Kutikhin AG, Yuzhalin AE, Brusina EB, Ponasenkov AV, Golovkin AS, Barbarash OL. Genetic predisposition to calcific aortic stenosis and mitral annular calcification. *Mol Biol Rep*. 2014;41(9):5645-63.
48. Makarović S, Makarović Z, Steiner R, Mihaljević I, Milas-Ahić J. Osteoprotegerin and Vascular Calcification: Clinical and Prognostic Relevance. *Coll Antropol*. 2015;39(2):461-8.
49. Song DH, Zhou PZ, Xiu XL, Zhou GH, Sun YX, Song C. Relationships of OPG Genetic Polymorphisms with Susceptibility to Cardiovascular Disease: A Meta-Analysis. *Med Sci Monit*. 2016;22:1223-31.
50. Soufi M, Schoppet M, Sattler AM, Herzum M, Maisch B, Hofbauer LC, Schaefer JR. Osteoprotegerin gene polymorphisms in men with coronary artery disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(8):3764-8.

51. Nybo M, Rasmussen LM. The capability of plasma osteoprotegerin as a predictor of cardiovascular disease: a systematic literature review. *Eur J Endocrinol.* 2008;159(5):603-8.
52. Hosbond SE, Poulsen TS, Diederichsen AC, Nybo M, Rasmussen LM, Mickley H. Osteoprotegerin as a marker of atherosclerosis: a systematic update. *Scand Cardiovasc J.* 2012;46(4):203-11.
53. Tousoulis D, Siasos G, Maniatis K, Oikonomou E, Kioufis S, Zaromitidou M, Paraskevopoulos T, Michalea S, Kollia C, Miliou A, Kokkou E, Papavassiliou AG, Stefanadis C. Serum osteoprotegerin and osteopontin levels are associated with arterial stiffness and the presence and severity of coronary artery disease. *Int J Cardiol.* 2013;167(5):1924-8.
54. Van Campenhout A, Golledge J. Osteoprotegerin, vascular calcification and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2009;204(2):321-9.
55. D'Amelio P, Isaia G, Isaia GC. The osteoprotegerin/RANK/RANKL system: a bone key to vascular disease. *J Endocrinol Invest.* 2009;32(4 Suppl):6-9.
56. Kiechl S, Werner P, Knoflach M, Furtner M, Willeit J, Schett G. The osteoprotegerin/RANK/RANKL system: a bone key to vascular disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2006;4(6):801-11.
57. Collin-Osdoby P. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Circ Res.* 2004;95(11):1046-57.
58. Dahl JS, Videbæk L, Poulsen MK, Rudbaek TR, Christensen NL, Pellikka PA, Rasmussen LM, Møller JE. Relation of osteoprotegerin in severe aortic valve stenosis to postoperative outcome and left ventricular function. *Am J Cardiol.* 2013;112(9):1433-8.
59. Kapelouzou A, Tsourelis L, Kaklamanis L, Degiannis D, Kogerakis N, Cokkinos DV. Serum and tissue biomarkers in aortic stenosis. *Glob Cardiol Sci Pract.* 2015;2015(4):49.

60. Passmore M, Nataatmadja M, Fung YL, Pearse B, Gabriel S, Tesar P, Fraser JF. Osteopontin alters endothelial and valvular interstitial cell behaviour in calcific aortic valve stenosis through HMGB1 regulation. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2015;48(3):e20-9.
61. Poggio P, Grau JB, Field BC, Sainger R, Seefried WF, Rizzolio F, Ferrari G. Osteopontin controls endothelial cell migration in vitro and in excised human valvular tissue from patients with calcific aortic stenosis and controls. *J Cell Physiol*. 2011;226(8):2139-49.
62. Weiss RM, Lund DD, Chu Y, Brooks RM, Zimmerman KA, El Accaoui R, Davis MK, Hajj GP, Zimmerman MB, Heistad DD. Osteoprotegerin inhibits aortic valve calcification and preserves valve function in hypercholesterolemic mice. *PLoS One*. 2013;8(6):e65201.
63. Borowiec A, Dąbrowski R, Kowalik I, Firek B, Chwyczko T, Janas J, Szwed H. Osteoprotegerin in patients with degenerative aortic stenosis and preserved left-ventricular ejection fraction. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2014 Nov 21.
64. Lis GJ, Czubek U, Jasek-Gajda E, Łoboda A, Dulak J, Nessler J, Kapelak B, Sadowski J, Litwin JA. Influence of osteoclasts and osteoprotegerin on the mode of calcific degeneration of aortic valves. *Pol Arch Med Wewn*. 2016;126(3):149-58.
65. Lis GJ, Czubek U, Jasinska M, Jasek E, Loboda A, Dulak J, Nessler J, Sadowski J, Litwin JA. Elevated serum osteoprotegerin is associated with decreased osteoclastic differentiation in stenotic aortic valves. *J Physiol Pharmacol*. 2014;65(3):377-82.
66. Steinmetz M, Skowasch D, Wernert N, Welsch U, Preusse CJ, Welz A, Nickenig G, Bauriedel G. Differential profile of the OPG/RANKL/RANK-system in degenerative aortic native and bioprosthetic valves. *J Heart Valve Dis*. 2008;17(2):187-93.
67. Ueland T, Aukrust P, Dahl CP, Husebye T, Solberg OG, Tønnessen T, Aakhus S, Gullestad L. Osteoprotegerin levels predict mortality in patients with symptomatic aortic stenosis. *J Intern Med*. 2011;270(5):452-60.

68. Kaden JJ, Bickelhaupt S, Grobholz R, Haase KK, Sarikoç A, Kiliç R, Brueckmann M, Lang S, Zahn I, Vahl C, Hagl S, Dempfle CE, Borggreffe M. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;36(1):57-66.
69. Irtiuga OB, Zhiduleva EV, Dubrovskaja OB, Moiseeva OM. Concentration of osteoprotegerin and RANKL in blood serum of patients with aortic stenosis. *Kardiologia.* 2014;54(6):44-8.;
70. Pérez de Ciriza C, Lawrie A2, Varo N. Osteoprotegerin in Cardiometabolic Disorders. *Int J Endocrinol.* 2015;2015:564934.
71. Guo C, Hu F, Zhang S, Wang Y, Liu H. Association between osteoprotegerin gene polymorphisms and cardiovascular disease in type 2 diabetic patients. *Genet Mol Biol.* 2013;36(2):177-82.
72. Mankoç Ramuš S, Kumše T, Globočnik Petrovič M, Petrovič D, Cilenšek I. SNP rs2073618 of the osteoprotegerin gene is associated with diabetic retinopathy in Slovenian patients with type 2 diabetes. *Biomed Res Int.* 2013;2013:364073.
73. Golledge J, Biros E, Clancy P, Cooper M, Palmer LJ, Norman PE. A single-nucleotide polymorphism in the gene encoding osteoprotegerin is associated with diastolic blood pressure in older men. *Am J Hypertens.* 2009;22(11):1167-70.
74. Straface G, Biscetti F, Pitocco D, Bertolotti G, Misuraca M, Vincenzoni C, Snider F, Arena V, Stigliano E, Angelini F, Iuliano L, Boccia S, de Waure C, Giacchi F, Ghirlanda G, Flex A. Assessment of the genetic effects of polymorphisms in the osteoprotegerin gene, TNFRSF11B, on serum osteoprotegerin levels and carotid plaque vulnerability. *Stroke.* 2011;42(11):3022-8.
75. Brändström H, Stiger F, Kahan T, Melhus H, Nyström F, öHman KP, Malmqvist K, Lind L, Kindmark A. A single nucleotide polymorphism in the promoter region of the

- osteoprotegerin gene is related to intima-media thickness of the carotid artery in hypertensive patients. The Swedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation vs Atenolol (SILVHIA). *Blood Press.* 2004;13(3):152-7.
76. Rhee EJ, Oh KW, Jung CH, Lee WY, Oh ES, Yun EJ, Baek KH, Kang MI, Kim SW. The relationship between four single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the osteoprotegerin gene and aortic calcification or coronary artery disease in Koreans. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006;64(6):689-97.
77. Chung CP, Solus JF, Oeser A, Li C, Raggi P, Smith JR, Stein CM. A variant in the osteoprotegerin gene is associated with coronary atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis: results from a candidate gene study. *Int J Mol Sci.* 2015;16(2):3885-94.
78. Shen A, Hou X, Yang D, Liu T, Zheng D, Deng L, Zhou T. Role of osteoprotegerin and its gene polymorphisms in the occurrence of left ventricular hypertrophy in essential hypertensive patients. *Medicine (Baltimore).* 2014;93(29):e154.
79. Biscetti F, Porreca CF, Bertucci F, Straface G, Santoliquido A, Tondi P, Angelini F, Pitocco D, Santoro L, Gasbarrini A, Landolfi R, Flex A. TNFRSF11B gene polymorphisms increased risk of peripheral arterial occlusive disease and critical limb ischemia in patients with type 2 diabetes. *Acta Diabetol.* 2014;51(6):1025-32.
80. Celczyńska Bajew L, Horst Sikorska W, Bychowicz B, Wykrętowicz A, Wesoły J, Michalak M. The effects of osteoprotegerin (OPG) gene polymorphism in patients with ischaemic heart disease on the morphology of coronary arteries and bone mineral density. *Kardiol Pol.* 2011;69(6):573-8.

## 12. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 5.ožujka 1987. godine u Virovitici. Osnovnu i srednju školu smjera opća gimnazija pohađao sam u Daruvaru. Maturirao 2005. god s odličnim uspjehom te iste godine upisujem studij na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. 2016. godine sam pri završetku studija.

U početku studija pridružujem se Zavodu za medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta u istraživačkom radu. Iz te suradnje je proizašlo nekoliko znanstvenih radova i preglednih članaka.

Tijekom cijelog trajanja studija radim raznolike studentske poslove (ugostiteljstvo, telekomunikacije, administrativni poslovi, čišćenja, skladišta....) te se rekreativno bavim raznim sportovima.