

Povezanost polimorfizama -786 T > C i 894 G > T u genu eNOS i moždanih udara kod djece

Grabić, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:318126>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Maja Grabić

**Povezanost polimorfizama -786 T > C i 894 G > T
u genu *eNOS* i moždanih udara kod djece**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Koagulacija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, Odjelu za laboratorijsku hematologiju i koagulaciju Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Renate Zadro.

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Renati Zadro na uloženom trudu i brojnim savjetima prilikom izrade ovog diplomskog rada. Također, od srca se zahvaljujem asistentici Andrei Čeri na nesebičnoj pomoći tokom ekperimentalnog dijela rada.

Veliko hvala mojim roditeljima, bratu i obitelji na nepresušnoj podršci tijekom cijelog studija. Hvala dečku, prijateljima i prijateljicama koji su mi uljepšali studiranje i s kojima sam stvorila uspomene za cijeli život!

Hvala što ste vjerovali u mene!

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Sintaze dušikovog oksida (NOS).....	1
1.2. Endotelna NO sintaza	2
1.2.1. Struktura i katalitički mehanizam eNOS	2
1.2.2. Regulacija aktivnosti eNOS	3
1.2.3. Funcije eNOS i mehanizam djelovanja.....	4
1.2.4. Gen za <i>eNOS</i> i polimorfizmi -786 T > C, 894 G > T.....	6
1.3. Moždani udar kod djece	6
1.3.1. Definicija i podjela moždanih udara kod djece.....	6
1.3.2. Cerebralna sinus venska tromboza (CSVTV).....	8
1.4. Važnost NO kod ishemijskog moždanog udara	8
2. OBRAZLOŽENJE TEME	9
3. MATERIJALI I METODE	10
3.1. Ispitanici i uzorci	10
3.2. Izdvajanje DNA	10
3.3. Umnažanje fragmenata DNA za genotipizaciju polimorfizama -786 T > C i 894 G > T u genu <i>eNOS</i>	10
3.4. Kontrolna elektroforeza umnoženih PCR produkata.....	12
3.4. Hibridizacija	13
3.5. Očitavanje rezultata	15
3.6. Statistička analiza	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	18
4.1. Rezultati.....	18
4.1. Rasprava	25
5. ZAKLJUČCI	27
6. LITERATURA	28
7. SAŽETAK / SUMMARY	32
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTACION CARD	

1. UVOD

1.1. Sintaze dušikovog oksida (NOS)

Dušikov oksid (NO) je signalna molekula u sisavaca. Sudjeluje u neurotransmisiji i održavanju tonusa krvnih žila. U sisavaca ga proizvode 3 izoforme sintaze NO (NOS): endotelna (eNOS), neuralna (nNOS) i inducibilna (iNOS). Svaka izoforma ima različite funkcije, ovisno o lokalizaciji.

Neuralna NOS izražena je u središnjim i perifernim neuronima u kojima su pronađene najviše razine NO. Smatra se da neuralni NO sudjeluje u sinaptičkoj plastičnosti u središnjem živčanom sustavu, centralnoj regulaciji krvnog tlaka, relaksaciji glatkih mišića i vazodilataciji putem perifernih nitrergičnih neurona (Förstermann i Sessa, 2012). U autonomnom živčanom sustavu NO djeluje kao non-adrenergični non-kolinergični neurotransmiter (engl. *non-noradrenergic non-colinergic*, NANC). Signalni put NANC igra važnu ulogu u relaksaciji glatkih mišića u moždanoj cirkulaciji, gastrointestinalnom, urogenitalnom i respiratornom traktu (Bredt, 1999). NO, također, ima veliku ulogu i u skeletnim mišićima. nNOS se nalazi u plazmatskoj membrani skeletnog mišića gdje regulira mišićnu perfuziju.

Dok NO u fiziološkim uvjetima djeluje kao neuromodulator, povišene razine NO posreduju u ozljedi mozga. NO je kao slobodni radikal reaktivan i uzrokuje staničnu toksičnost oštećujući metaboličke enzime i reagirajući sa superoksidom pri čemu nastaje još jači oksidans, peroksinitrit. Smatra se da preko ovih mehanizama NO ima svoju ulogu u patofiziologiji moždanog udara, Parkinsonove bolesti i Huntingtonove bolesti, multiple skleroze i Alzheimerove bolesti.

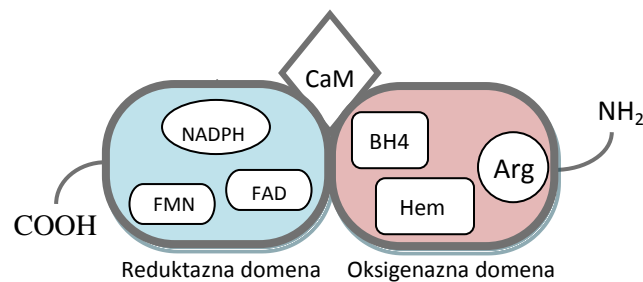
Inducibilna NOS nije izražena u stanicama, nego je njen izražaj potaknut bakterijskim lipopolisaharidima, citokinima ili drugim upalnim signalnim molekulama. Inducibilna NOS u makrofagima proizvodi velike količine NO koji doprinosi citotoksičnom djelovanju makrofaga. Tim mehanizmom iNOS sudjeluje u nespecifičnom imunološkom odgovoru. Kao odgovor na upalu, iNOS proizvede velike količine NO što dovodi do masivne arterijske vazodilatacije, pada krvnog tlaka i mikrovaskularnih oštećenja. Stoga se smatra da iNOS doprinosi patofiziologiji septičkog šoka.

Endotelna NOS izražena je u endotelu krvnih žila, no pronađena je i u srčanim miocitima, trombocitima, određenim neuronima u mozgu, u ljudskoj placenti i LLC-PK₁ tubularnim epitelnim stanicama bubrega (Förstermann i sur., 1994). Sudjeluje u vazodilataciji, regulaciji krvnog tlaka, inhibira agregaciju trombocita i njihovu adheziju na zid krvne žile. Također, ima brojna vazoprotektivna i anti-aterosklerotska djelovanja koja će biti opširnije opisana u nastavku rada.

1.2. Endotelna NO sintaza

1.2.1. Struktura i katalitički mehanizam eNOS

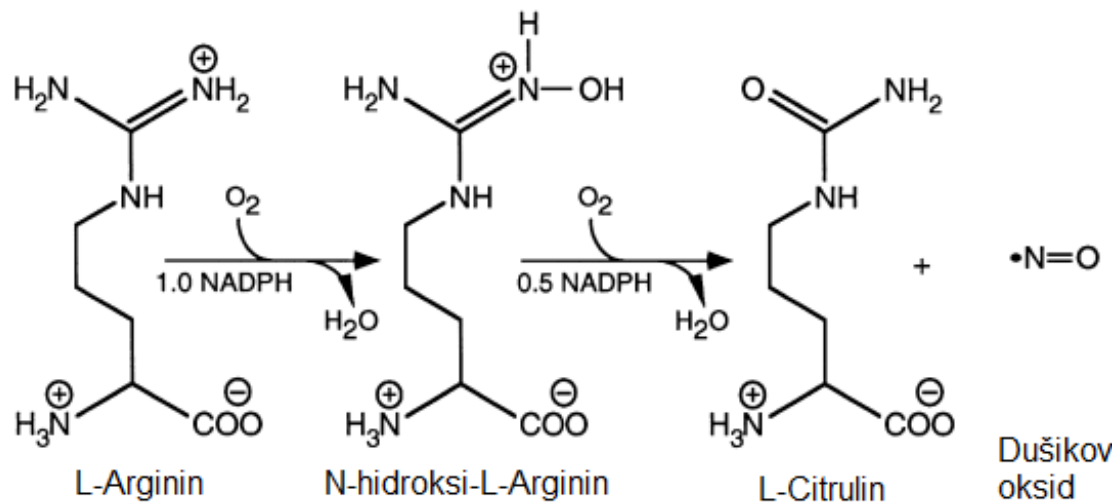
Endotelna NOS funkcionira kao dimer koji se sastoji od dva identična monomera (molekularna masa monomera je 134 kDa). Svaki monomer sadrži C-terminalnu reduktaznu domenu i N-terminalnu oksigenaznu domenu (Zhu i sur., 2016). Enzim sadrži regiju veznih mjesta za nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfat (NADPH), flavin adenin dinukleotid (FAD) i flavin mononukleotid (FMN) i regiju veznih mjesta za hem, (6R)-5,6,7,8-tetrahidro-L-biopterin (BH4) i supstrat L-arginin. Između tih regija nalazi se kalmodulin (CaM)-vezujuća domena.



Slika 1. Shematski prikaz monomera NO sintaze koji prikazuje vezujuća mjesta za kofaktore i supstrat (NADPH, nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfat; FMN, flavin mononukleotid; FAD, flavin adenin dinukleotid; CaM, kalmodulin-vezujuća domena; BH4, (6R)-5,6,7,8-tetrahidro-L-biopterin; Arg, arginin)

NO sintaze kataliziraju bioprodukciju NO konverzijom L-arginina u L-citrulin. Endotelna i neuralna NOS su konstitutivni enzimi ovisni o kalciju, dok je inducibilna NOS aktivna samo kada je potaknuta visokom razinom citokina ili drugih upalnih medijatora i neovisna je o razini kalcija.

Za stvaranje 1 mola L-citrulina je potrebno 1,5 mola NADPH i 2 mola kisika (Andrew i Mayer, 1999). NADPH i kisik djeluju kao kosupstrati, a FAD, FMN i BH₄ kao kofaktori enzima. Biosinteza NO se odvija kroz dva oksidacijska koraka. U prvom oksidacijskom koraku iz L-arginina nastaje N-hidroksi-L-arginin i voda, a troši se 1 mol NADPH i jedna molekula kisika. Ova reakcija hidroksilacije sliči klasičnoj P450 monooksigenaznoj reakciji (Bredt, 1999). U drugom oksidacijskom koraku iz N-hidroksi-L-arginina nastaje L-citrulin, NO i voda, a troši se 0,5 mola NADPH i jedna molekula kisika. Za obje je reakcije potreban kalcij i kalmodulin koji djeluju kao aktivatori te BH₄ koji je akcelerator reakcije. Reakcije mogu biti inhibirane s CO.



Slika 2. Bioprodukcija NO (Preuzeto i prilagođeno iz rada Andrew i Mayer, 1999)

Funkcionalna NOS prenosi elektron od NADPH preko FAD-a i FMN-a u C-terminalnoj reduktaznoj domeni do hema u N-terminalnoj oksigenaznoj domeni. U oksigenaznoj domeni, taj elektron omogućava feri (Fe³⁺) hemu vezanje kisika i prelazak u fero (Fe²⁺) hem te dolazi do redukcije i aktivacije O₂ te oksidacije L-arginina u L-citrulin i NO.

1.2.2. Regulacija aktivnosti eNOS

Aktivnost eNOS ovisna je o koncentraciji kalcija. Porast unutarstanične koncentracije kalcija dovodi do povećanog vezanja kalmodulina na enzim, što olakšava prijenos elektrona s NADPH u reduktaznoj domeni do hema u oksigenaznoj domeni. No, sam porast kalcija ne može pokrenuti proizvodnju NO, potrebne su i određene fosforilacije. Dva najvažnija

fosforilacijska mjesta u eNOS su dva aminokiselinska ostatka, Ser1177 i Thr495 (Fleming i Busse, 2003). Ser1177 nalazi se u reduktaznoj, a Thr495 u CaM-vezujućoj domeni.

Iako je eNOS izoforma čija je aktivnost najosjetljivija na koncentraciju kalcija, postoje načini na koje se enzim može aktivirati i bez unutarstaničnog povećanja kalcija. Jedna od najbitnijih Ca^{2+} -neovisnih aktivacija je stres endotelnog smicanja (engl. *endothelial shear stress*, ESS). ESS je posljedica tangencijalne sile koja nastaje trenjem krvi o površinu endotela krvnih žila. Posljedica ESS-a je aktivacija fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K). PI3K aktivira protein kinazu A (PKA) i protein kinazu B (PKB), koje fosforiliraju Ser1177 što rezultira povećanjem aktivnosti eNOS (Dimmeler i sur., 1999). Bradikinin i histamin također aktiviraju eNOS fosforilacijom, no za aktivaciju transdukcijske kaskade potrebno je i povećanje u koncentraciji Ca^{2+} . Razlog zbog kojeg je ova aktivacija fosforilacijom ovisna o Ca^{2+} je to što se u ovim različitim signalnim putevima za fosforilaciju koriste različiti enzimi, od kojih su neki više, a neki manje ovisni o koncentraciji kalcija. Stoga, ukoliko je enzim koji fosforilira eNOS ovisan o Ca^{2+} , onda uz fosforilaciju mora biti prisutno i povećanje koncentracije Ca^{2+} . No, ukoliko enzim nije ovisan o Ca^{2+} , tada će on sam moći aktivirati eNOS i dovesti do stvaranja NO.

Fosforilacija Ser1177 je inducirana kada su endotelne stanice izložene estrogenu, vaskularnom endotelnom faktoru rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), inzulinu, bradikininu i ESS-u. Fosforilacija serina olakšava prijenos elektrona u reduktaznoj domeni te tako dovodi do povećane proizvodnje NO.

Thr495 je negativno regulacijsko mjesto. Aminokiselinski ostatak treonina je konstitutivno fosforiliran i pretpostavlja se da kao takav ometa vezanje CaM za CaM-vezujuću domenu te tako dovodi do smanjenja aktivnosti enzima (Fleming i Busse, 2003). Pretpostavlja se da je protein kinaza C (PKC) konstitutivni enzim koji fosforilira Thr495, stoga inhibitori protein kinaza dovode do povećanja aktivnosti eNOS. Enzim koji vjerojatno defosforilira Thr495 je protein fosfataza 1 (PP1).

1.2.3. Funcije eNOS i mehanizam djelovanja

Jedna od najvažnijih funkcija eNOS je dilatacija krvnih žila. NO u endotelu dovodi do dilatacije potičući topljivu gvanilil ciklazu (engl. *soluble guanylyl cyclase*, sGC) na povećanu

proizvodnju cikličkog gvanozin-monofosfata (engl. *cyclic guanosine monophosphate*, cGMP) u stanicama glatkih mišića krvne žile.

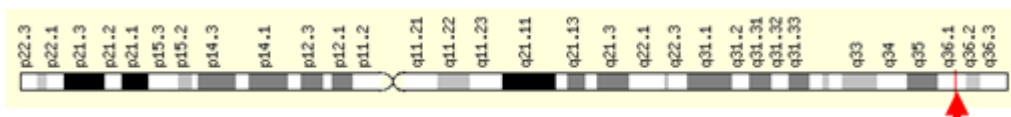
Endotelna NOS proizvodi NO u endotelu krvne žile, koji s prostaciklinima inhibira agregaciju trombocita. Naknadno, nakon aktivacije trombocita, oni sami proizvode NO (Radziwon-Balicka i sur., 2017). Mehanizam kojim NO inhibira agregaciju trombocita uključuje signalni put topljive gvanilil ciklaze i protein kinaze G (sGC-PKG). NO aktivira gvanilil ciklazu, koja ubrzava konverziju gvanozin-trifosfata (GTP) u cGMP. cGMP inhibira aktivaciju PI3K i potiče punjenje unutarstaničnih zaliha kalcija putem Ca^{2+} -ovisnih adenozin-trifosfataza (ATP-aza). Dolazi do potiskivanja unutarstaničnog protoka kalcija što dovodi do smanjene ekspresije P-selektina i aktivne konformacije glikoproteina IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) potrebnog za vezanje fibrinogena (Loscalzo, 2014). Protein kinaza G fosforilira fosfoprotein stimuliran vazodilatatorom (VASP) te tako omogućava VASP-u vezanje za citoskelet trombocita i sprječava aktivaciju $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Radziwon-Balicka i sur., 2017).

NO ima antiadhezivni učinak na trombocite, ali i na leukocite. NO na dva načina sprječava adheziju leukocita na zid krvne žile: interferira vezanje adhezijske molekule leukocita CD11/CD18 i endotelnih stanica ili suprimira izražaj CD11/CD18 na leukocitima (Kubes i sur., 1991). Adhezija leukocita na zid krvne žile je podloga za razvoj ateroskleroze pa NO sprječavajući taj događaj djeluje antiaterosklerotski. Endotelni NO ima više načina na koje djeluje antiaterosklerotski, a neki od njih su sljedeći. NO sprječava apoptozu endotelnih stanica potaknutu proupalnim citokinima i proapoptotičkim faktorima kao što su reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*, ROS) i angiotenzin II (AT). Endotelni NO smanjuje proizvodnju ROS-a i lipidnu peroksidaciju (Hong i sur., 2019). Također, sprječavajući agregaciju i adheziju trombocita, NO štiti glatki mišić krvne žile od utjecaja faktora rasta koje proizvode trombociti te tako sprječava stvaranje fibroznog plaka koji je jedan od koraka aterogeneze.

eNOS je ključan enzim za poticanje angiogeneze nakon ishemije. NO na više načina regulira uspostavljanje normalnog protoka krvi nakon ishemije. NO-posredna vazodilatacija dovodi do povećanog protoka krvi te tako utječe na preoblikovanje postojećih kolateralnih žila (Sasaki i sur., 2006). Djeluje na endotelnu migraciju te kao sekundarna signalna molekula za kontrolu arteriogeneze (Sasaki i sur., 2006). Njegova uloga u neovaskularizaciji je ključna jer potiče mobilizaciju endotelnih progenitorskih stanica preko VEGF-a.

1.2.4. Gen za *eNOS* i polimorfizmi -786 T > C, 894 G > T

Endotelna NOS kodirana je genom *NOS3* koji se nalazi na kromosomu 7 (7q36.1). Do sada je poznato nekoliko polimorfizama u genu *NOS3*, no u ovom će se radu obraditi dva polimorfizma: -786 T > C i 894 G > T.



Slika 3. Položaj gena *NOS3* na kromosomu 7 (preuzeto i prilagođeno s www.genecards.org)

Polimorfizam -786 T > C je polimorfizam jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP), što znači da dolazi do zamjene jednog nukleotida s nekim drugim. U ovom slučaju, na položaju -786 dolazi do zamjene timina s citozinom. Polimorfizam -786 T > C nalazi se u promotorskoj regiji (Kim i sur., 2010). Poznato je da se represorski protein A1 veže na eNOS -786 CC genotip i smanjuje transkripcijsku aktivnost eNOS za pedeset posto u usporedbi s eNOS -786 TT genotipom (Wei i sur., 2017). Posljedica smanjene transkripcijske aktivnosti je i smanjena proizvodnja endotelnog NO.

Polimorfizam 894 G > T je, također, SNP koji se nalazi u eksonu 7. U ovom polimorfizmu, na položaju 894 dolazi do zamjene gvanina s timinom. Smatra se da je posljedica ovog polimorfizma povećano cijepanje zrelog enzima eNOS što dovodi do smanjenog stvaranja endotelnog NO (Wei i sur., 2017).

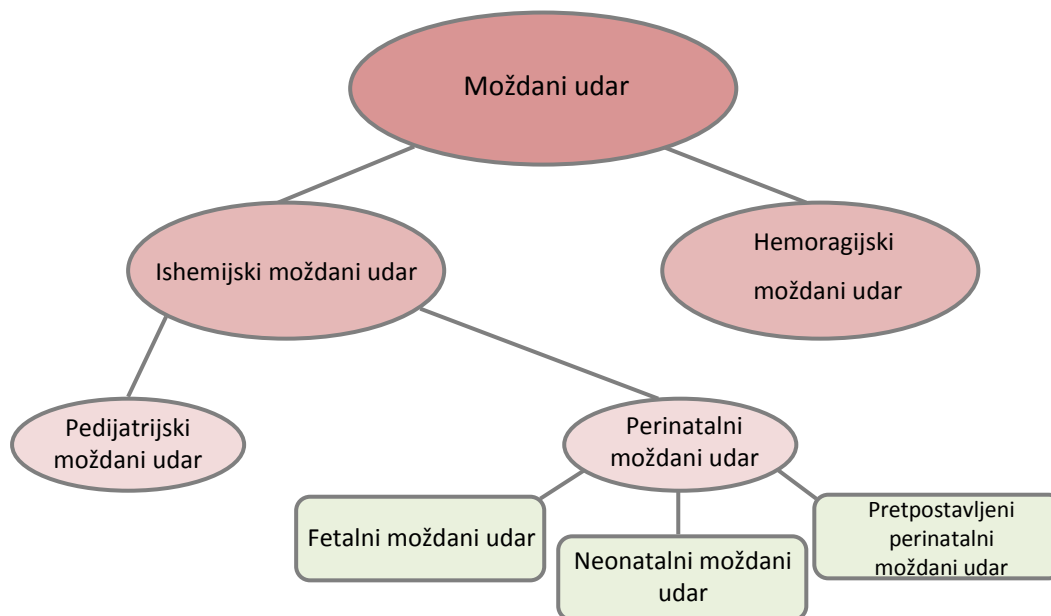
1.3. Moždani udar kod djece

1.3.1. Definicija i podjela moždanih udara kod djece

Moždani udar definiran je kao iznenadni lokalizirani poremećaj moždane cirkulacije koji izaziva neurološki ispad. Jedan je od vodećih uzroka smrti i morbiditeta u svijetu. Uvriježeno je mišljenje da je moždani udar bolest starijih ljudi, no incidencija ove bolesti kod djece već godinama raste. Danas su cerebrovaskularne bolesti među prvih deset uzročnika smrti kod djece (Lynch, 2004).

Pedijatrijski moždani udar definira se kao svaki neurološki ispad, uključujući i napadaje, povezan s akutnom promjenom koja se može vidjeti magnetskom rezonancom (Seidman i sur., 2007).

Pedijatrijski moždani udar može se podijeliti na ishemijski i hemoragični. Ishemijski moždani udar dijeli se prema vremenu nastanka na perinatalni i pedijatrijski. Perinatalni moždani udar nastupa između 28. tjedna gestacije i mjesec dana starosti, a pedijatrijski između mjesec dana starosti i 18. godine života. Perinatalni moždani udar se naknadno dijeli s obzirom na vrijeme nastanka na fetalni, neonatalni i pretpostavljeni perinatalni ishemijski moždani udar. Ishemijski moždani udar dijeli se i prema mjestu nastanka na arterijski ishemijski moždani udar (AIM) i cerebralnu sinus vensku trombozu (CSVT).



Slika 4. Podjela moždanih udara kod djece

Incidencija pedijatrijskih moždanih udara je 1,3-1,6 na 100 000 djece godišnje (Kirton i deVeber, 2015). Perinatalni moždani udari su puno češći te je njihova incidencija jedan na 3500 živorođene djece godišnje (Lynch i Nelson, 2001). Ishemijski moždani udari češći su kod dječaka i crnačke djece, no do danas nije poznato iz kojeg razloga (Raju i sur., 2007).

Pedijatrijski moždani udar ima visoke stope mortaliteta i morbiditeta. Otprilike 10-25 % djece ima fatalan ishod, do 25 % djece imat će ponovni moždani udar, a do 66 % djece razviti će trajni neurološki deficit (Tsze i Valente, 2011).

1.3.2. Cerebralna sinus venska tromboza (CSVTV)

Cerebralna sinus venska tromboza definira se kao akutno nastupanje sistemskih ili fokalnih neuroloških simptoma, pri čemu se na neurološkim slikama može uočiti tromboza cerebralnih vena ili venskih sinusa (Lynch, 2004). U većini slučajeva dolazi do stvaranja ugruška u lateralnom i gornjem sagitalnom sinusu, a u više od pola slučajeva zahvaćeno je više sinusa (Lynch, 2004).

Incidencija CSVTV-a je 0,67 na 100 000 djece godišnje (Heller i sur., 2003). Kliničke manifestacije CSVTV-a ovise o tijeku i mjestu nastanka tromba, anatomiji sinusa i starosti djeteta. CSVTV se često prikazuje blagim simptomima, a jedni od najčešćih su glavobolja, napadaji, smanjena razina svijesti i hemipareza.

1.4. Važnost NO kod ishemijskog moždanog udara

Cerebrovaskularni endotel ima važnu ulogu u regulaciji cerebralnog protoka krvi (engl. *Cerebral blood flow*, CBF) preko sinteze NO (Zhu i sur., 2016). Sinteza NO u cerebrovaskularnom endotelu ponajviše ovisi o aktivnosti eNOS, stoga je funkcionalnost eNOS važan faktor za normalnu funkciju mozga, ali i održavanje CBF-a nakon ishemijskog moždanog udara.

Tijekom ishemije dolazi do stvaranja slobodnih radikala, koji zbog svoje reaktivnosti oštećuju lipide, DNA i proteine te dovode do smrti neurona. Jedan od tih radikala je i NO. Odmah nakon ishemije dolazi do proizvodnje i otpuštanja NO preko eNOS koji djeluje zaštitno jer potiče vazodilataciju i inhibira mikrovaskularnu agregaciju i adheziju (Moro i sur., 2004). Naknadno, dolazi do otpuštanja NO od nNOS i iNOS koji doprinosi moždanom oštećenju jer reagira sa superoksidom i stvara toksični peroksinitrit. Različito djelovanje NO, ovisno o izoformi koja ga proizvodi, rezultat je različite lokalizacije, vremenskog okvira djelovanja i koncentracije NO koju izoforma proizvodi.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Moždani udar kod djece ozbiljno je stanje čija se incidencija posljednjih godina povećava. Etiologija ovog poremećaja je višestruka i još uvijek nepoznata u 30% slučajeva. Također, ne postoje službene smjernice za liječenje niti prevenciju. Iz tih razloga potrebna su opsežnija istraživanja.

NO u cerebrovaskularnom endotelu proizvodi se većinski pomoću eNOS. Polimorfizmi gena *eNOS* -786 T>C, 894 G > T dovode do smanjene aktivnosti eNOS ili povećane razgradnje zrelog eNOS što dovodi do smanjene proizvodnje endotelnog NO. Zbog svojih učinaka na cerebrovaskularni sustav, eNOS je potencijalni faktor rizika za ishemijski moždani udar.

Cilj ovog rada je istražiti utjecaj polimorfizama *eNOS* -786 T > C, 894 G > T na vjerojatnost oboljenja od cerebralne sinus venske tromboze kod djece.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici i uzorci

Za potrebe izrade ovog diplomskog rada korišteni su uzorci periferne krvi 12 muških i 12 ženskih bolesnika u dobi od 14 dana do 15 godina s dijagnozom tromboze venskih sinusa mozga (engl. *cerebral sinovenous thrombosis*, CSVT). Kontrolna skupina sastojala se od 24 muške i 24 ženske osobe u dobi od 1 mjeseca do 18 godina iz istog geografskog područja kod kojih nisu ustanovljeni neurološki i tromboembolijski poremećaji. Svi uzorci prikupljeni su u sklopu istraživačkog projekta Genski polimorfizmi i ishemijski moždani udar u djece (HRZZ IP-2014-09-2047, voditelj prof. dr. sc. Renata Zadro). Korištena je preostala količina periferne krvi s antikoagulantom etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA) ili natrij citratom (0,105 M) koja je uzeta u svrhu rutinskih laboratorijski analiza.

3.2. Izdvajanje DNA

Iz leukocita uzoraka periferne krvi ispitanika izdvojena je DNA. Metoda izdvajanja se razlikovala s obzirom na volumen uzorka. Metoda izdvajanja DNA koja se koristila za većinu ispitanika je metoda isoljavanja prema Milleru (Miller i sur., 1988) koja se temelji na taloženju proteina pri velikoj koncentraciji soli. Nakon što se odvoje istaloženi proteini, u supernatantu se nalazi DNA koja se taloži koristeći apsolutni etanol.

Kada je količina uzorka bila mala, DNA je izdvojena pomoću uređaja za automatizirano izdvajanje nukleinskih kiselina MagNA Pure Compact (Roche Applied Science, Penzberg, Njemačka). Kvaliteta i količina izdvojene DNA provjerena je spektrofotometrijski pomoću mikrovolumnog spektrofotometra NanoDrop™ Lite (Thermo Electron Scientific Instruments LLC, Madison, WI, SAD).

3.3. Umnažanje fragmenata DNA za genotipizaciju polimorfizama -786 T > C i 894 G > T u genu *eNOS*

Lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) je metoda koja se koristi za umnažanje specifičnih fragmenata DNA. Ako poznajemo okružujuće sekvence

ciljne regije DNA, PCR reakcijom možemo dobiti milijune kopija ciljne regije (Stryer i sur., 2013).

Za provođenje PCR reakcije, reakcijska otopina treba sadržavati sljedeće komponente: par početnica koje su komplementarne okružujućim sekvencama ciljne regije, izdvojenu DNA koja sadrži ciljnu regiju koju želimo umnožiti, smjesu sva četiri deoksiribonukleozid-trifosfata (dNTP), termostabilnu DNA polimerazu (Taq-polimerazu), magnezijeve ione potrebne za rad Taq-polimeraze i odgovarajući pufer.

PCR reakcija sastoji se od tri koraka. Prvi korak je razdvajanje lanaca DNA. Drugi korak je sljepljivanje početnica s lancem DNA. Treći korak je produljivanje početnica na optimalnoj temperaturi rada Taq polimeraze. Taq polimeraza je enzim koji je izoliran iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus* koja živi u vrelinim izvorima.

Multipleks PCR je metoda u kojoj se istovremeno umnaža više specifičnih fragmenata DNA pomoću više specifičnih parova početnica slične optimalne temperature vezanja za kalup.

U ovom diplomskom radu korišten je komercijalno dostupan komplet za analizu polimorfizama CVD Strip Assay A (ViennaLab, Beč, Austrija). U kompletu za analizu nalazi se mješavina za amplifikaciju, pufer za razrjeđivanje Taq-polimeraze, pufer DNAT (1,6% natrijev hidroksid), plastične kadice, trakice za hibridizaciju, hibridizacijski pufer, pufer za ispiranje A i B, otopina za konjugaciju i razvijatelj boje. Umnažanje željenih fragmenata DNA uz pomoć ovog kompleta se temelji na multipleks PCR reakciji koja je izvedena na termobloku GeneAmp 2720 (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). Za pripremu reakcijske smjese za PCR korištene su upute proizvođača. U kompletu se nalazi već pripremljena mješavina za amplifikaciju koja sadrži biotinizirane početnice za detekciju polimorfizama -786 T > C i 894 G > T u genu *eNOS* te još šest drugih polimorfizama, sva četiri dNTPa u podjednakoj količini i optimalnu koncentraciju magnezijevih iona. 0,2 μL AmpliTaq DNA polimeraze (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) aktivnosti 5 U/ μL razrijeđeno je na aktivnost od 1U uz pomoć 4,8 μL pufera za razrjeđivanje Taq-polimeraze priloženog u kompletu. Svaki uzorak DNA razrijeđen je destiliranom vodom na koncentraciju od 15 do 20 $\mu\text{g/mL}$. Pet μL razrijeđenog uzorka DNA pomiješano je s 5 μL razrijeđene TaqPolimeraze i 15 μL mješavine za amplifikaciju. U svakoj seriji PCR-a korištena je i negativna kontrola u kojoj je umjesto uzorka DNA dodan isti volumen destilirane vode.

Prije početka PCR-a uzorci DNA su denaturirani zagrijavanjem na 94 °C tijekom 2 min. Termociklusi PCR reakcije odvijaju se na sljedećim temperaturama: 94 °C tijekom 15 s, 58 °C tijekom 30 s, 72 °C tijekom 30 s. Nakon 35 ciklusa izvodi se konačna (završna) ekstenzija na 72 °C tijekom 3 min.

3.4. Kontrolna elektroforeza umnoženih PCR produkata

Elektroforeza je fenomen kretanja električki nabijenih čestica u električnom polju (Stryer i sur., 2013). Elektroforezom u gelu mogu se odvojiti molekule DNA različitih veličina. Najčešće se koriste agarozni i poliakrilamidni gelovi. DNA je negativno nabijena i u električnom polju kreće se prema anodi. Brzina kretanja nukleinskih kiselina ponajprije ovisi o veličini molekule, a potom o obliku i konformaciji (Čvorišćec i Čepelak, 2009).

Kvaliteta umnoženih produkata provjerena je elektroforezom na 2 %-tnom agaroznom gelu na sustavu za horizontalnu elektroforezu (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD).

Gel je pripremljen otapanjem 1,2 g agaroze i 60 ml TRIS/borat/EDTA (TBE) pufera uz pomoć zagrijavanja. Kad se sva agarozna otopila dodana je jedna kap 0,07 % otopine etidijevog bromida. Još vrući gel izliven je na nosač gela, uklonjeni su eventualni mjehurići koji mogu ometati elektroforezu te je postavljen češljic za izradu jažica za nanošenje uzoraka. Nakon polimerizacije agaroze, češljic je uklonjen, a gel premješten u kadicu za elektroforezu s TBE puferom. TBE pufer pripremljen je otapanjem 121,2 g Tris (hidroksimetil) aminometana (Merck, Kenilworth, New Jersey, SAD), 47,6 g borne kiseline (Merck, Kenilworth, New Jersey, SAD) i 9,3 g natrijeve soli etilendiaminotetraoctene kiseline dihidrata (Kemika, Zagreb, Hrvatska) u jednoj litri destilirane vode.

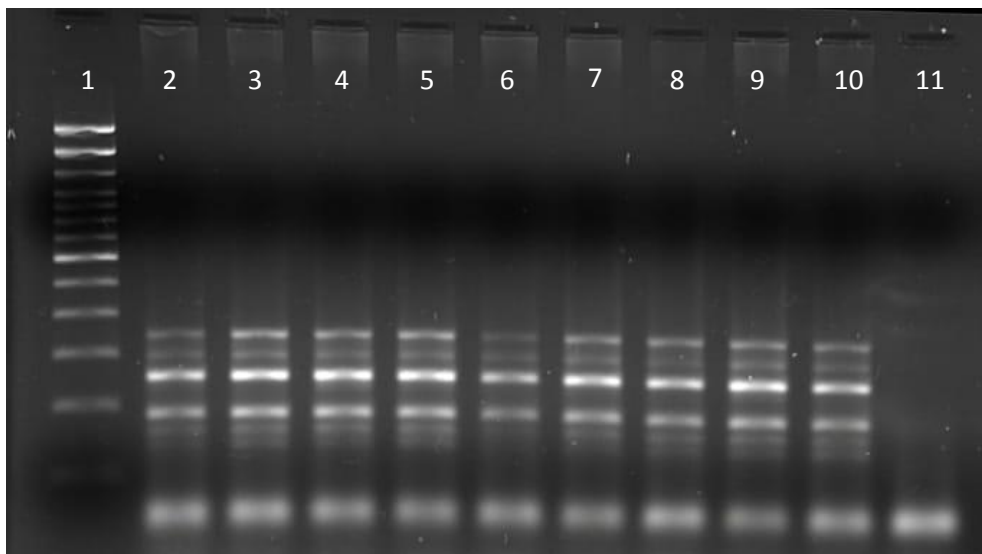
U svaku jažicu nanoseno je po 8 µL PCR produkta prethodno pomiješanog s 5 µL pufera za nanošenje uzoraka (engl. *DNA gel loading dye*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD).

2,5 µL molekularnog biljega od 100 pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD) pomiješano je sa 7 µL pufera za nanošenje uzoraka i 21 µL TBE pufera. Prilikom svake elektroforeze nanoseno je 8 µL tako pripremljenog biljega u jednu jažicu.

Elektroforeza je provedena tijekom 30 minuta pri 120 V.

Rezultati elektroforeze promatrani su i snimljeni uređajem za snimanje i analizu gelova GBOX Chemi XRQ (Syngene, Cambridge, Velika Britanija) te obrađivani pomoću programa GeneSys (verzija 1.6.1.0, Syngene, Cambridge, Velika Britanija).

Očekivani PCR produkti su sljedećih veličina: 133, 156, 180, 202, 225, 248, 297 i 342 pb. Svaka vrpca na elektroforezi predstavlja umnoženi PCR produkt određenog polimorfizma. Na kontrolnoj elektroforezi prikazanoj na slici 5 vidljive su vrpce umnoženih produkata, no nisu sve vrpce jasno vidljive zbog vrlo male razlike u veličini PCR produkata i zbog vjerojatne male količine nastalog PCR produkta.



Slika 5. Slika kontrolne elektroforeze umnoženih PCR produkata

1 - molekularni biljeg 100 pb

2-10 – umnoženi produkti

11 – negativna kontrola

3.4. Hibridizacija

Hibridizacija je proces sparivanja komplementarnih molekula DNA ili RNA u otopini. Hibridizacija se često koristi za detekciju specifičnih fragmenata DNA pa je tako i u ovom diplomskom radu korištena za detekciju polimorfizama *eNOS* uz pomoć već spomenutog kompleta za analizu polimorfizama CVD Strip Assay A (ViennaLab, Beč, Austrija) koji sadrži sve potrebne reagense. Hibridizacijske trakice dostupne u kompletu sadrže fiksirane specifične oligonukleotide koji su komplementarni pojedinom genotipu, to jest, po dva oligonukleotida za svaki polimorfizam od kojih je jedan komplementaran divljem tipu, a drugi mutiratom tipu. Tijekom postupka hibridizacije specifični biotinom obilježeni PCR produkti,

dobiveni prethodnim multipleks PCR-om, hibridiziraju na oligonukleotide na trakici ovisno o genotipu i zatim se vizualiziraju pomoću sustava biotin-streptavidin-alkalna fosfataza.

Biotin streptavidinske metode često se koriste u imunokemiji. Biotin je vitamin esencijalan za metabolizam masti. Streptavidin je protein izoliran iz bakterije *Streptomyces avidinii* koji ima četiri vezna mjesta za biotin. Biotin i streptavidin povezuju se jakim nekovalentnim vezama te je nastali kompleks vrlo stabilan pri različitim temperaturama i pH.

U ovom eksperimentu početnice su obilježene biotinom. Na oligonukleotid fiksiran na trakicu veže se njemu komplementarni umnoženi biotinizirani PCR produkt. Na biotin se potom veže streptavidin konjugiran na alkalnu fosfatazu koji se nalazi u otopini za konjugaciju. Dodatkom otopine supstrata za alkalnu fosfatazu, dolazi do nastanka netopljivog obojanog produkta što je vidljivo kao pojava obojene vrpce na određenom mjestu na trakici.

Hibridizacijski pufer i pufer za ispiranje A su prethodno zagrijani uz pomoć vodene kupelji WNE14 (Memmert, Schwabach, Njemačka) na temperaturu od 45°C. Postupak hibridizacije sastojao se od tri koraka:

1. Hibridizacija – Hibridizacija se provodi u plastičnim kadicama s poljima za 8 hibridizacijskih trakica. Prvo se provodi denaturacija 10 µL umnoženog produkta PCR reakcije uz pomoć 10 µL pufera DNAT (1,6% natrijev hidroksid) tijekom 5 minuta na sobnoj temperaturi. Potom se u kadicu dodaje 1 ml prethodno zagrijanog hibridizacijskog pufera. U kadice se odmah uranjaju prethodno obilježene hibridizacijske trake te se inkubiraju na temperaturi od 45 °C tijekom 30 minuta uz miješanje pri frekvenciji od 300 okretaja po minuti (engl. *rounds per minute*, rpm) na termostatiranoj orbitalnoj tresilici PST-60HL (BioSan, Riga, Latvija). Nakon 30 minuta uklanja se tekućina vakuum sisaljkom i nastavlja sa sljedećim korakom.

2. Ispiranje – Kako bi se uklonio suvišak hibridizacijskog pufera provode se tri ispiranja. Prvo ispiranje izvodi se dodavanjem 1 ml prethodno zagrijanog pufera za ispiranje A koji se nakon deset sekundi uklanja vakuum sisaljkom. Kod drugog i trećeg ispiranja dodaje se 1 ml pufera za ispiranje A, ali se u ovim ispiranjima provodi inkubacija na 45 °C tijekom 15 minuta uz miješanje pri frekvenciji od 300 rpm na termostatiranoj orbitalnoj tresilici PST-60HL (BioSan, Riga, Latvija). Nakon inkubacije tekućina se uklanja vakuum sisaljkom.

3. Razvijanje boje – Na trakice se dodaje 1 ml otopine za konjugaciju i provodi inkubacija na sobnoj temperaturi tijekom 15 minuta. Otopina za konjugaciju sadrži alkalnu fosfatazu konjugiranu sa streptavidinom. Nakon inkubacije tekućina se uklanja pomoću vakuum sisaljke. Potom se trakice ispiru tri puta s puferom za ispiranje B kako bi se uklonio suvišak konjugata. Pufer za ispiranje B je 0,05 % otopina natrijevog azida. Prvo ispiranje provodi se dodavanjem 1 ml pufera za ispiranje B te nakon deset sekundi uklanja vakuum sisaljkom. Kod drugog i trećeg ispiranja dodaje se 1 ml pufera za ispiranje B, ali se u ovim ispiranjima provodi inkubacija na sobnoj temperaturi tijekom 5 minuta uz miješanje pri frekvenciji od 300 rpm na termostatiranoj orbitalnoj tresilici PST-60HL (BioSan, Riga, Latvija). Nakon uklanjanja tekućine vakuum sisaljkom na trakice se nanese 1 ml razvijaača boje te inkubira u mraku na sobnoj temperaturi tijekom 15 minuta uz miješanje pri frekvenciji od 300 rpm na termostatiranoj orbitalnoj tresilici PST-60HL (BioSan, Riga, Latvija). Razvijaač boje sadrži 5-bromo-4-kloro-3-inodolil fosfat i nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT), tj. supstrate alkalne fosfataze. Nakon inkubacije tekućina se uklanja vakuum sisaljkom te se trakice potom ispiru nekoliko puta destiliranom vodom i stave sušiti na staničevinu u mraku. Trakice se prije očitavanja rezultata moraju dobro osušiti.

3.5. Očitavanje rezultata

Genotip ispitanika očitava se pomoću sabirnog lista priloženog u kompletu CVD Strip Assay A. Trakice se zalijepe na za njih predviđena polja na listu. Prije očitavanja rezultata potrebno je provjeriti vidljivost kontrolne linije na trakicama. Kontrolna linija pokazuje je li hibridizacija uspješno provedena.

Za svaki ispitanik polimorfizam treba biti vidljiv jedan od obrazaca prikazanih na slici 6.

		GENOTIPOVI		
		NOR	HET	HOM
		Linija divljeg tipa	Linija mutiranog tipa	Genotip
NOR	Linija mutiranog tipa	—	—	—
HET	Linija divljeg tipa	—	—	—
HOM		—	—	—
NOR		Pozitivna	Negativna	Zdravi homozigot
HET		Pozitivna	Pozitivna	Heterozigot
HOM		Negativna	Pozitivna	Mutirani homozigot

Slika 6. Obrasci prisutnih obojenih vrpca na trakicama za hibridizaciju

Za lakše očitavanje rezultata genotipizacije na trakicama koristi se računalni program StripAssay Evaluator (verzija 2.9.2015.904, Vienna Lab, Beč, Austrija). Sabirni list se skenira pomoću skenera CanoScan LiDE220 (Canon, Tokio, Japan) i učitava u spomenuti program koji zatim sam očitava genotip za svakog ispitanika i prikaže rezultate na ekranu računala koje je moguće prikazati i slikovno i pomoću tablice.

3.6. Statistička analiza

Statistička analiza napravljena je uporabom internetskog programa SNPStats.

Kontinuirane varijable izražene su kao medijani uz odgovarajuće interkvartilne raspone.

Statistički test za provjeru odstupanja od Hardy-Weinbergove jednadžbe uspoređuje dobivene učestalosti alela i očekivanih učestalosti pomoću hi-kvadratnog testa s jednim stupnjem slobode.

Povezanost polimorfizama i bolesti ispitivana je pomoću hi-kvadrat testa. Usporedbom odjeka rizika (engl. *odds ratio*, OR) i intervala pouzdanosti (engl. *confidence interval*, CI) svakog genotipa s referentnim genotipom (ovisi o modelu nasljeđivanja, u tablicama OR referentnog genotipa iznosi 1,00) dobiva se podatak o jačini povezanosti.

Povezanost polimorfizama i bolesti ispitivana je prema pet modela nasljeđivanja: kodominantni, dominantni, prekodominantni, recesivni i log-aditivni model.

Kodominantni model pretpostavlja da svaki genotip ima različiti i neaditivni učinak, tj. da svi aleli imaju jednaku šansu biti povezani s bolešću.

Dominantni model pretpostavlja da već samo jedan alel povećava rizik razvoja bolesti. Za polimorfizam *eNOS* -786 T > C to je alel C.

Prekodominantni model pretpostavlja da heterozigoti nose najveći rizik za razvoj bolesti.

Recesivni model pretpostavlja da su za povećanje rizika razvoja bolesti potrebna oba mutirana alela.

Log-aditivni model pretpostavlja da aleli imaju aditivni učinak. Prisutnost jednog mutiranog alela pokazuje linearnu, a prisutnost dva mutirana alela eksponencijalnu povezanost.

Za izračun frekvencija haplotipova korišten je algoritam maksimizacije očekivanja (engl. *expectation maximization algorithm*, EMA).

Povezanost haplotipova i bolesti ispitivana je pomoću logističke regresije. Koristi se analiza kromosoma umjesto testiranja pojedinaca. Uzorak se duplicira te je svaki pojedinac dvostruko prikazan sa svoja dva haplotipa. Rezultati logističke regresije izraženi su kao odjeci rizika uz pripadajuće 95%-e intervale pouzdanosti.

Vrijednosti $p < 0,05$ smatrane su statistički značajne.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati

U tablici 1. prikazane su karakteristike djece s ishemijskim moždanim udarom i kontrolne skupine. Dob ispitanika kontrolne skupine veća je od dobi pacijenata sa CSVT. Razlog tome su teškoće pri dobivanju pristanka roditelja male djece za uzimanje uzoraka za potrebe istraživanja. No, u ovom je istraživanju bitno da je kontrola uparena s pacijentom približno iste dobi kao pacijent ili starija, stoga je ova razlika u dobi prihvatljiva.

Tablica 1. Karakteristike djece s ishemijskim moždanim udarom i kontrolne skupine

Grupa	Broj sudionika	Omjer m/ž	Dob dijagnoze, medijan (IKR)	Dob testiranja, medijan (IKR)
CSVT	24	1	1,669 (0,288 – 8,125)	2,228 (0,354 – 8,272)
Kontrolna	48	1	-	7,836 (1,752 – 12,146)

-, nije primjenjivo; CSVT, cerebralna sinus venska tromboza; IKR, interkvartilni raspon

Provedeno je testiranje Hardy-Weinbergove jednadžbe kako bi se provjerila reprezentativnost i homogenost kontrolne skupine. Testiranje Hardy-Weinbergove jednadžbe preporučuje se provoditi u svakom istraživanju povezanosti gena i bolesti kao esencijalan korak osiguravanja kvalitete istraživanja (Namipashaki i sur., 2015). Odstupanje od Hardy-Weinbergove jednadžbe samo u grupi pacijenata služi kao učinkoviti i robusni pokazatelj povezanosti gena i bolesti (Salanti i sur., 2005).

U ovom istraživanju, odstupanje od Hardy-Weinbergove jednadžbe pronađeno je samo za polimorfizam *eNOS* -786 T > C u CSVT grupi kao što je prikazano u tablici 2. Ipak, odstupanje pronađeno u ovom istraživanju potrebno je tumačiti s oprezom, obzirom da se radi o malom broju ispitanika te primjeni različitih modela nasljeđivanja.

Tablica 2. Rezultati Hardy-Weinbergove jednadžbe za polimorfizme *eNOS* -786 T > C i *eNOS* 894 G > T

Ime polimorfizma	Grupa ispitanika	Broj ispitanika	P vrijednost
	Svi ispitanici	72	1
<i>eNOS</i> -786 T > C	CSVt grupa	24	0,150
	Kontrolna grupa	48	0,031*
	Svi ispitanici	72	1
<i>eNOS</i> 894 G > T	CSVt grupa	24	0,540
	Kontrolna grupa	48	0,350

eNOS, endotelna NO sintaza; CSVt, cerebralna sinus venska tromboza; *, statistički značajno

Rezultati povezanosti *eNOS* -786 T > C polimorfizma u CSVt i kontrolnoj grupi prikazani su u tablici 3. Prema kodominantnom i prekodominantnom modelu nasljeđivanja utvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji genotipova. Prema tim modelima nasljeđivanja heterozigoti (T/C) imaju 4,7 (kodominantni) i 4,3 (prekodominantni) puta manju vjerojatnost nastanka CSVt. Prema ostalim modelima nije utvrđena statistički značajna razlika.

Tablica 3. Rezultati polimorfizma *eNOS* -786 T > C povezani sa CSVT i kontrolnom grupom (prilagođeni prema dobi i spolu)

Ime polimorfizma	Model nasljeđivanja	Genotip	Distribucija genotipova u CSVT grupi, frekvencija	Distribucija genotipova u kontrolnoj grupi, frekvencija	OR (95% CI)	P vrijednost
<i>eNOS</i> -786 T > C	kodominantni	T/T	0,458	0,208	1,00	0,026*
		T/C	0,250	0,625	0,21(0,06-0,74)*	
		C/C	0,292	0,167	0,80(0,20-3,19)	
	dominantni	T/T	0,458	0,208	1,00	0,058
		T/C – C/C	0,542	0,792	0,34(0,11-1,04)	
	prekodominantni	T/T – C/C	0,750	0,375	1,00	0,007*
		T/C	0,250	0,625	0,23(0,08-0,71)*	
	recesivni	T/T – T/C	0,708	0,833	1,00	0,300
		C/C	0,292	0,167	1,91(0,57-6,42)	
	log-aditivni	-	-	-	-	-

CSVТ, cerebralna sinus venska tromboza; OR, odjek rizika (engl. *odds ratio*); CI, interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*), *eNOS*, endotelna NO sintaza; *, statistički značajno; -, nije primjenjivo

Povezanost *eNOS* -786 T > C polimorfizma i spola u CSVТ i kontrolnoj grupi prikazana je tablicom 4. Prema nijednom modelu nasljeđivanja nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova.

Tablica 4. Rezultati povezanosti *eNOS* -786 T > C polimorfizma i spola u CSVT i kontrolnoj grupi (prilagođeni prema dobi)

Ime polimorfizma	Model nasljeđivanja	Spol	Genotip	Distribucija	Distribucija	OR (95% CI)	P vrijednost		
				u CSVT grupi, frekvencija	u kontrolnoj grupi, frekvencija				
<i>eNOS</i> -786 T > C	kodominantni	Muški	T/T	0,500	0,250	1,00	0,850		
			T/C	0,250	0,625	0,26(0,05-1,49)			
			C/C	0,250	0,125	1,19(0,16-8,88)			
		Ženski	T/T	0,417	0,167	1,00			
			T/C	0,250	0,625	0,16(0,02-1,03)			
			C/C	0,333	0,208	0,55(0,08-3,84)			
	dominantni	Muški	T/T	0,500	0,250	1,00	0,650		
			T/C – C/C	0,500	0,750	0,44(0,10-2,00)			
		Ženski	T/T	0,417	0,167	1,00			
			T/C – C/C	0,583	0,833	0,26(0,05-1,35)			
	prekodominantni	Muški	T/T – C/C	0,750	0,375	1,00	0,900		
			T/C	0,250	0,625	0,25(0,05-1,21)			
		Ženski	T/T – C/C	0,750	0,375	1,00			
			T/C	0,250	0,625	0,21(0,04-1,05)			
		recesivni	Muški	T/T – T/C	0,750	0,875		1,00	0,760
				C/C	0,250	0,125		2,37(0,38-14,69)	
	Ženski		T/T – T/C	0,667	0,792	1,00			
			C/C	0,333	0,208	1,60(0,31-8,19)			
log-aditivni		-	-	-	-	-	-		

CSVT, cerebralna sinus venska tromboza; OR, odjek rizika (engl. *odds ratio*); CI, interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*), *eNOS*, endotelna NO sintaza; -, nije primjenjivo

Povezanost *eNOS* 894 G > T polimorfizma u CSVT i kontrolnoj grupi prikazana je tablicom 5. Prema nijednom modelu nasljeđivanja nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova.

Tablica 5. Rezultati *eNOS* 894 G > T polimorfizma povezani sa CSVT i kontrolnom grupom (prilagođeni prema dobi i spolu)

Ime polimorfizma	Model nasljeđivanja	Genotip	Distribucija genotipova u CSVT grupi, frekvencija	Distribucija genotipova u kontrolnoj grupi, frekvencija	OR (95% CI)	P vrijednost
<i>eNOS</i> 894 G > T	kodominantni	G/G	0,500	0,375	1,00	0,370
		G/T	0,333	0,521	0,48(0,16-1,47)	
		T/T	0,167	0,104	1,08(0,22-5,37)	
	dominantni	G/G	0,500	0,375	1,00	0,300
		G/T – T/T	0,500	0,625	0,58(0,21-1,64)	
	prekodominantni	G/G – T/T	0,667	0,479	1,00	0,160
		G/T	0,333	0,521	0,47(0,16-1,37)	
	recesivni	G/G – G/T	0,833	0,896	1,00	0,590
		T/T	0,167	0,104	1,52(0,33-6,98)	
	log-aditivni	-	-	-	-	-

CSVT, cerebralna sinus venska tromboza; OR, odjek rizika (engl. *odds ratio*); CI, interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*), *eNOS*, endotelna NO sintaza; -, nije primjenjivo

Povezanost *eNOS* 894 G > T polimorfizma i spola u CSVT i kontrolnoj grupi prikazana je tablicom 6. Pronađena je statistički značajna razlika u distribuciji genotipova po spolu prema kodominantnom, dominantnom i prekodominantnom modelu nasljeđivanja. Prema tim modelima nasljeđivanja ženski heterozigoti imaju 16,6 (kodominantni), 5,8 (dominantni) i 12,5 (prekodominantni) puta manju vjerojatnost razvoja CSVT. Za muški spol nije pronajđena statistički značajna razlika.

Tablica 6. Rezultati povezanosti *eNOS* 894 G > T polimorfizma i spola u CSVT i kontrolnoj grupi (prilagođeni prema dobi)

Ime polimorfizma	Model nasljeđivanja	Spol	Genotip	Distribucija genotipova u CSVT grupi, frekvencija	Distribucija genotipova u kontrolnoj grupi, frekvencija	OR (95% CI)	P vrijednost	
<i>eNOS</i> 894 G > T	kodominantni	Muški	G/G	0,333	0,500	1,00	0,031	
			G/T	0,583	0,458	1,70(0,37-7,73)		
			T/T	0,083	0,042	3,98(0,19-82,34)		
		Ženski	G/G	0,667	0,250	1,00		*
			G/T	0,083	0,583	0,06(0,01-0,63)*		
			T/T	0,250	0,167	0,44(0,06-3,07)		
	dominantni	Muški	G/G	0,333	0,500	1,00	0,025	
			G/T – T/T	0,666	0,500	1,85(0,42-8,18)		
		Ženski	G/G	0,667	0,250	1,00		*
			G/T – T/T	0,333	0,750	0,17(0,03-0,81)*		
	prekodominantni	Muški	G/G – T/T	0,417	0,542	1,00	0,019	
			G/T	0,583	0,458	1,44(0,34-6,04)		
		Ženski	G/G – T/T	0,917	0,417	1,00		*
			G/T	0,083	0,583	0,08(0,01-0,75)*		
	recesivni	Muški	G/G–G/T	0,917	0,958	1,00	0,58	
			T/T	0,083	0,042	3,07(0,17-55,58)		
		Ženski	G/G–G/T	0,750	0,833	1,00		
			T/T	0,250	0,167	1,16(0,19-7,05)		
	log-aditivni		-	-	-	-	-	-

CSVТ, cerebralna sinus venska tromboza; OR, odjek rizika (engl. *odds ratio*); CI, interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*), *eNOS*, endotelna NO sintaza; *, statistički značajno; -, nije primjenjivo

Povezanost haplotipa *eNOS* -786 T > C / 894 G > T u CSVТ i kontrolnoj grupi prikazana je tablicom 7. Prema nijednom modelu nasljeđivanja nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji haplotipova.

Tablica 7. Rezultati povezanosti haplotipova *eNOS* -786 T > C / *eNOS* 894 G > T u CSVT i kontrolnoj grupi (prilagođeni prema dobi i spolu)

<i>eNOS</i> -786 T > C / <i>eNOS</i> 894 G > T haplotip	Frekvencija haplotipa u CSVT grupi	Frekvencija haplotipa u kontrolnoj grupi	OR (95% CI)	P vrijednost
<i>eNOS</i> -786 T/ <i>eNOS</i> 894 G	0,496	0,469	1.00 (ref.)	ref.
<i>eNOS</i> -786 C/ <i>eNOS</i> 894 T	0,245	0,312	0,73 (0,31 – 1,73)	0,480
<i>eNOS</i> -786 C/ <i>eNOS</i> 894 G	0,171	0,167	1,08 (0,35 – 3,31)	0,89
<i>eNOS</i> -786 T/ <i>eNOS</i> 894 T	0,088	0,052	1,54 (0,29 – 8,16)	0,61

CSVТ, cerebralna sinus venska tromboza; OR, odjek rizika (engl. *odds ratio*); CI, interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*), *eNOS*, endotelna NO sintaza; ref., referentni haplotip

4.1. Rasprava

Pronađena je povezanost polimorfizma *eNOS* -786 T > C i CSVT u djece prema kodominantnom ($p=0,026$) i prekodominantnom ($p=0,007$) modelu nasljeđivanja. Frekvencija genotipa T/C značajno je veća u kontrolnoj grupi nego kod pacijenata s CSVT što ukazuje na zaštitni učinak ovog genotipa za nastanak moždanog udara kod djece. Provedene su razne epidemiološke studije povezanosti polimorfizma *eNOS* -786 T > C i moždanih udara, no većina studija je provedena na starijoj populaciji, a dobiveni rezultati su kontradiktorni. Prema nekim studijama nije pronađena povezanost polimorfizma *eNOS* -786 T > C i ishemijskih moždanih udara (Saidi i sur., 2010; Wei i sur., 2017), dok je u drugim studijama pronađena povezanost (Wang i sur., 2013; Anlić i sur., 2019). Ipak, ove studije nisu najbolje za uspoređivanje s našim rezultatima jer, osim što su sve rađene na starijim pacijentima, provedene su većinom na azijskoj populaciji.

Jedna meta-analiza koja je uključila populaciju azijata, bijelaca i Afroamerikanaca pokazala je značajnu povezanost polimorfizma *eNOS* -786 T > C i ishemijskog moždanog udara kod azijata, dok je kod bijelaca i Afroamerikanaca utvrđen zaštitni učinak (Liu i sur., 2014).

Nije pronađena povezanost polimorfizma *eNOS* 894 G > T i CSVT u djece, no pronađena je povezanost kod ženskog spola prema kodominantnom ($p=0,031$), dominantnom ($p=0,025$) i prekodominantnom ($p=0,019$) modelu. Frekvencija genotipa G/T značajno je veća u kontrolnoj grupi nego kod pacijenata s CSVT što ukazuje na zaštitni učinak za nastanak moždanog udara kod ženske djece. Prema nekim studijama nije pronađena povezanost polimorfizma *eNOS* 894 G > T i ishemijskih moždanih udara (Anlić i sur., 2019), dok je u drugim studijama pronađena povezanost (Wang i sur., 2013; Wei i sur., 2017). Potrebno je naglasiti da su sve navedene studije provedene na starijim ispitanicima i većinom na azijskoj populaciji.

U studiji provedenoj u Beogradu istraživana je povezanost kombinacije polimorfizma *eNOS* 894 G > T i polimorfizma metilentetrahidrofolat reduktaze (MTHFR) C677T i ishemijskih moždanih udara kod djece. Dokazano je da kombinacija dvaju navedenih polimorfizama povećava rizik nastanka ishemijskog moždanog udara (Djordjevic i sur., 2009). Ograničenje tog znanstvenog rada, kao i ovog diplomskog rada, je mali broj ispitanika. Naime, većina studija koja istražuje moždane udare kod djece nailazi na problem malog broja ispitanika.

Iako su moždani udari kod djece u porastu, i dalje se radi o rjeđoj bolesti, stoga je teško pronaći veliki broj ispitanika. Također, problem je i u pronalasku kontrolne grupe djece zbog smanjene suradljivosti roditelja.

Pregledom literature nije pronađena studija koja je istraživala utjecaj polimorfizama *eNOS* -786 T > C i *eNOS* 894 G > T na rizik razvoja ishemijskog moždanog udara kod djece. Iako postoje studije povezanosti navedena dva polimorfizma i ishemijskih moždanih udara kod starije populacije, isti zaključci ne mogu se prenijeti i na dječju populaciju zbog različite patofiziologije kod te dvije populacije.

Analizom pojedinačnih polimorfizama može se doći do značajnih spoznaja, no analizom haplotipova koji obuhvaćaju više polimorfizama može se osigurati dodatna snaga za mapiranje gena bolesti (Liu i sur., 2008). Haplotipovi se sastoje od više SNP-a ili drugih biljega ili varijanti gena koji se nalaze na istom kromosomu i nasljeđuju zajedno te je jako mala vjerojatnost rekombinacije (Elston i sur., 2012).

Analizom haplotipova *eNOS* -786 T > C / *eNOS* 894 G > T nije pronađena povezanost s cerebralnom sinusvenskom trombozom kod djece.

eNOS je vrlo važan enzim u vaskularnom sustavu. NO kojeg proizvodi važan je faktor u održavanju vaskularne homeostaze te regulacije cerebralne cirkulacije, stoga je od iznimne važnosti provođenje opsežnijih istraživanja povezanosti polimorfizama *eNOS* i moždanih udara kod djece. Naime, ukoliko se većim istraživanjima dokaže povezanost, eNOS bi mogao postati i terapijska meta. Bolje razumijevanje uloga NO signalnog puta može dovesti do razvoja novih farmakoterapija dizajniranih tako da smanjuju sekundarnu ozljedu mozga, a sve u cilju smanjenja morbiditeta i mortaliteta moždanih udara.

5. ZAKLJUČCI

1. Dokazana je povezanost polimorfizma *eNOS* -786 T > C i cerebralne sinus venske tromboze kod djece.
2. Dokazana je povezanost polimorfizma *eNOS* 894 G > T i cerebralne sinus venske tromboze kod ženske djece.
3. Nije dokazana povezanost haplotipova *eNOS* -786 T > C / 894 G > T i cerebralne sinus venske tromboze kod djece.

6. LITERATURA

Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res*, 1999, 43, 521–531.

Anliaçik SÖ, Tokgoz S, Zamani AG, Yildirim MS, Iyisoy MS. Investigation of the relationship between ischemic stroke and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms [G894T, intron 4 VNTR and T786C]. *Turk J Med Sci*, 2019, 49, 589–594.

Barišić K. Molekularna dijagnostika, U: Štrausova medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čepelak I, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 622-637

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biokemija. Zagreb, Školska knjiga, 2013, str. 71, 136, 140

Bredt DS. Endogenous nitric oxide synthesis: Biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res*. 1999, 31, 577–596.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation, *Nature*, 1999, 399, 601–605.

Djordjevic V, Stankovic M, Brankovic-Sreckovic V, Rakicevic LJ, Radojkovic D. Genetic risk factors for arterial ischemic stroke in children: A possible MTHFR and eNOS gene-gene interplay? *J Child Neurol*, 2009, 24, 823–827.

Stram DO, Seshan VE. Multi-SNP Haplotype Analysis Methods for Association Analysis. U: Statistical Human Genetics. Elston RC, Satagopan JM, Sun S, urednici, New Jersey, Humana Press, 2012, str. 423-452

Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003, 284, R1-R12.

Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes. *Hypertension*, 1994, 23, 1121–1131.

Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: Regulation and function. *Eur Heart J*,

2012, 33, 1–13.

Heller C, Heinecke A, Junker R, Knofler R, Kosch A, Kurnik K, Schobess R, von Eckardstein A, Strater R, Zieger B, Nowak-Gottl U. Cerebral venous thrombosis in children: A multifactorial origin, *Circulation*, 2003, 108, 1362–1367.

Hong FF, Liang XY, Liu W, LV S, He SJ, Kuang HB, Yang SL. Roles of eNOS in atherosclerosis treatment. *Inflam Res*, 2019, 68, 429–441.

Kim OJ, Kim UK, Oh SH, Cho YW, Oh KI, Oh D, Park YS i Kim NK. Association of endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and haplotypes with ischemic stroke in Korean individuals with or without diabetes mellitus. *Mol Med Rep*, 2010, 3, 509-513.

Kirton A, deVeber G. Paediatric stroke: Pressing issues and promising directions. *Lancet Neurol*, 2015, 14, 92–102.

Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88, 4651–4655.

Liu N, Zhang K, Zhao H. Haplotype-Association Analysis. *Adv Genet*, 2008, 60, 335–405.

Liu R, Geng P, Ma M, Yu S, Wang X, Zhang W, Di H. Association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (T-786C) and ischemic stroke susceptibility: A meta-analysis. *Int J Neurosci*, 2014, 124, 642–651.

Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation and arterial thrombosis. *Circ Res*, 2014, 88, 756–762.

Lynch JK. Cerebrovascular disorders in children. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2004, 4, 129–138.

Lynch JK, Nelson KB. Epidemiology of perinatal stroke. *Curr Opin Pediatr*, 2001, 13, 499–505.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16, 1215.

Moro MA, Cardenas A, Leza HJC, Lizasoain I. Role of nitric oxide after brain ischaemia.

Cell Calcium, 2004, 36, 265–275.

Namipashaki A, Razaghi-Moghadam Z, Ansari-Pouri N. The Essentiality of Reporting Hardy-Weinberg Equilibrium Calculations in Population-Based Genetic Association Studies, *Cell J*, 2015, 17, 187-192.

Radziwon-Balicka A, Lesyk G, Back V, Fong T, Loreda-Calderon EL, Dong B, El-Sikhry H, El-Sherbeni AA, El-Kadi A, Ogg S, Siraki A, Seubert JM, Santos-Martinez MJ, Radomski MW, Velazquez-Martinez CA, Winship IR, Jurasz P. Differential eNOS-signalling by platelet subpopulations regulates adhesion and aggregation. *Cardiovasc Res*. 2017, 113, 1719–1731.

Raju TNK, Nelson KB, Ferriero D, Lynch JK. Ischemic perinatal stroke: Summary of a workshop sponsored by the National Institute of Child Health and Human Development and the National Institute of Neurological Disorders and Stroke. *Pediatrics*, 2007, 120, 609–616.

Saidi S, Mallat SG, Almawi WY, Mahjoub T. Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp, 4b/a, and -786T>C gene polymorphisms and the risk of ischemic stroke. *Acta Neurol Scand*, 2010, 121, 114–119.

Salanti G, Amountza G, Ntzani E, Ioannidis J. Hardy – Weinberg equilibrium in genetic association studies : an empirical evaluation of reporting , deviations , and power. *Eur J Hum Genet*, 2005, 13, 840–848.

Sasaki KI, Heeschen C, Aicher A, Ziebart T, Honold J, Urbich C, Rossig L, Koehl U, Koyanagi M, Mohamed A, Brandes RP, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Ex vivo pretreatment of bone marrow mononuclear cells with endothelial NO synthase enhancer AVE9488 enhances their functional activity for cell therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103, 14537–14541.

Seidman C, Kirkham F, Pavlakis S. Pediatric stroke: Current developments. *Curr Opin Pediatr*, 2007, 19, 657–662.

Stram DO, Seshan VE. Multi-SNP Haplotype Analysis Methods for Association Analysis. U: Statistical Human Genetics. Elston RC, Satagopan JM, Sun S, urednici, New Jersey, Humana Press, 2012, str. 423-452

Tsze DS, Valente JH. Pediatric Stroke: A Review. *Emerg Med Int*, 2011, 2011, 1–10.

Wang M, Jiang X, Wu W, Zhang D. Endothelial NO Synthase Gene Polymorphisms and Risk of Ischemic Stroke in Asian Population: A Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 2013, 8, e60472.

Wei LK, Au A, Menon S, Griffiths LR, Wee Kooi C, Irene L, Zhao J, Lee C, Alekseevna AM, Hassan MRA, Aziz ZA. Polymorphisms of MTHFR, eNOS, ACE, AGT, ApoE, PON1, PDE4D, and Ischemic Stroke: Meta-Analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2017, 26, 2482–2493.

Zhu J, Wanshan S, Lin L, Fan X. Endothelial nitric oxide synthase: A potential therapeutic target for cerebrovascular diseases. *Mol Brain*, 2016, 9, 30.

7. SAŽETAK / SUMMARY

Endotelna sintaza dušikovog oksida (eNOS) je enzim od iznimne važnosti za vaskularni sustav. Proizvodi dušikov oksid (NO) koji u endotelu djeluje vazodilatacijski, doprinosi regulaciji krvnog tlaka, inhibira agregaciju trombocita i njihovu adheziju na zid krvne žile. eNOS pokazuje zaštitini učinak nakon ishemije mozga jer proizvodi NO koji potiče vazodilataciju i inhibira mikrovaskularnu agregaciju i adheziju. Polimorfizmi *eNOS* -786 T > C i 894 G > T dovode do smanjene proizvodnje NO ili povećane razgradnje zrelog enzima, stoga su pojedinci koji nose navedene polimorfizme potencijalno pod većim rizikom nepovoljnih vaskularnih događaja. Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti povezanost polimorfizama *eNOS* i moždanih udara kod djece. Moždani udari kod djece, iako rijetki, danas su u porastu. Ozbiljna su stanja koja u većini slučajeva ostavljaju teški neurološki deficit.

U ovom istraživanju pronađena je povezanost polimorfizma *eNOS* -786 T > C i CSVT kod djece prema kodominantnom ($p=0,026$) i prekodominantnom ($p=0,007$) modelu nasljeđivanja. Pronađena je i povezanost polimorfizma *eNOS* 894 G > T i CSVT kod ženske djece prema kodominantnom ($p=0,031$), dominantnom ($p=0,025$) i prekodominantnom ($p=0,019$) modelu. Ovo istraživanje provedeno je na manjoj skupini pacijenata te je potrebno rezultate provjeriti opsežnijim istraživanjima.

Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) is an enzyme of exceptional importance for the vascular system. It produces nitric oxide (NO), which has a vasodilating effect in the vascular endothelium, contributes to the regulation of blood pressure, inhibits platelet aggregation and their adhesion to the blood vessel wall. eNOS shows a protective effect after cerebral ischemia because it produces NO that promotes vasodilation and inhibits microvascular aggregation and adhesion. The *eNOS* -786 T > C and 894 G > T polymorphisms lead to reduced NO production or increased degradation of the mature enzyme, so individuals carrying these polymorphisms are potentially at higher risk of unfavorable vascular events. The aim of this study was to investigate the relationship between *eNOS* polymorphisms and stroke in children. Strokes in children, although rare, are on the rise today. They are serious conditions that, in most cases, leave a severe neurological deficit.

In this study, an association was found between the *eNOS* -786 T > C polymorphism and CSVT in children according to the codominant ($p = 0,026$) and overdominant ($p = 0,007$) inheritance model. The association of the *eNOS* 894 G > T polymorphism and CSVT in female children according to the codominant ($p = 0,031$), dominant ($p = 0,025$) and overdominant ($p = 0,019$) inheritance models was also found. This study was performed on a small group of patients and the results need to be verified by more extensive studies.

**8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC
DOCUMENTACION CARD**

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

POVEZANOST POLIMORFIZAMA -786 T > C I 894 G > T U GENU *eNOS* I MOŽDANIH UDARA KOD DJECE

Maja Grabić

SAŽETAK

Endotelna sintaza dušikovog oksida (eNOS) je enzim od iznimne važnosti za vaskularni sustav. Proizvodi dušikov oksid (NO) koji u endotelu djeluje vazodilatacijski, doprinosi regulaciji krvnog tlaka, inhibira agregaciju trombocita i njihovu adheziju na zid krvne žile. eNOS pokazuje zaštitini učinak nakon ishemije mozga jer proizvodi NO koji potiče vazodilataciju i inhibira mikrovaskularnu agregaciju i adheziju. Polimorfizmi *eNOS* -786 T > C i 894 G > T dovode do smanjene proizvodnje NO ili povećane razgradnje zrelog enzima, stoga su pojedinci koji nose navedene polimorfizme potencijalno pod većim rizikom nepovoljnih vaskularnih događaja. Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti povezanost polimorfizama eNOS i moždanih udara kod djece. Moždani udari kod djece, iako rijetki, danas su u porastu. Ozbiljna su stanja koja u većini slučajeva ostavljaju teški neurološki deficit.

U ovom istraživanju pronađena je povezanost polimorfizma *eNOS* -786 T > C i CSVT kod djece prema kodominantnom ($p=0,026$) i prekodominantnom ($p=0,007$) modelu nasljeđivanja. Pronađena je i povezanost polimorfizma *eNOS* 894 G > T i CSVT kod ženske djece prema kodominantnom ($p=0,031$), dominantnom ($p=0,025$) i prekodominantnom ($p=0,019$) modelu. Ovo istraživanje provedeno je na manjoj skupini pacijenata te je potrebno rezultate provjeriti opsežnijim istraživanjima.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 33 stranice, 6 grafičkih prikaza, 7 tablica i 34 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Endotelna NO sintaza, eNOS, polimorfizam eNOS, CSVT

Mentor: **Dr. sc. Renata Zadro**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Renata Zadro**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Olga Gornik Kljaić, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: kolovoz 2020.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical biochemistry
Department of medical biochemistry and hematology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

ASSOCIATION OF THE -786 T > C AND 894 G > T POLYMORPHISMS IN THE *eNOS* GENE AND STROKES IN CHILDREN

Maja Grabić

SUMMARY

Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) is an enzyme of exceptional importance for the vascular system. It produces nitric oxide (NO), which has a vasodilating effect in the vascular endothelium, contributes to the regulation of blood pressure, inhibits platelet aggregation and their adhesion to the blood vessel wall. Endothelial NO synthase shows a protective effect after cerebral ischemia because it produces NO that promotes vasodilation and inhibits microvascular aggregation and adhesion. The *eNOS* -786 T > C and 894 G > T polymorphisms lead to reduced NO production or increased degradation of the mature enzyme, so individuals carrying these polymorphisms are potentially at higher risk of adverse vascular events. The aim of this study was to investigate the relationship between eNOS polymorphisms and stroke in children. Strokes in children, although rare, are on the rise today. They are serious conditions that, in most cases, leave a severe neurological deficit.

In this study, an association was found between the *eNOS* -786 T > C polymorphism and CSVT in children according to the codominant ($p = 0,026$) and overdominant ($p = 0,007$) inheritance model. The association of the *eNOS* 894 G > T polymorphism and CSVT in female children according to the codominant ($p = 0,031$), dominant ($p = 0,025$) and overdominant ($p = 0,019$) inheritance models was also found. This study was performed on a small group of patients and the results need to be verified by more extensive studies.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 33 pages, 6 figures, 7 tables and 34 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Endothelial NO synthase, eNOS, eNOS polymorphism, CSVT

Mentor: **Renata Zadro, Ph.D. Full Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Renata Zadro, Ph.D. Full Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Sandra Šupraha Goreta, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Olga Gornik Kljaić, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: August 2020.