

# Predhipertenzija i polimorfizam gena za uromodulin

---

Đapić, Krešimir

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:105:028229>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Krešimir Đapić**

**Predhipertenzija i polimorfizam gena za  
uromodulin**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2017.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Krešimir Đapić**

**Predhipertenzija i polimorfizam gena za  
uromodulin**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2017.**

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju Klinike za unutarnje bolesti i u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod vodstvom prof.dr.sc.Bojana Jelakovića u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta “Endemska nefropatija u Hrvatskoj: epidemiologija, dijagnostika i etiopatogeneza”, broj 108-0000000-0329, voditelj prof.dr.sc. Bojan Jelaković i i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2016/2017.

## POPIS KRATICA

ACR	omjer albumina i kreatinina u mokraći, prema engl. <i>albumin/creatinin ratio</i>
AD	alelna diskriminacija
AH	arterijska hipertenzija
AT	arterijski tlak
CKD	kronična bubrežna bolest, prema engl. <i>chronic kidney disease</i>
DAT	dijastolički arterijski tlak
eGFR	procijenjena glomerularna filtracija, prema engl. <i>estimated glomerular filtration ratio</i>
ESH – ECS	prema engl. <i>European Society of Hypertension – European Society of Cardiology</i>
GUK	glukoza u krvi
GWAS	prema engl. <i>Genome Wide Association Study</i>
HDL	lipoprotein velike gustoće, prema engl. <i>high density lipoprotein</i>
HWR	Hardy Weinbergova ravnoteža
IKV	interkvartilni raspon
ITM	indeks tjelesne mase
JNC 7	prema engl. <i>Joint National Committee 7, JNC 7</i>
LDL	lipoprotein male gustoće, prema engl. <i>low density lipoprotein</i>
NKCC2	$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ ko-transporter
OR	omjer izgleda (šansi), prema engl. <i>odds ratio</i>
OS	opseg struka
PHT	predhipertenzija
SAT	sistolički arterijski tlak
SD	standardna devijacija
SF	srčana frekvencija
SNP	polimorfizam jednog nukleotida, prema engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>
TNF- $\alpha$	prema engl. <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
UMOD	gen za uromodulin

## SADRŽAJ

1. Sažetak	
2. Summary	
3. Uvod	1
3.1. Predhipertenzija	2
3.2. Uromodulin	3
3.3. Gen <i>UMOD</i> i SNP rs13333226	6
4. Hipoteza	8
5. Opći i specifični ciljevi	8
6. Materijali i metode	9
7. Rezultati	15
8. Rasprava	24
9. Zaključci	27
10. Zahvala	28
11. Popis literature	29
12. Životopis	

## 1. SAŽETAK

### PREDHIPERTENZIJA I POLIMORFIZAM GENA ZA UROMODULIN

**Krešimir Đapić**

Polimorfizam jednog nukleotida rs13333226 gena UMOD koji kodira protein uromodulin povezan je s arterijskim tlakom. Naš cilj bio je analizirati povezanost ovog polimorfizma s predhipertenzijom u općoj populaciji.

U istraživanje je uključeno 496 odraslih osoba. Isključujući kriteriji bili su liječena arterijska hipertenzija ili šećerna bolest, preboljeli moždani udar ili infarkt miokarda, srčano zatajenje, kronična bubrežna bolest i ostalo. Osobe s eGFR manjom od 60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> i ispitanici oboljeli od endemske nefropatije isključeni su iz istraživanja.

Klinički i laboratorijski podaci dobiveni su rutinskim postupcima i metodama, a polimorfizam gena određen je TaqMan<sup>®</sup> PCR metodom u stvarnom vremenu.

Učestalost genotipova i minor alela G u ukupnoj populaciji bile su A/A 68,5% (N=340), A/G 29,6% (N=147), G/G 1,8% (N=9), minor alel G 16% (N=165). Logističkom regresijskom analizom utvrdili smo da niti jedan od promatranih genotipova nije prediktor predhipertenzije. Uobičajeni čimbenici rizika kao što su spol, dob i indeks tjelesne mase utječu na vrijednosti sistoličkog arterijskog tlaka i procijenjene glomerularne filtracije jednako u svim genotipovima uromodulina. Potrebno je povećati uzorak ispitanika kako bi se lakše uočile manje fenotipske promjene, i nastaviti pratiti klinički tijek skupine predhipertoničara kako bi se dobio podatak o dinamici tijekom duljeg vremena praćenja.

**Ključne riječi:** polimorfizam jednog nukleotida, uromodulin, predhipertenzija, molekularna epidemiologija

## 2. SUMMARY

### PREHYPERTENSION AND UMOD GENE POLYMORPHISM

Krešimir Đapić

Single nucleotide polymorphism rs13333226 of UMOD gene which encodes protein uromodulin is associated with blood pressure. Our goal was to analyze the relationship of this polymorphism with prehypertension in general population.

In this study we have enrolled 496 adults. Excluding criteria were treated hypertension or diabetes mellitus type 2, previous stroke or myocardial infarction, heart failure, chronic kidney disease and other. Individuals with eGFR lower than 60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> and those suffering from endemic nephropathy were excluded.

Clinical and laboratory data were obtained by routine methods and polymorphism was obtained with TaqMan<sup>®</sup> real time PCR method.

Prevalence of genotypes and G minor allele in overall population were A/A 68,5% (N=340), A/G 29,6% (N=147), G/G 1,8% (N=9) and G minor allele 16% (N=165). With logistic regression we have found that none of the observed genotypes are predictors for prehypertension. Common risk factors such as gender, age and body mass index equally affect systolic blood pressure and the estimated glomerular filtration in all genotypes equally. It is necessary to increase the sample of subjects in order to detect small changes in phenotype, and continue to follow the clinical course of the in order to measure the dynamics over an extended time.

Keywords: single nucleotide polymorphism, uromodulin, prehypertension, molecular epidemiology



### 3. UVOD

Arterijska hipertenzija (AH) je glavni neovisni čimbenik rizika za kardiovaskularne, cerebrovaskularne i bubrežne bolesti te predstavlja važan javnozdravstveni problem. Prevalencija AH u Hrvatskoj je, prema procjeni Svjetske zdravstvene organizacije (SZO), oko 30% u osoba starijih od 18 godina, što je u skladu s podacima iz ostalih europskih država (1,2). Moždani udar, kao jedna od najvažnijih komplikacija AH, drugi je na ljestvici pojedinačnih uzroka smrti u Hrvatskoj iza kronične ishemijske bolesti srca, dok je na trećem mjestu akutni infarkt miokarda (3). Povezanost kardiovaskularnog i cerebrovaskularnog rizika s vrijednostima arterijskoga tlaka (AT) je linearna, kontinuirana i prisutna je i ispod danas prihvaćene granice za AH do visine AT od 115/75 mmHg . Velik broj istraživanja potvrđuje kako je već stadij predhipertenzije (PHT) ili visokonormalni AT povezan s većim rizikom pojave kardiovaskularnih, cerebrovaskularnih i bubrežnih bolesti, u usporedbi s normalnim ili optimalnim AT (4-7). Uz to, određen broj osoba s PHT tijekom vremena razvija pravu AH. Danas još ne raspoložemo pouzdanim prediktivnim biljegovom.

Glavni razlog velike prevalencije AH su svakako loše životne navike i način života tzv. zapadne civilizacije. No, unatoč jednakoj izloženosti lošim životnim navikama ne razvijaju sve osobe AH, što ukazuje na gensku (ili epigenetsku) etiološku komponentu. To se možda najbolje razabire analizama kliničkog tijeka braće - blizanaca i usvojene djece. Unatoč činjenici da postoje dokazi opservacijskih istraživanja, te čak i prospektivnih epidemioloških istraživanja kako osobe s PHT imaju povećan rizik, na temelju činjenice da nema intervencijskih randomiziranih pokusa koji bi potvrdili korist liječenja ovih osoba, prema današnjim smjernicama njih ne treba medikamentno liječiti, već im treba samo savjetovati promjene loših životnih navika. Posve je razumljivo da ne mogu, a vjerojatno i ne trebaju, svi PHT biti medikamentno liječeni jer bi to enormno opteretilo proračune svih država. Nesrazmjernost između podataka o povećanom riziku i nedostatak dokaza o koristi medikamentnog liječenja ostavlja opravdan dojam kako velik broj ovih osoba s povećanim rizikom ostaje neadekvatno zbrinut. Ti podaci ukazuju na važnost što skorijeg definiranja koje bi osobe u skupini PHT bilo opravdano medikamentno liječiti. Predlagano je nekoliko kliničkih i laboratorijskih pokazatelja, no niti jedan nije dovoljno specifičan ili osjetljiv, tako da se posljednjih godina istraživanja sve više usmjeravaju prema genima (8-10).

Istraživanja genske podloge rezultirala su otkrićem povezanosti brojnih gena, genskih polimorfizama i rijetkih mutacija s regulacijom AT i patogenezi AH što otvara više mogućnosti u razvoju novih lijekova, njihovoj prenamjeni i poboljšanju kontrole AT (8,9). Brojni geni su bili u fokusu istraživanja, a svakako su od najvećeg interesa geni uključeni u regulaciju renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava, simpatikusa, te geni bitni za održavanje homeostaze vode i elektrolita. Rezultati Asocijacijske studije cijelog genoma (engl. *Genome Wide Association Study, GWAS*) objavljeni 2010. godine

utvrdili su, između ostalih, povezanost polimorfizma jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism, SNP*) rs13333226 s koncentracijom proteina uromodulina u urinu i razvojem AH i kronične bubrežne bolesti (8,10,11). Budući da je uromodulin, ili kako se još naziva Tamm-Horsfallov protein, uključen u regulaciju transporta iona natrija u distalnom tubulu, a pojedini polimorfizmi gena za uromodulin (*UMOD*) su povezani s visinom AT, napose nakon GWAS studije, povećao se interes za istraživanjem ovog, evolucijski promatrano vrlo starog, dakle vrlo važnog proteina i varijanti njegova gena. Podaci o povezanosti pojedinih polimorfizama gena *UMOD* s AH i bubrežnom bolesti potaknuli su nas na istraživanje mjesta uromodulina u PHT, kao potencijalnom prediktoru prelaska PHT u stabilnu AH (12, 13.). To bi osim znanstvenog interesa, moglo imati i praktičnu važnost i početak razvijanja prediktivnog dijagnostičkog testa.

### **3.1. Predhipertenzija**

Europsko društvo za hipertenziju (engl. *European Society of Hypertension, ESH*) i Europsko društvo za kardiologiju (engl. *European Society of Cardiology, ESC*) definiraju predhipertenziju kao visokonormalni AT u što ulaze osobe sa sistoličkim arterijskim tlakom (SAT) 130-139 mmHg ili dijastoličkim arterijskim tlakom (DAT) 85-89 mmHg. Nasuprot tome, američke smjernice (engl. *Joint National Committee 7, JNC 7*) u kategoriju „predhipertenzija“ uključuju one osobe čiji je SAT 120 - 139 mmHg ili DAT 80 - 89 mmHg (1,14). Predhipertoničari imaju veći rizik za razvoj AH nego normotoničari, dok podskupina predhipertoničara s višim vrijednostima AT (130 - 139 mmHg SAT ili 85 - 90 mmHg DAT) ima 2 puta veći rizik za razvoj AH od predhipertoničara s nižim vrijednostima AT (15). Framinghamska studija je na 6,859 ispitanika kroz 10 godina praćenja pokazala kako je rizik za razvoj kardiovaskularnih incidenata 2,5 puta veći kod žena, a 1,6 puta u muškaraca s visokonormalnim AT u usporedbi s osobama s optimalnim AT (7). Huang i suradnici 2014. godine u velikim meta-analizama potvrđuju povezanost PHT s moždanim udarom, većom smrtnosti od kardiovaskularnih događaja i terminalnom fazom bolesti bubrega, gdje je relativni rizik bio značajno veći za predhipertoničare s višim vrijednostima AT (4-6). Današnje smjernice ne navode potrebu za uvođenjem medikamentne terapije kod takvih osoba, no preporučuju prilagodbu načina života u smislu zdravijeg načina života (smanjenje konzumacije kuhinjske soli, alkohola te smanjenje tjelesne mase, konzumiranje više voća i povrća, niskomasnu dijetu te redovitu tjelesnu aktivnost) što je ishodišna točka u prevenciji razvoja AH (1). Rezultati TROPHY istraživanja (engl. *Trial of Preventing Hypertension*) su pokazali kako rana primjena antihipertenzivnih lijekova u predhipertoničara može spriječiti ili odgoditi napredovanje u AH (16). No, zaključak autora je da to ne može biti osnovni način prevencije AH u PHT već da je nužno pravilno identificirati one s povećanim rizikom. Procjenjuje se da je globalna učestalost PHT ovisno o studiji 22% do 38% (17). Prema rezultatima

ispitivanja Epidemiologija arterijske hipertenzije u Hrvatskoj (EH-UH studija) učestalost visoko normalnog AT u Hrvatskoj iznosi 38%, dok je učestalost PHT u SAD-u prema NHANES studiji (engl. *National Health and Nutrition Examination Survey*) bila 31% (18,19).

Dokazani veći rizik za razvoj AH i s njom povezanim pobolom ukazuju na važnost ispitivanja genske podloge predhipertenzije gdje je naročito zanimljivo mjesto gena za uromodulin za koji je dokazano kako ima važnu ulogu u regulaciji AT i mogućem nastanku AH (8,9,13,20,21).

### 3.2. Uromodulin

Uromodulin, ili Tamm-Horsfallov protein, najzastupljeniji je protein mokraće. U mokraći precipitira te gradi matriks hijalinih cilindara normalno prisutnih u zdravih osoba. Prema većini autora uromodulin se sintetizira isključivo u bubregu, u epitelnim stanicama debelog uzlaznog kraka Henleove petlje (22,23). Tijekom biosinteze, prekursor uromodulina se premješta u endoplazmatski retikulum, gdje podliježe brojnim posttranslacijskim modifikacijama, od kojih neke služe kao signalne molekule za slanje prema apikalnoj membrani epitelnih stanica debelog uzlaznog kraka Henleove petlje i distalnog zavijenog tubula (22-24). S luminalne strane protein je usidren glikozil-fosfatidil-inozitolom i aktivno se otpušta u mokraću specifičnom, još nedefiniranom, proteazom (25). Točna uloga uromodulina nije još posve jasna. Pretpostavlja se da ima važnu ulogu u vezikularnom transportu epitelnih stanica, organizaciji i dinamici apikalne membrane na kojoj formira filamentoznu gel strukturu stvarajući vodenu barijeru te tako utječe na transport iona i održavanje protustrujnog gradijenta u intersticiju (22). Uromodulin također utječe na urinarni tok putem djelovanja na primarne cilije (26).

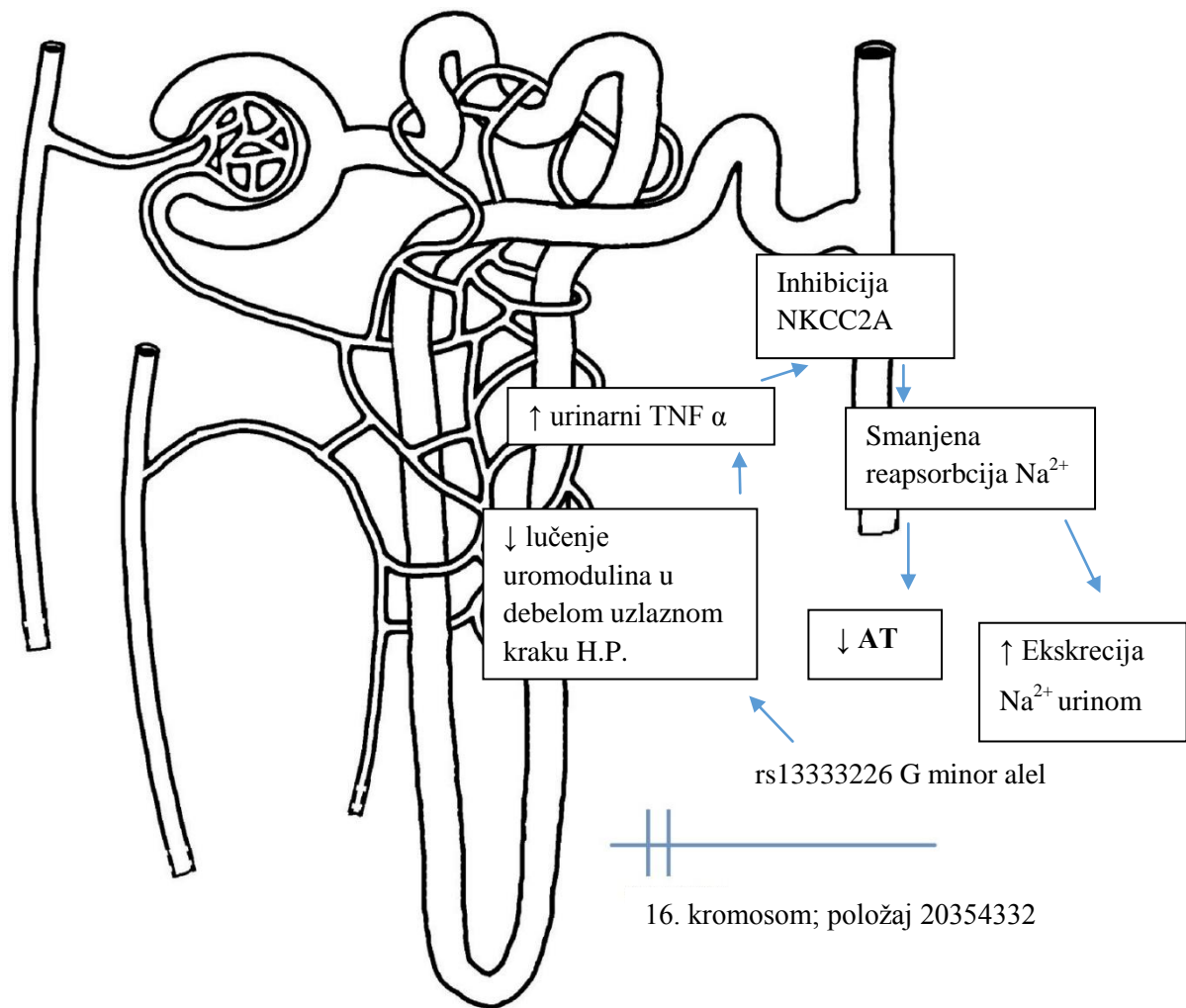
Nakon odvajanja od epitela velike količine uromodulina se otpuštaju u tubularnu tekućinu i međusobno stupaju u interakciju, što utječe na koloidno-osmotski tlak, prolaz pozitivno nabijenih elektrolita i kolonizaciju uropatogenih sojeva te sprječava njihovo prijanjanje za glikoproteine i glikolipide na luminalnoj strani membrane. Samim time smanjuje se rizik za nastanak urinarnih infekcija (27-29). Također, uromodulin ima važnu funkciju u inhibiciji formiranja mokraćnih kamenaca i uključen je u procese regulacije razine urata (30,31).

Danas postoje dokazi da uromodulin regulirajući homeostazu natrija utječe na AT. Trudu i suradnici su pokazali da prekomjerno lučenje uromodulina u transgeničnih miševa dovodi do sol osjetljive hipertenzije. Također su prikazali poveznicu s NKCC2 ( $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  ko-transporter), gdje su primjenom njegova blokatora furosemda transgenični miševi imali značajno veći pad SAT, i veću ekskreciju natrija (20). Graham i suradnici su pokazali da za *UMOD* gen modificirani (GM) miševi imaju značajno niži AT u bazalnim uvjetima za razliku od divljeg tipa. Također, nakon šestotjedne aplikacije 2% otopine NaCl divlji tip miševa je imao 33% viši SAT, za razliku od GM miševa.

Krivulja kronične bubrežne funkcije u GM miševa je pokazala pomak na lijevu stranu, što sugerira da uromodulin utječe na AT mijenjajući natrijurezu. GM miševi su u bazalnim uvjetima imali značajno niži eGFR (engl. *estimated glomerular filtration ratio*), dok su nakon aplikacije slane otopine imali viši eGFR u usporedbi s drugom skupinom. Porast u eGRF sugerira da GM miš ima veći kapacitet natrijureze (13).

Stanice debelog uzlaznog kraka Henleove petlje luče citokin TNF- $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ), koji djeluje inhibicijski na reapsorpciju natrija blokirajući NKCC2 kanal (32). U studiji Grahama i sur, koncentracija TNF- $\alpha$  u mokraći *UMOD* GM miša je bio značajno veća u usporedbi s koncentracijom kod divljeg tipa. Također, stimulacija stanica debelog uzlaznog kraka Henleove petlje s egzogenim TNF- $\alpha$  je dovela do smanjene ekspresije NKCC2 kanala (13).

Kompleksna patofiziologija utjecaja uromodulina na regulaciju AT nije do kraja razjašnjena, te su još uvijek otvorena pitanja o utjecaju uromodulina na makulu denzu, tubuloglomerularnu povratnu spregu i glomerularnu filtraciju, distalne transportere natrija, kao i na renin-angiotenzin-aldosteron sustav. Buduća istraživanja u ovim područjima će omogućiti razvoj novih ili prenamjenu postojećih lijekova u svrhu bolje regulacije AT. Usprkos velikom napretku u liječenju kardiovaskularnih bolesti, AH ostaje glavni faktor rizika koji globalno utječe na njihov razvoj (21). Iz tog razloga će rezultati budućih istraživanja u ovom području biti od velikog značenja. Na slici 1. shematski je prikazan pretpostavljeni patofiziološki model djelovanja uromodulina na reapsorpciju natrija i AT, kao i utjecaj minor alela G u polimorfizmu jednog nukleotida rs13333226 opisanog u daljnjem tekstu.



**Slika 1.** Pretpostavljeni patofiziološki model utjecaja prisutnosti minor alela G u polimorfizmu jednog nukleotida rs 1333226 na arterijski tlak. H.P. – Henleova petlja, TNF α – engl. *tumor necrosis factor alpha*, NKCC2A – Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> ko-transporter *izoforna A*, AT – arterijski tlak

### 3.3. Gen *UMOD* i SNP rs13333226

Protein uromodulin je kodiran genom *UMOD* koji je smješten na kromosomu 16 (16p12.3 regija genoma) te sadrži 15 egzona. Fizička pozicija na kromosomu 16 je između 20,344,374 i 20,364,037 parova baza (33). Mutacije gena *UMOD* povezane su s monogenkim oblicima bubrežne bolesti poput medularne cistične bubrežne bolesti tip 2 (engl. *medullary cystic kidney disease, MCKD2*) i obiteljske juvenilne hiperuricemične nefropatije (engl. *familial juvenile hyperuricaemic nephropathy, FJHN*). Ove autosomno dominantne tubulointersticijske bubrežne bolesti imaju zajednička obilježja poput poliurije, progresivnog bubrežnog zatajenja, hiperuricemije i gihta, a obje su povezane s intersticijskim promjenama koje dovode do fibroze bubrežnog tkiva (33-35). Osim mutacija za monogenske oblike bolesti varijante gena *UMOD* imaju ulogu i u multifaktorskim bolestima i poremećajima, odnosno povezane su s promijenjenom glomerularnom filtracijom, AT, razinom mokraćne kiseline u mokraći i incidencijom kronične bubrežne bolesti (engl. *chronic kidney disease, CKD*) (8,10). Postoje brojne genske varijante koje utječu na AT, a broj poznatih lokusa i dalje raste (10). Nasljedna komponenta AT se procjenjuje na oko 30%, a sve do sada identificirane poznate varijante objašnjavaju manje od 3% ukupne varijacije, što govori da velik dio genetskog doprinosa na varijabilnost AT-a još nije objašnjen (36).

Polimorfizmi jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism, SNP*) su varijacije u slijedu baza DNA. Pojedini SNP predstavlja mjesto u DNA na kojem se kod nekih ljudi nalazi jedna baza, a kod drugih neka druga. Budući da neki polimorfizmi određuju različite fenotipske karakteristike, biljeg su genske varijacije. Pritom se u obzir uzimaju samo polimorfizmi čija je učestalost u populaciji veća od 1%. Do 2015. godine bilo je identificirano 147 SNP-ova povezanih s AT iz GWAS kataloga (12). Jedan od takvih primjera je upravo SNP rs13333226 lociran u neposrednoj blizini promotorske regije gena *UMOD*, za kojeg su Padmanabhan i sur. utvrdili da je povezan s AH i ekskrecijom uromodulina u mokraći, i to na način da su nositelji minor alela G bili povezani s manjim rizikom za oboljenje od AH i manjom ekskrecijom uromodulina. Podaci iz ove studije su pokazali da je minor alel G rs13333226 povezan s povećanim eGFR ( $\beta=3,6$ ,  $p=0,012$ ), no prilagodba za eGFR u ovoj meta-analizi nije promijenila povezanost rs13333226 s manjim rizikom za AH, što govori u prilog činjenici da je taj lokus nezavisno o eGFR povezan s AH. Osim toga utvrđena je i povezanost rs13333226 s dugotrajnim kardiovaskularnim ishodom, s relativno malim slabljenjem učinka nakon prilagodbe za SAT i DAT što sugerira da bi gen *UMOD* mogao imati utjecaj na kardiovaskularni rizik, djelomično nezavisno o AT (8). Jedna od ograničenja te studije je u tome što mjerenja AT i eGFR ne moraju u stvarnosti predstavljati cjeloživotni učinak genskih varijanti na te ishode, stoga se ne može isključiti da rs13333226 ima utjecaj na razvoj AH i posljedični pobol. To je bio glavni poticaj našim razmišljanjima da bi polimorfizam rs13333226 mogao biti povezan s rizikom razvitka trajne AH u

predhipertoničara što bi objasnilo jedan od mehanizama nastanka hipertenzije, te bi bio i potencijal za razvoj prognostičkog testa, a kasnije i mogućnost planiranja nekog oblika specifičnog liječenja.

Jedan od ciljeva GWAS studije bilo je upravo otkrivanje genskih lokusa na koje bi se moglo terapijski djelovati. Većina antihipertenzivnih lijekova koji su danas u upotrebi su povijesno razvijeni konvencionalnim farmakološkim istraživanjima s ciljem da smanjuju udarni volumen ili ukupni periferni otpor. Danas su mehanizmi djelovanja poznati, na primjer  $\beta$ -blokatori i njihovo djelovanje na  $\beta$ -adrenergičke receptore (uključujući gen *ADRB1*),  $\text{Ca}^{2+}$  blokatori koji djeluju na voltažne  $\text{Ca}^{2+}$  kanale (uključujući gen *CACNB2*), dok ACE inhibitori i blokatori angiotenzinskih receptora djeluju na *renin-angiotenzin-aldosteronski* sustav (gen *AGT*) (12). Ovo pokazuje korisnost genskih istraživanja u smislu da bi otkriće novih potencijalnih ciljnih mjesta djelovanja lijeka moglo poslužiti kao ishodišna točka za razvoj novih lijekova. Unatoč uspjehu identificiranja novih genskih lokusa, mnogi mehanizmi još su nejasni. Potrebno je u budućnosti više genskih istraživanja, kako bi se dokazao klinički utjecaj, te više SNP-ova povezati s genima, signalnim putevima i načinima djelovanja.

#### **4. HIPOTEZA**

Polimorfizam jednog nukleotida rs13333226 gena *UMOD* učestalije se nalazi u osoba s predhipertenzijom nego u osoba s normalnim arterijskim tlakom.

#### **5. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI**

##### **5.1. Opći cilj**

Analizirati povezanost polimorfizma jednog nukleotida rs13333226 gena *UMOD* s predhipertenzijom u općoj populaciji.

##### **5.2. Specifični ciljevi**

1. Opisati skupine predhipertoničara i normotoničara prema kliničkim i biokemijskim obilježjima.
2. Odrediti učestalosti pojedinih alela i genotipova rs13333226 u skupinama predhipertoničara i normotoničara.
3. Analizirati i usporediti kliničke i laboratorijske karakteristike prema različitim genotipovima.
4. Izraditi statistički model predikcije razvoja predhipertenzije.
5. Analizirati povezanost polimorfizma rs13333226 gena *UMOD* s arterijskim tlakom i bubrežnom funkcijom.



## 6. MATERIJALI I METODE

### 6.1. Ispitanici

U ovo istraživanje bilo je uključeno 496 ispitanika iz epidemiološko-kliničkog istraživanja populacije u kontinentalnom ruralnom dijelu Hrvatske, iz skupine od 3,304 stanovnika slavonskih sela koji su bili dio znanstveno-istraživačkog projekta „Endemska nefropatija u Hrvatskoj – epidemiologija, etiologija i patofiziologija“, voditelj prof.dr.sc. Bojan Jelaković. Ispitanici su uključeni metodom “door-to-door” (engl. za “od vrata do vrata”) tijekom tri perlustracije (2005., 2008., 2010.godine), a 2015. godine, u četvrtoj perlustraciji napravljena je analiza praćenja što nije uključeno u ovaj rad. Obuhvaćeno je 60 do 75% populacije (engl. *participation rate*) tog područja (ovisno o selu) što je sukladno drugim takvim istraživanjima. U ovo presječno istraživanje uključen je slučajni uzorak od 496 odraslih osoba (312 žena i 184 muškaraca) koji zadovoljavaju kriterije uključenja koji su bili: 1. dob starija od 18 godina i 2. nisu liječeni zbog AH, šećerne bolesti tipa 2, drugih kardioloških poremećaja ili bolesti, te da nisu uzimali drugu kroničnu terapiju. Kriteriji isključenja su: 1. liječena AH ili šećerna bolest, 2. preboljeli moždani udar ili infarkt miokarda, 3. srčano zatajenje, 4. kronična bubrežna bolest, 5. trudnoća, 6. terminalna bolest, teški invaliditet, jedan ili više amputiranih udova, nepokretnost te 7. demencija ili psihička bolest. Zbog utjecaja bubrežnog oštećenja na vrijednosti laboratorijskih nalaza isključene su sve osobe s  $eGFR < 60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ . Budući da je istraživanje provedeno na prostoru endemske nefropatije, isključeni su svi ispitanici klasificirani kao “oboljeli od endemske nefropatije”, “pod sumnjom na endemsku nefropatiju” ili “pod rizikom za endemsku nefropatiju”. Uključeni ispitanici su podijeljeni ovisno o visini AT prema američkim smjernicama (engl. *Joint National Committee 7, JNC 7*), u skupinu predhipertoničara (N=339) i normotoničara (N=157) koji su bili kontrolna skupina. Prema JNC 7 podjeli skupini predhipertoničara pripadaju osobe čiji je SAT 120 - 139 mmHg ili DAT 80 - 89 mmHg, a skupini normotoničara pripale su osobe s SAT manjim od 120 mmHg i DAT manjim od 80 mmHg (14).

Istraživanje su odobrila etička povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kliničkog bolničkog centra Zagreb, te Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo. Prije uključivanja u istraživanje svi ispitanici bili su upoznati s ciljevima istraživanja i svaki ispitanik je potpisao informirani pristanak za dobrovoljno sudjelovanje u istraživanju.

## **6.2. Metode**

### **6.2.1. Antropometrijski i klinički podaci**

Svi ispitanici su klinički pregledani od liječnika i studenata medicine viših godina Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, te je kod svih uzeta iscrpna anamneza koristeći ranije pripremljen opsežan upitnik. Podaci o dosadašnjim bolestima, terapiji i životnim navikama nadopunjeni su i provjereni uvidom i pregledom medicinske dokumentacije liječnika obiteljske medicine iz sela koja su bila obuhvaćena ovim istraživanjem.

Tjelesna visina ispitanicima je izmjerena u stojećem položaju bez obuće, a tjelesna masa bez teških odjevnih predmeta. Tjelesna masa izmjerena je elektroničkom dijagnostičkom vagom Omron BF-511 u kilogramima, a tjelesna visina centimetarskom vrpcom u centimetrima. Indeks tjelesne mase (ITM) izračunat je kao omjer tjelesne mase u kilogramima i kvadrata tjelesne visine u metrima. Opseg struka mjereno je mjernom vrpcom u tri navrata pri čemu je za daljnje analize primijenjena aritmetička sredina tih mjerenja. Kao mjerilo centralne (visceralne) pretilosti uzet je opseg struka veći od 102 cm za muškarce i veći od 88 cm za žene.

AT i srčana frekvencija izmjereni su oscilometrijskim digitalnim automatskim tlakomjerom Omron M6 na nedominantnoj ruci u sjedećem položaju nakon 5 minuta odmora, sukladno smjericama ESH/ESC. Mjerenja su izvršena najmanje dva puta u razmaku od 1 – 2 minute, ili i treći put ukoliko su prva dva bila različita (1). Srednja vrijednost dva, odnosno tri mjerenja korištena je za potrebe ovog istraživanja. AH definirana je kao SAT ili DAT veći ili jednak 140/90 mmHg, dok je PTH definirana kao SAT od 120 - 139 mmHg ili DAT 80 - 89 mmHg.

### **6.2.2. Laboratorijski podaci**

Uzorci krvi i mokraće su nakon uzorkovanja centrifugirani i pohranjeni na +4 °C u terenskom laboratoriju koji je osnovan za potrebe istraživanja, te su isti dan u roku od 3 sata transportirani u Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu gdje su učinjene biokemijske analize. Kreatinin u serumu određen je standardiziranom enzimskom metodom, koncentracije glukoze mjerene su natašte i određene su fotometrijski UV s heksokinazom, lipoprotein velike gustoće (HDL) određen je homogenom enzimskom metodom s modificiranim polietilenglikolom (PEG) i alfa-ciklodekstran-sulfatom, lipoprotein male gustoće (LDL) računskom metodom prema Friedwaldu, koncentracije triglicerida i kolesterola fotometrijskom metodom s glicerofosfat-oksidadom, odnosno kolesterol-oksidadom. Svi navedeni biokemijski parametri određeni su na biokemijskom analizatoru Cobas c501 (Roche,

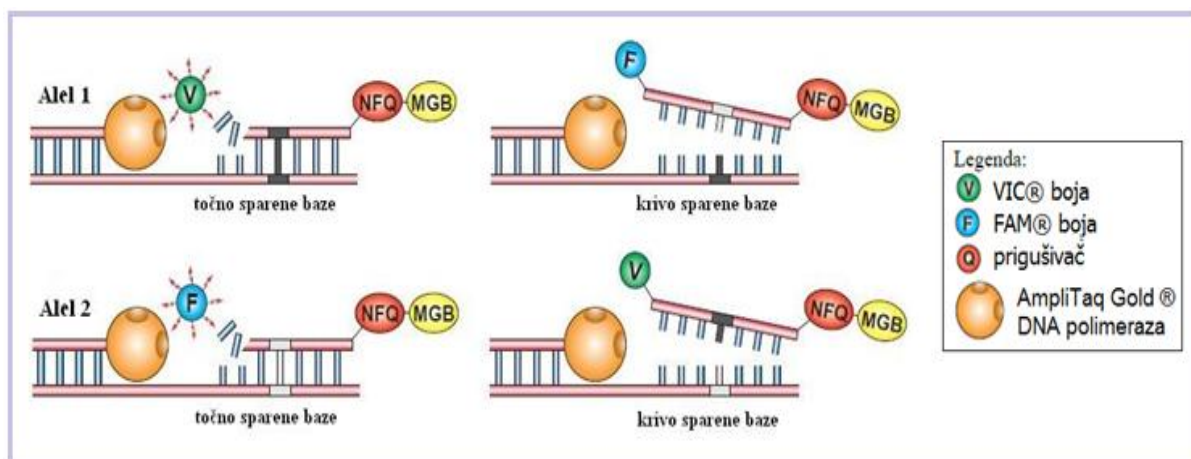
Njemačka). Albumini u mokraći određeni su u prvom jutarnjem uzorku mokraće uređajem Siemens Dade Behring BN II Nephelometer (Siemens, Njemačka). Glomerularna filtracija izračunata je CKD-EPI kreatinin formulom (2009.),  $eGFR=141 \times [Kreatinin \text{ u serumu}/\kappa (\kappa=0,7 \text{ za žene, } \kappa=0,9 \text{ za muškarce})]^{-1,209} \times 0,993^{dob} \times 1,018 \text{ (za žene)} \times 1,159 \text{ (za crnu rasu)}$ . Omjer albumina i kreatinina (engl. *albumin/creatinine ratio*, *ACR*) u mokraći izračunat je iz masenih koncentracija.

### 6.2.3. Izdvajanje DNA

Za izdvajanje DNA iz pune krvi pomiješane s antikoagulansom (EDTA) korišteni su FlexiGene DNA reagensi (QIAGEN, Njemačka). U prvom koraku u 7,5 mL lizirajućeg pufera dodano je 3mL pune krvi. Nakon miješanja i centrifugiranja u trajanju od 6 minuta pri 10000 x g dobiven je talog koji sadrži stanične jezgre i mitohondrije. U slijedećem koraku se odlijevanjem taloga, dodavanjem 1,5 mL smjese pufera za denaturaciju i 15 µL proteaze te inkubacijom 10 minuta na 65 °C omogućilo uspješno odvajanje proteina. Nakon dodavanja 1,5mL 100% izopropanola i temeljitog miješanja precipitati DNA su postali vidljivi u obliku niti ili grumena. Reakcijska smjesa je ponovno centrifugirana 6 minuta na 10000 x g, a dobiveni talog ispiran s 1,5mL 70% etanolom. Nakon ponovnog centrifugiranja i sušenja na zraku, posušenom talogu se dodalo 300 µL pufera za hidrataciju te se DNA otapala preko noći na 65 °C.

### 6.2.4. Genotipizacija

Genotipizacija SNP gena *UMOD* (rs13333226) provedena je TaqMan® (Applied Biosystems, SAD) metodom PCR u stvarnom vremenu (engl. *Real-time PCR*, *polimerase chain reaction*) uređajem ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, SAD). Metoda se temelji na hibridizaciji ciljanog slijeda DNA i oligonukleotidne probe obilježene fluorescentnom bojom koja zbog 5' nukleazne aktivnosti Taq DNA polimeraze za vrijeme amplifikacije omogućuje prijenos energije fluorescentnom rezonancijom (engl. *fluorescence resonance energy transfer*, *FRET*). Za amplifikaciju DNA se koriste dvije TaqMan® fluorescentno obilježene oligonukleotidne probe za detekciju alela i specifične početnice. Probe sadrže reporter boju na 5' kraju svake probe, VIC® boja za alel 1 i FAM® boja za alel 2. Cijepanjem proba hibridiziranih na ciljnu sekvencu DNA dolazi do odvajanja prigušivača i reporter boje te emisije fluorescentnog signala (slika 2.). Sustav analize temelji se na detekciji i kvantifikaciji fluorescence, čiji signal raste ovisno o povećanju broja kopija produkta u PCR reakcijskoj smjesi. Značajno povećanje VIC® fluorescentnog signala ukazuje na prisutnost homozigota za alel 1, povećanje FAM® fluorescentnog signala na prisutnost homozigota za alel 2, a povećanje oba signala ukazuje na prisutnost heterozigota.



**Slika 2.** Načelo rada TaqMan® proba

Reakcijska smjesa je ukupnog volumena 25  $\mu\text{L}$  i sadrži reagenze: TaqMan® Universal PCR Master Mix 12,5  $\mu\text{L}$ , TaqMan® DME Assay *UMOD* (ID C\_31122293\_0) Mix \*, 20x 1,25  $\mu\text{L}$  i DNA razrjeđenje 11,25  $\mu\text{L}$  (tablica 1. i 2.).

**Tablica 1.** Sastojci reakcijske smjese

Sastojci reakcijske smjese	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Koncentracija u reakcijskoj smjesi
TaqMan® Universal PCR Master Mix	12,5	1x
TaqMan® DME Assay Mix *, 20x	1,25	1x
DNA razrjeđenje	11,25	1-20 ng
<b>Ukupni volumen reakcijske smjese</b>	<b>25</b>	

\*Za analizu svakog polimorfizma koristi se odgovarajući TaqMan® DME Assay

**Tablica 2.** Specifičan TaqMan® DME Assay ID za SNP rs1333226

Gen - alel	db SNP* (rs#)	c. DNA	TaqMan® DME Assay ID
<i>UMOD</i>	1333226	-1746T>G	C_31122293_0

\* engl. *SNP Database - National Center for Biotechnology Information (NCBI)*

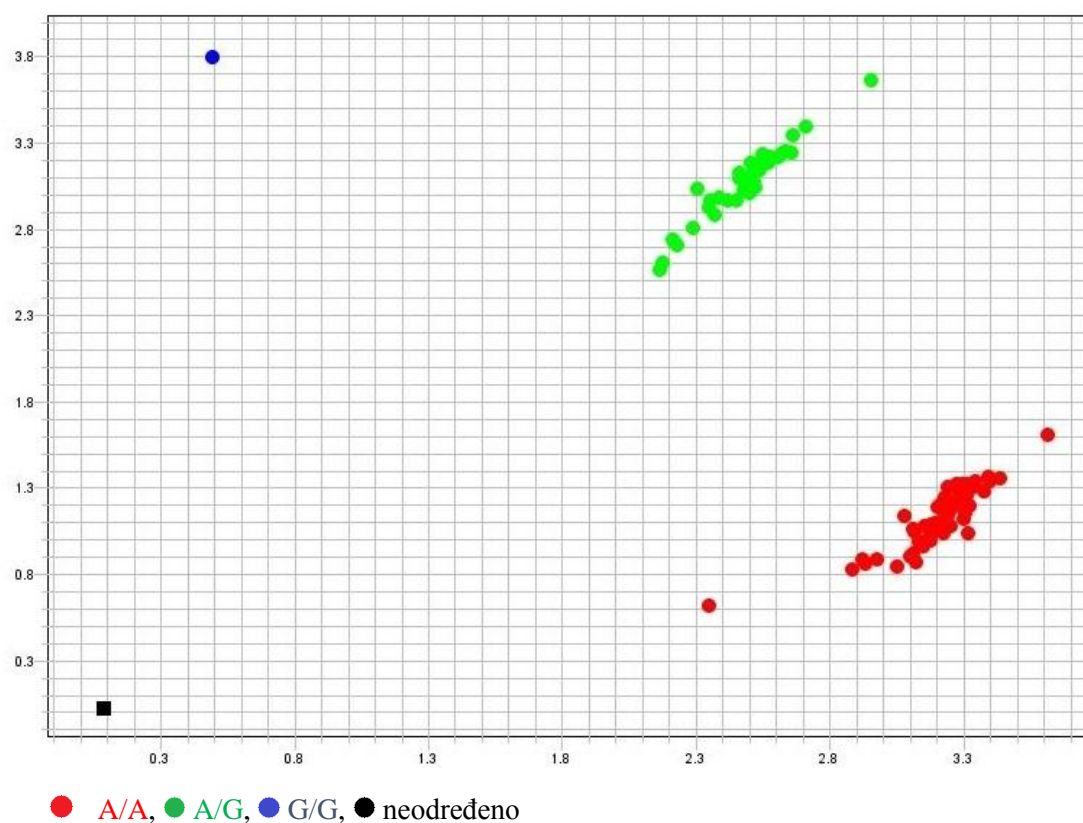
Uvjeti PCR na uređaju ABI 7500 bili su: 1) Inicijacija – ciljana temperatura 50 °C u trajanju od 2 minute, 95 °C u trajanju od 10 minuta 2) Denaturacija – 1 ciklus 15 sekundi pri temperaturi od 92 °C;

3) Amplifikacija – 1 ciklus 90 sekundi pri temperaturi od 60 °C. Ukupno je učinjeno 50 ciklusa (vidjeti tablicu 3.).

**Tablica 3.** Uvjeti PCR na uređaju ABI 7500 za genotipizaciju *UMOD*

	PCR (50 ciklusa)	
INICIJACIJA	DENATURACIJA	AMPLIFIKACIJA
ciljna temperatura / trajanje	ciljna temperatura / trajanje	ciljna temperatura / trajanje
50 °C / 2 min	92 °C / 15 s	60 °C / 90 s
95 °C / 10 min		

Na temelju opisanog postupka računarni program preračunava podatke dobivene fluorescence emisijom i omogućava analizu alelnu diskriminaciju (AD). Na slici 3. prikazan je primjer AD SNP rs13333226 gena *UMOD* za 96 ispitanika dobiven TaqMan® metodom.



**Slika 3.** Prikaz alelnu diskriminacije radnog uzorka SNP rs13333226

### 6.2.5. Statistička analiza

U statističkoj analizi korištene su deskriptivne i analitičke statističke metode. Prikazani su postoci za kategorijske varijable, srednja vrijednost i standardna devijacija i medijan i interkvartilni raspon (25. i 75. percentil). Pravilnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je D'Agostino-Pearsonovim testom, te su naknadno primijenjeni parametrijski i neparametrijski statistički testovi. Razlike u razdiobi kategorijskih varijabli i proporcija između skupina testirane su  $\chi^2$ -testom, a po potrebi Fisherovim egzaktnim testom. Za testiranje razlika između dviju nezavisnih skupina primijenjen je Studentov t-test ili Mann-Whitney U-test. U usporedbi više od dvije skupine pravilno raspodijeljenih varijabli korištena je analiza varijance (ANOVA) i Turkey ili Hochberg test za post hoc analizu, a za usporedbu više od dvije skupine nepravilno raspodijeljenih varijabli Kruskal-Wallis test te post hoc Mann-Whitney U-test. Primijenjene su multivarijatne metode analize, multipla linearna regresija i logistička regresija.

U logističkoj regresiji korišteno je više modela kako bi se ispitale asocijacije pojedinih genotipova i alela s predhiperenzijom kao fenotipskim obilježjem (37,38).

1. opći ili kodominatni model – ovo je standardni model u kojem su ispitanici podijeljeni u tri skupine po genotipovima – AA, AB, BB (B je minor alel)
2. dominantni model – u ovom modelu ispitanici su podijeljeni u dvije skupine: AA i AB+BB. Kao i recesivni model, ovaj model se koristi zbog povećane statističke snage (u slučajevima kada pretpostavljamo da je učinak dominantan, tj. recesivan, ako se radi o recesivnom modelu). Ovaj model pretpostavlja kako je za promjenu u riziku od X puta potreban samo jedan recesivni alel.
3. recesivni model - u ovom modelu ispitanici su podijeljeni u dvije skupine: AA+AB i BB. Ovaj model pretpostavlja kako su za promjenu u riziku od X puta potrebna oba recesivna alela.
4. Over-dominantni ili super-dominantni model – u ovom modelu ispitanici su podijeljeni u dvije skupine: AA+BB i AB. Model prvenstveno služi za ispitivanje moguće heterozigotne prednosti (engl. *heterozygote advantage*) kada se pretpostavlja da bi heterozigot mogao imati neka pozitivna svojstva koja nemaju homozigoti (npr. u srpastoj anemiji recesivni homozigoti imaju kraće očekivano vrijeme života, ali i zaštitu od malarije zbog defektnih eritrocita, dok dominantni homozigoti imaju normalno očekivano vrijeme života, ali nemaju prednost zaštite od malarije. Heterozigoti, pak, imaju normalan životni vijek i djelomičnu zaštitu od malarije).
5. log-aditivni model – ovaj model implicira da je rizik heterozigota X, a recesivnog homozigota 2X puta drugačiji (veći ili manji) od dominantnog homozigota na logaritamskoj skali.

U svim testovima p-vrijednost manja od 0,05 (dvostrani test) predstavljala je razinu statističke značajnosti.

Statistička obrada podataka učinjena je u programu SPSS verzija 23 (IBM Inc., SAD) i SNPstats.

## 7. REZULTATI

### 7.1. Usporedba normotoničara i predhipertoničara prema temeljnim kliničkim obilježjima

U tablici 4. prikazane su kliničke karakteristike pojedinih skupina. Kontinuirane varijable prikazane su kao medijan s interkvartilnim rasponom, a kategoričke kao postotak.

**Tablica 4.** Klinički pokazatelji ispitanika i usporedba skupina normotoničara i predhipertoničara

<b>Klinički pokazatelj</b>	<b>Cijela skupina (N=496)</b>	<b>Normotoničari (N=157)</b>	<b>Predhipertoničari (N=339)</b>	<b>P</b>
Muški spol (%)	37,1	24,2	43,1	<b>&lt;0,001</b>
Dob (godine)	41,0 (40,0-43,0)	35,0 (26,0 – 45,0)	44,0 (34,0 – 51,75)	<b>&lt;0,001</b>
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	25,8 (25,3-26,2)	23,7 (21,3 – 26,3)	26,9 (23,9 – 29,6)	<b>&lt;0,001</b>
ITM > 25 (%)	58,3	40,8	66,4	<b>&lt;0,001</b>
OS (cm)	89,0 (88,0-91,0)	85,0 (75,0-92,2)	92,0 (83,0-99,0)	<b>&lt;0,001</b>
OS>102cm M, >88cm Ž (%)	36,1	28,7	39,5	<b>&lt;0,019</b>
SAT (mmHg)	122,0 (120,5-122,5)	110,5 (105,9 – 115,0)	125,0 (121,5 – 131,4)	<b>&lt;0,001</b>
DAT (mmHg)	77,5 (76,5-78,5)	71,5 (66,5 – 75,1)	80,5 (75,5 – 84,0)	<b>&lt;0,001</b>
SF (min <sup>-1</sup> )	76,5 (75,0-77,2)	77,0 (69,0-85,5)	76,0 (69,5-84,0)	0,612

ITM – indeks tjelesne mase, OS – opseg struka, SAT – sistolički arterijski tlak, DAT dijastolički arterijski tlak, SF – srčana frekvencija. P vrijednost dobivena je usporedbom skupina normotoničara i predhipertoničara.

Predhipertoničari su bili češće muškarci, starije dobi (medijan = 44 godine u usporedbi s normotoničarima, medijan = 35 godina), većeg ITM-a (66% ispitanika s predhipertenzijom je imalo ITM > 25) i šireg struka. SAT i DAT bili su očekivano viši u predhipertoničara budući da su skupine kategorizirane prema AT ( $p<0,05$ ). Nije bilo razlike u srčanoj frekvenciji između skupina.

## 7.2. Usporedba normotoničara i predhipertoničara prema temeljnim biokemijskim obilježjima

U tablici 5. prikazani su biokemijski parametri pojedinih skupina. Kontinuirane varijable prikazane su kao srednja vrijednost sa standardnom devijacijom, odnosno medijan s interkvartilnim rasponom, ovisno o distribuciji.

**Tablica 5.** Biokemijski pokazatelji ispitanika i usporedba skupina normotoničara i predhipertoničara

<b>Biokemijski parametar</b>	<b>Cijela skupina (N=496)</b>	<b>Normotoničari (N=157)</b>	<b>Predhipertoničari (N=339)</b>	<b>P</b>
Ukupni kolesterol (mmol/L)	5,33 (1,09)	4,99 (1,02)	5,48 (1,08)	<b>&lt;0,001</b>
LDL – kolesterol (mmol/L)	3,1 (3,02-3,2)	2,9 (2,3-3,5)	3,3 (2,6-3,9)	<b>&lt;0,001</b>
HDL – kolesterol (mmol/L)	1,49 (1,47-1,54)	1,49 (1,29-1,73)	1,5 (1,28-1,81)	0,402
Trigliceridi (mmol/L)	1,06 (1,0-1,12)	0,92 (0,68-1,35)	1,12 (0,81-1,68)	<b>0,002</b>
Glukoza (mmol/L)	5,0 (4,9-5,03)	4,8 (4,5-5,12)	5,1 (4,7-5,5)	<b>&lt;0,001</b>
Kreatinin serum ( $\mu$ mol/L)	78 (77-80)	77 (69,75-85)	79 (70-89)	0,135
Kreatinin urin (mmol/L)	12,55 (12-13)	13,9 (9-18,1)	12 (7,7 – 16,8)	<b>0,012</b>
Albumin urin (mg/L)	6,31 (6,0-6,93)	6,53 (4,09 – 10,35)	6,15 (3,8 – 11)	0,539
ACR (mg/g)	4,62 (4,3-4,8)	4,65 (3,21-6,81)	4,57 (3,33-7,05)	0,427
eGFR (mL/min)	103,7 (102-105,4)	112,35 (97,7-122,6)	101,1 (89,8-111,6)	<b>&lt;0,001</b>

ACR – omjer albumina i kreatinina u mokraći, eGFR – procijenjena glomerularna filtracija. P vrijednost dobivena je usporedbom skupina normotoničara i predhipertoničara.

Uspoređujući biokemijske pokazatelje predhipertoničari su imali značajno više vrijednosti ukupnog kolesterola, LDL-kolesterola, triglicerida i glukoze u krvi, te niže vrijednosti eGFR. Nije nađena razlika u koncentraciji HDL-kolesterola, kreatinina u serumu, albumina u mokraći te omjera albumina i kreatinina u mokraći (ACR).



### 7.3. Testiranje genetske ravnoteže promatrane populacije Hardy-Weinbergovim načelom

Hardy-Weinbergov princip govori da će učestalosti genotipova i alela u populaciji ostati konstantne u susjednim generacijama ukoliko nije došlo do utjecaja evolucionih čimbenika kao što su npr. selekcija ili, mutacija što je preduvjet za analizu polimorfizama.

Hardy-Weinbergova ravnoteža (HWR) računata je jednačicom  $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ , gdje su p i q učestalosti alela pojedinog polimorfizma.

Polimorfizam jednog nukleotida rs13333226 testiran je na odstupanje od HWR usporedbom opaženih i očekivanih frekvencija genotipova (tablica 6.).

**Tablica 6.** Izračun Hardy-Weinbergove ravnoteže za promatrani polimorfizam

SNP	Kromosomski položaj	HWR $\chi^2$ test – p vrijednost	Varijanta	Minor alel	Frekvencija minor alela
rs13333226	16:20354332	0,109	A → G	G	0,17

SNP – polimorfizam jednog nukleotida, HWR - Hardy – Weinbergova ravnoteža

Istraživani SNP rs13333226 statistički značajno ne odstupa od HWR, što dokazuje da je u istraživanoj populaciji prisutan uvjet slučajnog odabira partnera (engl. *random mating*), nema mutacija, genskog pomaka ili migracije te da nisu primijećeni učinci prirodne selekcije.

#### 7.4. Usporedba učestalosti genotipova i alela između normotoničara i predhipertoničara

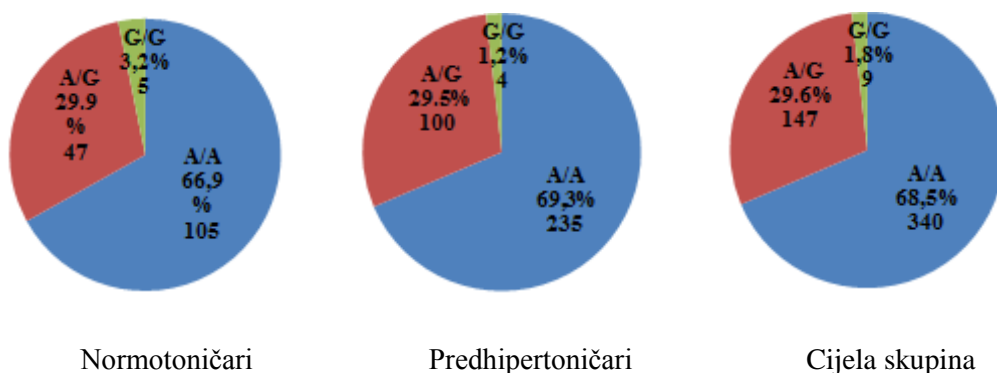
U tablici 7. prikazane su učestalosti genotipova i alela rs13333226 u cijeloj skupini i skupini normotoničara i predhipertoničara te njihova usporedba. Grafički izraženi rezultati su prikazani u slici 4.

**Tablica 7.** Prikaz distribucije genotipova i alela rs13333226 te usporedba između normotoničara i predhipertoničara

Genotip / alel	Cijela skupina N=496	Normotoničari N=157	Predhipertoničari N=339	P
A/A	340 (68,5%)	105 (66,9%)	235 (69,3%)	P=0,289
A/G	147 (29,6%)	47 (29,9%)	100 (29,5%)	
G/G	9 (1,8%)	5 (3,2%)	4 (1,2%)	
A alel	827 (83,4%)	257 (81,8%)	570 (84,1%)	P= 0,382
G alel	165 (16,6%)	57 (18,2%)	108 (15,9%)	

P vrijednost dobivena je usporedbom skupina normotoničara i predhipertoničara.

Distribucija genotipova rs13333226 (A/A, G/G, i A/G) nije se statistički značajno razlikovala u normotoničara i predhipertoničara ( $p=0,289$ ), kao ni prisutnost alela A i G ( $p=0,382$ ).



**Slika 4.** Grafički prikaz broja i učestalosti genotipova u pojedinim skupinama

## 7.5. Usporedba ispitanika ovisno o distribuciji genotipova s obzirom na kliničke i biokemijske pokazatelje

U tablici 8. prikazane su usporedbe kliničkih i laboratorijskih pokazatelja ispitanika razvrstanih prema genotipovima rs13333226.

**Tablica 8.** Klinički i biokemijski pokazatelji ispitanika uspoređeni prema genotipovima.

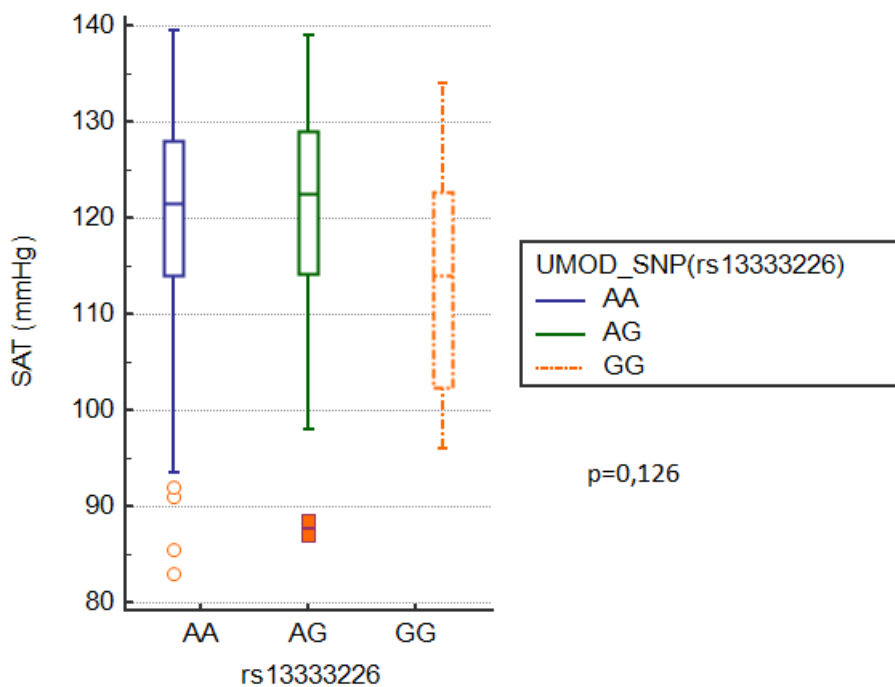
<b>Pokazatelj</b>	<b>A/A N=340</b>	<b>A/G N=147</b>	<b>G/G N=9</b>	<b>P</b>
Muški spol (%)	36,2	40,1	22,2	0,459
Dob (godine)	41 (31-50)	42 (32-49)	34 (32,75-42,75)	0,654
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	25,9 (22,9-29)	25,7 (22,7-28,3)	25 (23,2-26,8)	0,786
ITM > 25 (%)	58,5	58,5	44,4	0,698
OS (cm)	89 (80-98)	90 (80,25-97)	85 (81-90,25)	0,733
OS>102cm M, >88 cm Ž (%)	36,5	36,7	11,1	0,289
SAT (mmHg)	121,5 (114-128)	122,5 (114,1-129)	114 (102,25-122,6)	0,126
DAT (mmHg)	77,5 (71,5-82,5)	78 (72,25-82,5)	74 (70,75-79,5)	0,355
SF (min <sup>-1</sup> )	76,5 (69,5-84,5)	75,5 (67,75-84)	74,5 (65,75-85,25)	0,592
Ukupni kolesterol (mmol/L)	5,27 (1,1)	5,49 (1,04)	4,46 (0,69)	<b>0,008</b>
LDL – kolesterol (mmol/L)	3,05 (2,44-3,8)	3,3 (2,8-3,98)	2,7 (2,28-3,03)	<b>0,007</b>
HDL – kolesterol (mmol/L)	1,49 (1,28-1,77)	1,52 (1,29-1,81)	1,49 (1,21-1,54)	0,554
Trigliceridi (mmol/L)	1,05 (0,73-1,48)	1,11 (0,87-1,61)	0,87 (0,56-1,17)	0,063
Glukoza (mmol/L)	5 (4,7-5,4)	5(4,6-5,4)	4,7 (4,6-4,95)	0,174
Kreatinin serum (μmol/L)	78,5 (70-88)	77 (70-88)	84 (66,25-92,25)	0,724
Kreatinin urin (mmol/L)	12,85 (8-17)	12 (8-17)	11 (7,75-17,5)	0,951
Albumin urin (mg/L)	6,21 (3,77-10,52)	6,54 (4,05-11,12)	6,0 (3,43-8,47)	0,573
ACR (mg/g)	4,38 (3,23-6,96)	4,78 (3,46-6,95)	4,72 (3,14-6,35)	0,382
eGFR (mL/min)	103,28 (92,5-115,03)	104 (89,87-115,97)	113,1 (90,57-124,05)	0,477

ITM – indeks tjelesne mase, OS – opseg struka, SAT – sistolički arterijski tlak, DAT dijastolički arterijski tlak, SF – srčana frekvencija, ACR – omjer albumina i kreatinina u mokraći, eGFR – procijenjena glomerularna filtracija. P vrijednost dobivena je međusobnom usporedbom genotipova.

Rezultati nisu pokazali statistički značajnu razliku u visini niti sistoličkog niti dijastoličkog AT između genotipovima rs13333226 ( $p=0,126$ ;  $p=0,355$ ). Na slici 5. grafički je prikazan odnos SAT prema različitim genotipovima. Nema razlike između pojedinih genotipova no uočava se trend nižim vrijednostima SAT kod osoba s G/G varijantom.

Vrijednosti ukupnog kolesterola u krvi bile su značajno više u heterozigota A/G za razliku od homozigota G/G ( $p=0,008$ ), dok su vrijednosti LDL kolesterola bile značajno više u heterozigota A/G za razliku od oba homozigota A/A i G/G ( $p=0,007$ ). Od ostalih biokemijskih pokazatelja razlike nisu bile prisutne uspoređujući HDL, trigliceride, glukozu u krvi (GUK), serumski kreatinin, kreatinin u urinu, albumine u urinu, ACR i eGFR. ( $p>0,05$ ) (tablica 8.).

Statistički značajnih razlika također nije bilo uspoređujući genotipove po spolu, dobi, ITM, OS i SF. No, uočava se da su osobe s G/G bile najmlađe, imale najmanji ITM, OS, ACR i najveću eGFR. Izostanak značajnosti moguće je posljedica malog broja ispitanika s G/G genotipom.



**Slika 5.** Prikaz sistoličkog arterijskog tlaka (SAT) prema različitim genotipovima SNP rs13333226, SAT – sistolički arterijski tlak

## 7.6. Utjecaj genotipova rs1333226 na nastanak predhipertenzije

Logističkom regresijom ispitali smo utjecaj pojedinih genotipova na rizik za prisutnost predhipertenzije. U tablici 9. navedeni su različiti modeli za polimorfizam rs1333226 prilagođeni za poznate čimbenike rizika za nastanak AH: dob, spol, ITM, opseg struka, srčanu frekvenciju, ukupni kolesterol, HDL kolesterol, LDL kolesterol, trigliceride, GUK, ACR i eGFR.

**Tablica 9.** Logistička regresijska analiza za procjenu utjecaja genotipova rs1333226 na rizik razvoja predhipertenzije

Model	Genotip	Normotoničari	Predhipertoničari	OR (95% CI)	P
Kodominantni	A/A	105 (66,9%)	235 (69,3%)	1,00	<b>0,63</b>
	A/G	47 (29,9%)	100 (29,5%)	0,95 (0,60-1,53)	
	G/G	5 (3,2%)	4 (1,2%)	0,49 (0,11-2,16)	
Dominantni	A/A	105 (66,9%)	235 (69,3%)	1,00	<b>0,68</b>
	A/G-G/G	52 (33,1%)	104 (30,7%)	0,91 (0,58-1,43)	
Recesivni	A/A-A/G	152 (96,8%)	335 (98,8%)	1,00	<b>0,35</b>
	G/G	5 (3,2%)	4 (1,2%)	0,49 (0,11-2,17)	
Overdominantni	A/A-G/G	110 (70,1%)	239 (70,5%)	1,00	<b>0,9</b>
	A/G	47 (29,9%)	100 (29,5%)	0,97 (0,61-1,55)	
Log-aditivni	---	---	---	0,88 (0,58-1,32)	<b>0,53</b>

P – p vrijednost, OR – omjer šansi (engl. *odds ratio*), CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*)

U općem ili kodominantom modelu nije bilo povezanosti recesivnog homozigota s predhipertenzijom, omjer izgleda (šansi) u odnosu na dominantnog homozigota bio je 0,49 (95% interval pouzdanosti 0,11-2,16). Kada se promatrao dominantni model nasljeđivanja, recesivni homozigot i heterozigot nisu imali značajan omjer šansi za razvoj predhipertenzije ( $p=0,68$ ), kao ni recesivni homozigot u odnosu na dominantnog homozigota i heterozigota u recesivnom modelu ( $p=0,35$ ). Over-dominantnim ili super-dominantnim modelom nije dokazana moguća heterozigotna prednost ( $p=0,9$ ). U konačnici, log-aditivnim modelom nije dokazan aditivni učinak minor alela ( $p=0,53$ ).

## 7.7. Multipla regresijska analiza podataka prema genotipovima

U tablici 10. prikazana je multipla regresijska analiza utjecaja djelovanja prediktora na SAT za ukupnu populaciju i genotipove rs13333226 A/A, A/G i A/G+G/G. Analiza je prilagođena prema dobi, spolu, ITM-u i eGFR-u.

**Tablica 10.** Multipla regresijska analiza za sistolički tlak (SAT)

Nezavisne varijable	Cijela skupina N=496			A/A N=340			A/G N=147			A/G + G/G N=156		
	$\beta$	S.P.	P	$\beta$	S.P.	P	$\beta$	S.P.	P	$\beta$	S.P.	P
Konstanta	97,947			105,56			81,087			80,336		
Muški spol	4,116	0,998	<b>0,001</b>	3,396	1,200	<b>0,005</b>	5,375	1,814	<b>0,004</b>	5,581	1,824	<b>0,003</b>
Dob	0,146	0,046	<b>0,002</b>	0,106	0,052	<b>0,042</b>	0,288	0,098	<b>0,004</b>	0,266	0,099	<b>0,008</b>
ITM	0,467	0,099	<b>0,001</b>	0,433	0,114	<b>0,001</b>	0,544	0,201	<b>0,008</b>	0,557	0,198	<b>0,006</b>
Kolesterol	0,661	0,440	0,134	0,631	0,522	0,227	0,273	0,853	0,750	0,563	0,843	0,505
eGFR	-0,005	0,037	0,892	-0,051	0,044	0,249	0,105	0,067	0,121	0,098	0,067	0,144

ITM – indeks tjelesne mase, eGFR – procijenjena glomerularna filtracija,  $\beta$  – koeficijent regresije, S.P. – standardna pogreška, P – p vrijednosti. Prilagođeno prema dobi, spolu, ITM-u i eGFR-u.

Sistolički tlak bio je značajno pozitivno povezan s muškim spolom, dobi i ITM u cijeloj skupini i u podskupinama A/A, A/G i A/G + G/G. U cijeloj skupini i niti u jednoj od podskupina nije nađena značajna povezanost s ukupnim kolesterolom i procijenjenom glomerularnom filtracijom.

U tablici 11. prikazana je multipla regresijska analiza utjecaja djelovanja prediktora na eGFR za ukupnu populaciju i genotipove rs13333226 A/A, A/G, A/G+G/G. Analiza je prilagođena prema dobi, spolu i ITM.

**Tablica 11.** Multipla regresijska analiza za procijenjenu glomerularnu filtraciju (eGFR).

Nezavisne varijable	Cijela skupina N=496			A/A N=340			A/G N=147			A/G + G/G N=156		
	$\beta$	S.P.	P	$\beta$	S.P.	P	$\beta$	S.P.	P	$\beta$	S.P.	P
Konstanta	148,72			153,44			137,33			138,62		
Muški spol	-11,78	1,130	<b>0,001</b>	-11,505	1,355	<b>0,001</b>	-11,75	2,103	<b>0,001</b>	-12,3	2,053	<b>0,001</b>
Dob	-0,724	0,047	<b>0,001</b>	-0,656	0,054	<b>0,001</b>	-0,915	0,099	<b>0,001</b>	-0,920	0,097	<b>0,001</b>
ITM	-0,384	0,120	<b>0,001</b>	-0,355	0,138	<b>0,011</b>	-0,577	0,252	<b>0,024</b>	-0,486	0,244	<b>0,048</b>
Kolesterol	-0,098	0,543	0,857	-0,285	0,643	0,657	0,588	1,060	0,580	0,408	1,026	0,692
SAT	-0,008	0,056	0,892	-0,051	0,067	0,249	0,162	0,104	0,121	0,145	0,099	0,144

ITM – indeks tjelesne mase, SAT – sistolički arterijski tlak,  $\beta$  – koeficijent regresije, S.P. – standardna pogreška, P – p vrijednosti. Prilagođeno prema dobi, spolu i ITM.

Procijenjena glomerularna filtracija bila je značajno negativno povezana s muškim spolom, dobi i ITM u cijeloj skupini i u podskupinama A/A, A/G i A/G + G/G. U cijeloj skupini i niti u jednoj od podskupina nije nađena značajna povezanost s ukupnim kolesterolom i sistoličkim arterijskim tlakom.

## 8. RASPRAVA

Kod osoba s predhipertenzijom dokazan je povećan rizik razvoja stabilne i trajne hipertenzije i posljedično očekivano veći rizik razvoja bolesti povezanih s visokim AT (4-6,14). Koncept liječenja predhipertenzije obuhvaća primarno sprječavanje ili odgodu razvoja arterijske hipertenzije promjenama loših životnih navika, a današnje smjernice ne navode potrebu medikamentne terapije (1,14). Međutim, to ostavlja otvoreno važno pitanje ostaje li dio osoba s predhipertenzijom neadekvatno liječen kada se zna da je kod njih kardiovaskularni rizik veći nego kod osoba s optimalnim AT. S druge strane, osobe s predhipertenzijom ne tvore homogenu skupinu i nemaju sve osobe s tim vrijednostima AT povećan KV rizik te stoga nema opravdane potrebe uvođenja medikamentne terapije svima. Još ne raspoložemo dijagnostičkim biljegom koji bi bio dovoljno specifičan da bude od koristi kod donošenja odluke koje osobe s predhipertenzijom je opravdano ili čak nužno liječiti antihipertenzivnim lijekovima. Određeni fenotipski pokazatelji, bilo antropometrijski bilo laboratorijski nisu dostatni, tako da se zadnjih godina pažnja usmjerava genima. Otkriće genskih lokusa povezanih s predhipertenzijom omogućilo bi otkrivanje specifičnih pojedinaca s rizičnim genskim varijantama čijim bi se češćim praćenjem ili ranom ciljanom terapijom odgodio nastanak AH i razvoj pridruženih komplikacija čije je liječenje jedno od glavnih opterećenja zdravstvenog sustava diljem svijeta.

U ovom istraživanju analizirali smo u skupini od 496 ispitanika, od kojih je bilo 339 predhipertoničara i 157 normotoničara, povezanost gena za uromodulin s AT i bubrežnom funkcijom. U našoj skupini predhipertoničari su bili stariji od normotoničara, češće muškarci, većeg ITM, i očekivano viših vrijednosti SAT i DAT što je sukladno s navedenim studijama ( $p > 0,001$ ) (39,40). Od biokemijskih parametara vrijednosti ukupnog kolesterola, LDL - kolesterola, HDL - kolesterola i triglicerida bile su značajno više u predhipertoničara u kineskoj studiji, dok je u našoj studiji ta razlika postojala za ukupni kolesterol i LDL - kolesterol, ali ne i za HDL - kolesterol, iako su predhipertoničari imali više srednje vrijednosti (39). Vrijednosti eGFR bile su značajno niže u predhipertoničara u kineskoj studiji što je sukladno našim rezultatima (39). Usporedbom kliničkih i laboratorijskih obilježja naše skupine s drugim istraživanjima možemo zaključiti da naša ispitivana skupina predhipertoničara svojim fenotipskim karakteristikama odgovara drugim skupinama, odnosno da je reprezentativna i primjerena za proučavanje.

U našem istraživanju proučavali smo učestalost genotipova A/A, A/G i G/G i minor alela G u ukupnoj populaciji, te u populaciji normotoničara i predhipertoničara. Dobivena distribucija genotipova u ukupnoj populaciji bila je A/A (N=340, 68,5%), A/G (N=147, 29,6%), G/G (N=9, 1,8%), dok su distribucije genotipova u HapMap populacijama u srednjoeuropskoj (engl. *Central European, CEU*) bile za A/A 67,25%, A/G 30% i G/G 2,65%, u azijskoj HCB za A/A 74,41% i A/G 25,6%, dok je



populacija u afričkoj YRI iznosila za A/A 39,82%, A/G 45,23% i G/G 15,4% (41). Naši rezultati su pokazali učestalost minor alela G od 16,6% (N=165) u ukupnoj populaciji. Ukupna učestalost minor alela (engl. *minor allele frequency*, *minor allele count*, MAF) iznosila je 23,98% (MAF=0,2398/1201) (42). Promatrajući različite populacije učestalost minor alela G iznosila je 20,2% u europskoj (EUR), 33,8% u afričkoj (AFR), 24,9% u američkoj (AMR) i 29,9% u južnoazijskoj (SAS) populaciji 1000 Genomes projekta (42). Proučavanjem različitih populacija uočava se njihova velika genetička heterogenost. Naša populacija je najbliža europskoj (EUR) populaciji po distribuciji minor alela G, odnosno CEU populaciji po distribuciji genotipova što govori u prilog primjerenom uzorkovanju i reprezentativnosti populacije.

Nakon podjele uključenih ispitanika na skupine normotoničara i predhipertoničara, distribucija sva tri genotipa između skupina se nije statistički značajno razlikovala ( $p=0,289$ ). Također nismo uočili značajnu razliku u distribuciji minor alela G u skupinama normotoničara i predhipertoničara ( $p=0,382$ ). Za vrijeme osmišljavanja i pisanja ovog rada nismo našli objavljene rezultate istraživanja koje predočuju rezultate o razlici distribucije genotipova SNP rs13333226 između normotoničara i predhipertoničara, isto kao što nismo našli istraživanja koja istražuju distribuciju minor alela G u tim istim skupinama. Iako za sada ne postoje istraživanja na populaciji predhipertoničara, postoje objavljena istraživanja koja govore o povezanosti promatranog polimorfizma s AH (8-10). Budući da su PHT i AH dio istog kontinuuma, zaključci bi se barem dijelom mogli ekstrapolirati. Jedno od takvih istraživanja je i GWAS studija u kojoj je minor alel G SNP rs13333226 bio je povezan s manjim rizikom za razvoj hipertenzije (OR=0,87; 95%CI=0,84-0,91) nakon prilagodbe za dob i ITM ( $p<0,001$ ) (8). Budući da su u GWAS studiji ispitanici bili hipertoničari raspon AT u našoj populaciji bio je puno manji što može biti jedan od razloga statističke nepovezanosti u našoj studiji.

Analizirajući fenotipska obilježja i udruženost s pojedinim genotipom ili alelom, nismo našli povezanost spola, dobi, DAT, ITM, HDL i triglicerida s raspodjelom genotipova što je sukladno studiji koja je rađena na skupini od 4,798 dijabetičara tipa 2 (43). Također naši rezultati ne ukazuju na povezanost SAT i eGFR, dok su u navedenoj studiji homozigoti A/A imali značajno viši SAT od homozigota G/G i značajno niži eGFR od genotipova G/G i G/A. U našoj populaciji pronašli smo značajnu razliku u vrijednostima ukupnog kolesterola u krvi koje su bile značajno više u heterozigota A/G za razliku od homozigota G/G ( $p=0,008$ ), dok su vrijednosti LDL kolesterola bile značajno više u heterozigota za razliku od oba homozigota ( $p=0,007$ ). U studiji Ahluwale i sur. ukupni kolesterol i HDL kolesterol nije bio statistički značajno povezan s distribucijom po genotipovima. Iako i naši ispitanici genotipa G/G imaju prosječno niži SAT i viši eGFR, njih je u studiji bilo malo (N=9) u odnosu na genotipove A/A (N=340) i A/G (N=147), te nije uočena razlika ( $p>0,05$ ), a i naš uzorak (N=496) je bio manji od uzorka u studiji Ahluwale i sur. (43).

Razlike koje smo dobili mi i drugi autori može se objasniti primarno razlikama u promatranim i analiziranim ispitanicima. Naime, naša skupine su predhipertoničari koji sumarno imaju znatno manji rizik svih komplikacija AH te je stoga kod njih i za očekivati da će povezanost tj. utjecaj pojedine genske varijante biti manje očit. Tome pridonosi i relativno malen broj ispitanika napose u G/G skupini. Ostaje otvoreno pitanje, za neka druga istraživanja, bi li naši rezultati s predhipertoničarima bili sukladni rezultatima na visokorizičnim bolesnicima da su analizirane skupine bile veće. Nadalje, u našoj skupini ispitanika nismo pronašli povezanost niti jednog od ispitivanih polimorfizama s predhipertenzijom. Povezanost smo ispitivali logističkom regresijskom analizom prilagođenom za niz čimbenika rizika i potencijalnih čimbenika zabune (engl. *confounder*) kroz pet modela (kodominatni, dominantni, recesivni, log-aditivni i overdominantni).

Utjecaj promatranih parametara na SAT i eGFR u cijeloj skupini i različitim genotipovima analizirali i smo multiplom regresijskom analizom prilagođenom za potencijalne čimbenike zabune. Multiplom regresijom nismo dobili značajne promjene u povezanosti pojedinih parametara s SAT i eGFR nakon podjele na genotipove A/A, A/G i A/G+G/G.

Iako nije dobivena povezanost genotipova i minor alela G SNP rs13333226 s predhipertenzijom, rezultat našeg istraživanja predstavlja temelj za daljnje proučavanje i proširenje istraživanja. Budući da je povezanost polimorfizma rs13333226 s AT već prikazana na skupinama ispitanika s većim rizikom i većim brojem ispitanika, za očekivati je da u našem istraživanju, koje je kao što je već naglašeno, rađenom na skupini ispitanika s manjim rizikom i uključenim manjim brojem ispitanika je ta povezanost, ako postoji, teže uočljiva. Važnost ovog istraživanje je da je to prvo istraživanje o ulozi jedne od genskih varijanti gena za uromodulin (rs13333226) u predhipertoničara jer uvidom u nama dostupnu literaturu nismo našli niti jedan članak. Negativan rezultat koji smo dobili treba zasigurno provjeriti na većem broju ispitanika s predhipertenzijom ali i uključivanjem neliječanih hipertoničara kod kojih se može očekivati jasnije izražena povezanost ovog polimorfizma s AT. Posebno interesantna skupina su sol-osjetljive osobe kod kojih će biti potrebno u analizu uvesti i određivanje 24-satne natriurije i uromodulina u urinu. Naši dobiveni rezultati svakako su poticaj da se istraživanje nastavi bilo tako da se uzorak ispitanika poveća bilo da se ovi ispitanici nastave pratiti kroz dulji period vremena. Kao svako presječno istraživanje, i naše je ograničeno samim konceptom budući da ne možemo znati učinak koji će u ovom slučaju pojedini polimorfizam rs13333226 imati na klinički tijek pojedinog ispitanika. Moguće je da se ispitivana razlika u distribuciji genotipova i alela pojavi tek kasnije u životu. Ipak, podaci ispitanika su pohranjeni u jedinstvenu bazu podataka te su rezultati ovog istraživanja, kao što je ranije navedeno dobra početna točka za praćenje što je i planirano već na početku istraživanja.

## 9. ZAKLJUČCI

1. U našoj skupini ispitanika istraživani SNP rs13333226 nije statistički značajno odstupao od Hardy-Weinbergova ekvilibrija što dokazuje da je u istraživanoj populaciji prisutan uvjet slučajnog odabira, da nema mutacija, genskog pomaka ili migracije te da nisu primijećeni učinci prirodne selekcije.
2. Distribucija genotipova A/A, G/G, i A/G te distribucija minor alela G se statistički značajno ne razlikuje u skupini normotoničara i predhipertoničara.
3. Logističkom regresijskom analizom utvrdili smo da niti jedan od promatranih genotipova uromodulina nije prediktor predhipertenzije.
4. Sistolički arterijski tlak bio je pozitivno povezan s muškim spolom, dobi i indeksom tjelesne mase u cijeloj skupini i u podskupinama genotipova A/A, A/G i A/G + G/G, dok je procijenjena glomerularna filtracija značajno negativno povezana s muškim spolom, dobi i indeksom tjelesne mase u cijeloj skupini i u podskupinama genotipova A/A, A/G i A/G + G/G. Zaključno, uobičajeni čimbenici rizika kao što su npr. muški spol i pretilost u predhipertoničara utječu na vrijednosti sistoličkog arterijskog tlaka i na vrijednosti procijenjene glomerularne filtracije jednako u svim genotipovima uromodulina.
5. Kako bi se dobio konačan odgovor o ulozi ovog polimorfizma gena za uromodulin na nastavak predhipertenzije potrebno je povećati uzorak ispitanika ne bi li se lakše uočile manje fenotipske promjene. Potrebno je i nastaviti pratiti klinički tijek kako bi se dobio podatak o dinamici tijekom duljeg vremena praćenja.

## **10. ZAHVALA**

Naročitu zahvalnost dugujem mag.med.biochem. Liviji Šimičević kao i prof.dr.sc Nadi Božini, zdrav.lab.teh. Zrinki Mirković, zdrav.lab.teh. Karolini Petrović, bacc.med.lab.diagn. Maji Mezak-Herceg, mag.ing.bioproc.inž. Ani Merkler koje su me naučile labaratorijskim metodama i zajedno sa mnom radile tehnički dio istraživanja. Zahvaljujem i dr. Vanji Ivkoviću na savjetima vezanim uz obradu podataka.

Zahvaljujem svim kolegama i suradnicima koji su sudjelovali u terenskom radu kao i svim ispitanicima koji su se odazvali.

Na koncu zahvaljujem mentoru prof.dr.sc. Bojanu Jelakoviću ponajprije na pruženoj prilici, a zatim savjetima, podršci i vođenju tijekom izrade ovog istraživanja, a ujedno i tijekom posljednjih godina moga sveučilišnog obrazovanja.

## 11. POPIS LITERATURE

- 1) Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M et al. Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension and the European Society of Cardiology. 2013 ESH/ESC Practice Guidelines for the Management of Arterial Hypertension. *Blood Press.* 2014;23(1):3-16.
- 2) WHO Global Health Observatory. World Health Statistics 2015. Geneva, 2015. Dostupno na: [http://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics/2015/en/](http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2015/en/) (pristupljeno 20.4.2016.)
- 3) Hrabak-Žerjavić V, Kralj V, Dika Ž, Jelaković B. Epidemiologija hipertenzije, moždanog udara i infarkta miokarda u Hrvatskoj. *MEDIX.* 2010;16(87/88):102-7.
- 4) Huang Y, Su L, Cai X, Mai W, Wang S, Hu Y et al. Association of all-cause and cardiovascular mortality with prehypertension: a meta-analysis. *Am Heart J.* 2014;167(2):160-68.
- 5) Huang Y, Cai X, Zhang J, Mai W, Wang S, Hu Y et al. Prehypertension and Incidence of ESRD: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis.* 2014;63(1):76-83.
- 6) Huang Y, Cai X, Li Y, Su L, Mai W, Wang S et al. Prehypertension and the risk of stroke: a meta-analysis. *Neurology.* 2014;1;82(13):1153-61.
- 7) Vasani RS, Larson MG, Levo EP, Evans JC, O'Donnell CJ, Kannel WB et al. Impact of high-normal blood pressure on the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 2001;345:1291-7.
- 8) Padmanabhan S, Melander O, Johnson T, Di Blasio AM, Lee WK., Gentilini D, et al. Genome-wide association study of blood pressure extremes identifies variant near UMOD associated with hypertension. *PLoS Genet.* 2010;6(10):e1001177.
- 9) Padmanabhan S, Caulfield M, Dominiczak AF. Genetic and molecular aspects of hypertension. *Circ Res.* 2015;116(6):937-59.
- 10) Köttgen A, Glazer NL, Dehghan A, Hwang SJ, Katz R, Li M, et al. Multiple loci associated with indices of renal function and chronic kidney disease. *Nat Genet.* 2009;41(6):712-7.
- 11) Cui L, Bai Y, Xu J, Zhang J, Zhang H, Zhang S, Zhang W. Single-nucleotide polymorphism of the UMOD promoter is associated with the outcome of chronic kidney disease patients. *Biomed Rep.* 2015;3(4):588-92.
- 12) Cabrera CP, Ng FL, Warren HR, Barnes MR, Munroe PB, Caulfield MJ. Exploring hypertension genome-wide association studies findings and impact on pathophysiology, pathways, and pharmacogenetics. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2015;7(2):73-90.
- 13) Graham LA, Padmanabhan S, Fraser NJ, Kumar S, Bates JM, Raffi HS, et al. Validation of uromodulin as a candidate gene for human essential hypertension. *Hypertension.* 2014;63(3):551-8.
- 14) Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure. The JNC VII report. *JAMA.* 2003;289:2560-72.
- 15) Vasani RS, Larson MG, Leip EP, Kannel WB, Levy D. Assessment of frequency of progression to hypertension in non-hypertensive participants in the Framingham Heart Study: a cohort study. *Lancet.* 2001;358(9294):1682-6.
- 16) Julius S, Nesbitt SD, Egan BM, Weber MA, Michelson EL, Kaciroti N, et al; Trial of Preventing Hypertension (TROPHY) Study Investigators. Feasibility of treating prehypertension with an angiotensin-receptor blocker. *N Engl J Med.* 2006;354(16):1685-97.
- 17) Egan BM, Stevens-Fabry S. Prehypertension--prevalence, health risks, and management strategies. *Nat Rev Cardiol.* 2015;12(5):289-300.
- 18) Jelaković B, Željčević-Vrkić Ž, Pećin I. Arterial hypertension in Croatia: results of EH-UH study. *Acta Med Croatica.* 2007;61(3):287-92.
- 19) Wang Y, Wang QJ. The prevalence of prehypertension and hypertension among US adults according to the new joint national committee guidelines: new challenges of the old problem. *Arch Intern Med.* 2004;164(19):2126-34.
- 20) Trudu M, Janas S, Lanzani C, Debaix H, Schaeffer C, Ikehata M, et al; Common noncoding UMOD gene variants induce salt-sensitive hypertension and kidney damage by increasing uromodulin expression. *Nat Med.* 2013;19(12):1655-60.
- 21) Padmanabhan S, Graham L, Ferreri NR, Graham D, McBride M, Dominiczak AF. Uromodulin, an emerging novel pathway for blood pressure regulation and hypertension. *Hypertension.* 2014;64(5):918-23.
- 22) Vyletal P, Bleyer AJ, Kmoch S. Uromodulin biology and pathophysiology - An update. *Kidney Blood Press. Res.* 2010;33(6):456-75.
- 23) Peach RJ, Day WA, Ellingsen PJ, McGiven AR. Ultrastructural localization of Tamm-Horsfall protein in human kidney using immunogold electron microscopy. *Histochem. J.* 1988;20,156-164.

- 24) Sikri KL., Foster CL., MacHugh N, Marshall RD. Localization of Tamm-Horsfall glycoprotein in the human kidney using immuno-fluorescence and immuno-electron microscopical techniques. *J. Anat.* 1981;132(Pt 4):597-605.
- 25) Fukuoka S, Kobayashi K. Analysis of the C-terminal structure of urinary Tamm- Horsfall protein reveals that the release of the glycosyl phosphatidylinositol-anchored counterpart from the kidney occurs by phenylalanine-specific proteolysis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;289(5):1044-8.
- 26) Zaucke F, et al. Uromodulin is expressed in renal primary cilia and UMOD mutations result in decreased ciliary uromodulin expression. *Hum Mol Genet.* 2010;19(10):1985–1997.
- 27) Pak J, Pu Y, Zhang ZT, Hasty DL, Wu XR. Tamm-Horsfall Protein Binds to Type 1 Fimbriated *Escherichia coli* and Prevents *E. coli* from Binding to Uroplakin Ia and Ib Receptors. *J Biol Chem.* 2001;276(13):9924-30.
- 28) Bates JM, Raffi HM, Prasad K, Mascarenhas R, Laszik Z, Maeda N, et al. Tamm-Horsfall protein knockout mice are more prone to urinary tract infection. *Kidney Int.* 2004;65(3):791-7.
- 29) Raffi HS, Bates JM Jr, Laszik Z, Kumar S. Tamm-Horsfall Protein Acts as a General Host-Defense Factor against Bacterial Cystitis. *Am J Nephrol* 2005;25(6):570-8.
- 30) Kumar V, De La Vega LP, Farrell G, Lieske JC. Urinary macromolecular inhibition of crystal adhesion to renal epithelial cells is impaired in male stone formers. *Kidney Int.* 2005;68(4):1784-92.
- 31) Beshensky AM, Wesson JA, Worcester EM, Sorokina EJ, Snyder CJ, Kleinman JG. Effects of urinary macromolecules on hydroxyapatite crystal formation. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(10):2108-16.
- 32) Battula S, Hao S, Pedraza PL, Stier CT, Ferreri NR. Tumor necrosis factor- $\alpha$  is an endogenous inhibitor of  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  cotransporter (NKCC2) isoform A in the thick ascending limb *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011;301(1): F94–F100.
- 33) Turner JJ, Stacey JM, Harding B, Kotanko P, Lhotta K, Puig JG et al. UROMODULIN mutations cause familial juvenile hyperuricemic nephropathy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003;88(3):1398-401.
- 34) Hart TC, Gorry MC, Hart PS, Woodard AS, Shihabi Z, Sandhu J, et al. Mutations of the UMOD gene are responsible for medullary cystic kidney disease 2 and familial juvenile hyperuricaemic nephropathy. *J Med Genet.* 2002;39(12): 882–892.
- 35) Eckardt KU, Alper SL, Antignac C, Bleyer AJ, Chauveau D, Dahan K, et al. Autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease: diagnosis, classification, and management – A KDIGO consensus report. *Kidney Int.* 2015;88(4):676-83.
- 36) Munroe PB, Barnes MR, Caulfield M.J. Advances in blood pressure genomics. *Circ Res.* 2013;112(10):1365-79.
- 37) Clarke GM, Anderson CA, Pettersson FH, Cardon LR, Morris AP, Zondervan KT. Basic statistical analysis in genetic case-control studies. *Nat Protoc.* 2011;6:121–33
- 38) Lettre G, Lange C, Hirschhorn JN. Genetic model testing and statistical power in population-based association studies of quantitative traits. *Genet Epidemiol.* 2007;31:358–62.
- 39) Xue H, Wang J, Hou J, Li J, Gao J, Chen S, et al. Prehypertension and Chronic Kidney Disease in Chinese Population: Four-Year Follow-Up Study. *PLoS One.* 2015;10(12):e0144438.
- 40) Qureshi AI, Suri MF, Kirmani JF, Divani AA, Mohammad Y. Is prehypertension a risk factor for cardiovascular diseases? *Stroke.* 2005;36(9):1859-63.
- 41) International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature.* 2003;426(6968):789-96.
- 42) 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation. *Nature.* 2015;526(7571):68-74.
- 43) Ahluwalia TS, Lindholm E, Groop L, Melander O. Uromodulin gene variant is associated with type 2 diabetic nephropathy. *J Hypertens.* 2011;29(9):1731-4.

## 12. ŽIVOTOPIS

Zovem se Krešimir Đapić. Student sam šeste godine Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Završio sam Nadbiskupsku Klasičnu Gimnaziju. Demonstrator sam na katedri za Internu medicinu u sklopu predmeta „Klinička Propedeutika“ na Zavodu za nefrologiju, hipertenziju, dijalizu i transplantaciju Klinike za unutrašnje bolesti, Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Aktivno sudjelujem na znanstvenom projektu Hrvatskog društva za hipertenziju „Hrvatski registar kontinuiranog mjerenja arterijskog tlaka (HRKMAT)“ i znanstveno-istraživačkom projektu “Endemska nefropatija u Hrvatskoj: epidemiologija, dijagnostika i etiopatogeneza”. Za rad Kontinuirano mjerenje arterijskog tlaka – značajan doprinos kvalitetnijem liječenju hipertoničara zajedno s kolegama Viktorom Domislovićem i Ilijom Jurićem nagrađen sam Dekanovom nagradom za znanstveni rad. Za projekt “Ljetna škole hitne medicine u Dubrovniku” kao član organizacijskog odbora zajedno s kolegama nagrađen sam Rektorovom nagradom. Član sam studentske udruge EMSA Zagreb i SSSLZ. Moja područja interesa su Interna medicina, nefrologija, hipertenzija i znanost općenito.