

Polimorfizmi gena uključenih u proces fibrinolize kao rizični čimbenici u multiploj sklerozi

Klupka-Šarić, Inge

Doctoral thesis / Disertacija

2011

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:188:081646>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#)/[Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-30**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



1. UVOD

1.1. Multipla skleroza

Multipla skleroza (engl. multiple sclerosis - MS) je kronična autoimuna, upalna, demijelinizacijska i degenerativna bolest središnjeg živčanog sustava (SŽS). Obično počinje u dobi od dvadesete do četrdesete godina života i predstavlja vodeći uzrok onesposobljenosti kod mladih ljudi. Žene oboljevaju češće od muškaraca. Bolest se najčešće manifestira povremenom pojavom neuroloških simptoma i znakova (relapsno-remitirajući tijek) ili, rjeđe postepenim pogoršanjem istih (progresivni tijek). Prema težini bolesti razlikujemo benigni i maligni oblik (1).

Simptomi bolesti posljedica su pojave upalnih demijelinizacijskih lezija u bijeloj masi SŽS, oštećenja moždane kore i dubokih sivih masa (moždanih jezgara). Vrsta i izraženost neurološke disfunkcije ovisi o broju, lokalizaciji i veličini demijelinizacijskih lezija, stupnju oštećenja moždane kore i moždanih jezgara.

Uzrok bolesti je još uvijek nepoznat, mada je zadnjih godina učinjen značajan napredak u razumijevanju epidemiologije i patofiziologije oboljenja što ima značajne praktične implikacije na unaprijeđenju terapijskih mogućnosti (2-3).

1.1.1. Epidemiologija multiple skleroze

Neravnomjerna rasprostranjenost MS u svijetu poznata je već više od osamdeset godina. Nakon prvog svjetskog rata, 1922. godine Davenport (4) je objavio veću učestalost MS u veterana američke vojske iz sjevernih država SAD-a u odnosu na one iz južnih.

Najranije analize rasprostranjenosti MS potiču iz 1950. godine kada je Lindberg (5), proučavajući stopu mortaliteta, utvrdio da je ista viša u zemljama s umjerenom klimom u odnosu na tropska područja. Od tada pa do danas su brojne studije prevalencije i incidencije MS dale jasnu sliku zemljopisne rasprostranjenosti MS u svijetu. Na osnovu toga, učinjena je podjela u kojoj se razlikuju zone visokog, srednjeg i niskog rizika za oboljevanje od MS (6). U zonu visokog rizika uključena su područja sjeverne Europe, sjeverne Amerike, Kanada, južna Australija i Novi Zeland. Područja umjerenog rizika su južna Europa, južna Amerika i sjeverna Australija, a područjima niskog rizika pripadaju južna Amerika i Azija (7). Općenito, prevalencija MS raste s udaljavanjem od ekvatora prema polovima i kreće se od $5-10/10^5$ stanovnika u tropima do $150-200/10^5$ stanovnika u sjevernoj Americi i Kanadi. Najnižu prevalenciju imaju Kina, Koreja i Malezija gdje iznosi $1-3/10^5$ stanovnika (6).

Takva rasprostranjenost je dijelom posljedica genetičkih i etničkih varijacija u svjetskoj populaciji. Međutim, u regionima s relativno homogenom populacijom, prevalencija značajno ovisi o zemljopisnoj širini. Povezanost prevalencije MS i geografske širine uočena je i u većini europskih zemalja. Međutim, u nekim zemljama poput Norveške, život u priobalnom području, iako visoke geografske širine, nije povezan s visokim rizikom oboljevanja od MS. To se objašnjava vjerovatnim prisustvom protektivnih okolišnih čimbenika koji utječu na učestalost oboljevanja (7-8).

Posebna pažnja istraživača usmjerena su na manja područja u kojima je prevalencija znatno viša od one u njihovom okruženju. Ta područja nazivamo žarištima (engl. cluster) u prostornom smislu (9). Do sada su u Europi opisane četiri zone visokog rizika sa značajno višom prevalencijom MS: Orkney otoci u sjevernoj Škotskoj ($250/10^5$), Shetland otoci u sjeveroistocnoj Škotskoj ($100/10^5$), Sardinija

(102/10⁵), te područje Gorskog kotara i Kočevja s prevalencijom od 151,9/10⁵ (10-12). Smatra se da takva područja predstavljaju posebno intrigantne modele za istraživanje uzroka MS.

Sličnu ulogu bi mogla imati i vremenska žarišta, odnosno porast incidencije oboljevanja u određenom vremenskom periodu. JF.Kurtzke i saradnici (13) su objavili pojavu "epidemije" MS na Farskim otocima nakon Britanske okupacije 1940. Godine. Taj podatak, kao i drugi podaci u svezi vremenskih žarišta, su još uvijek sporni, te uzrok takvim pojavama porasta incidencije bolesti do danas nije razjašnjen (14-17).

Rijetka pojava MS među Samićanima, Turkmencima, Uzbekistancima, Kazahstancima, Kirgizima, nativnim Sibircima, američkim Indijancima, Kinezima, Japancima, afričkim crncima i novozelandskim Maorima, kao i visok rizik oboljevanja među stanovnicima Sardinije, Parsima i Palestincima, nedvojbeno upućuje da su različita rasna i etnička podložnost za MS značajne odrednice nejednake zemljopisne distribucije bolesti (7,18).

Tako je i najveća prevalencija MS od 100/10⁵ utvrđena u populacijama podrijetlom iz sjeverne Europe, kao što je slučaj u Skandinaviji, na Britanskom otočju, sjevernoj regiji SAD i jugu Kanade (19).

Bolest se pak javlja sa znatno nižom učestalošću u područjima pretežno naseljenim stanovništvom ostalih rasa (Orijent, Indija, Arapske zemlje, Južna Amerika i Afrika). Tako je u Sjevernoj Americi bolest učestala u dijelovima naseljenim stanovništvom skandinavskog podrijetla, a rijetka među pripadnicima crne rase, ili pak u američkih Indijanaca. U Africi MS je rijetka u pripadnika crne rase, a relativno česta u stanovnika europskog podrijetla (7,18).

Slično tome u Australiji i na Novom Zelandu bolest se vrlo rijetko javlja u Aboridžina i Maora, nasuprot visokoj učestalosti među osobama bijele rase.

Prevalencija MS niska je ($5/10^5$) u Arapa, a bolest gotovo da i nije dijagnosticirana u mađarskih Roma, Laponaca i Eskima (20).

Iz navedenih podataka uočava se da se bolest javlja s većom učestalošću u onim područjima gdje je visoka frekvencija gena iz sjevernoeuropskih ili skandinavskih populacija, što ukazuje na genetičku predispoziciju u razvoju bolesti. Poser (21) je objavio teoriju o raširenosti bolesti, koja pretpostavlja da su Vikinzi imali odlučujuću ulogu u diseminaciji genetičke podložnosti za MS širom svijeta, budući da su krajem VIII. i početkom IX. stoljeća izvršili prodor u većinu europskih zemalja, naselili se na udaljena područja, trgovali duž riječnih putova, te prodrli u Perziju, Indiju i, vjerojatno, Kinu.

Također, značajnu ulogu u ispitivanju etiologije MS imaju migracione studije koje su pokazale da osobe koje su migrirale iz područja visokog u područje niskog rizika za MS "nose sa sobom" rizik oboljevanja ako su migrirale nakon puberteta ili preuzimaju rizik nove destinacije ukoliko su migrirale prije puberteta. Ta činjenica osim što ukazuje na utjecaj čimbenika okoliša govori i o "kritičnom vremenu" kada uzročnik bolesti djeluje. U slučajevima preseljenja iz zone niskog u zonu visokog rizika dokazi o prihvatanju ili neprihvatanju rizika oboljevanja nove destinacije su još uvijek dvojbeni (22-25).

Osim geografskih varijacija u rasprostranjenosti MS, kao i varijacija vezanih za rasnu i etničku pripadnost, postoje i razlike u pogledu dobi i spola. Tako je početak bolesti najčešće u dobi između dvadesete i tridesete godine života. Kod skoro 70% bolesnika bolest počinje od dvadesetprve do četrdesete godine života. Bolest rijetko počinje prije desete i nakon šezdesete godine života. Kao i kod drugih autoimunih oboljenja, žene oboljevaju češće od muškaraca (1,4 do 3,1 i više) (26-27).

1.1.2. Klinička slika, tijek i prognoza multiple skleroze

MS karakterizira raznolikost simptoma i nepredvidljivost tijeka. Unatoč tomu bolest ipak pokazuje određene pravilnosti ako se prati kroz duže vremensko razdoblje tako da većinu bolesnika možemo svrstati u jednu od tri glavne skupine.

Najčešće se prezentira u vidu ataka neurološke disfunkcije koja se razvija nekoliko dana do mjesec dana (relaps), a potom se djelomično ili potpuno povlači u narednih nekoliko tjedana ili mjeseci (remisija). Učestalost napada i trajanje remisija varira od bolesnika do bolesnika. Opisani tijek oboljenja nazivamo relapsno-remitirajući (RR) i predstavlja najčešći klinički oblik oboljenja. Prisutan je u 80% bolesnika u prvih 10-20 godina trajanja bolesti. U oko polovice bolesnika s ovakvim tijekom bolesti isti vremenom prelazi u sekundarno progresivni (SP) oblik, kad nakon faza pogoršanja ne slijedi potpun oporavak, već su oštećenja postupno sve veća i postoji kontinuirana progresija bolesti s kratkim razdobljima poboljšanja ili stabilizacije (1,3).

Najrjeđi je primarno progresivni oblik (PP) kod kojeg je od početka bolesti prisutna stalna progresija deficita bez faza poboljšanja i pogoršanja. Ponekad bolest može imati benigni tijek s izoliranim atakama bolesti, bez trajnih oštećenja i nakon dugog niza godina. Rijetki su slučajevi perakutnog tijeka bolesti, kada bolesnici umiru nekoliko tjedana nakon prvih manifestacija simptoma (6).

Prosječno trajanje bolesti iznosi 20-30 godina. Pomoć pri hodanju u otprilike 50% bolesnika s RR tijekom bolesti potrebna je za desetak godina od početka bolesti. Ukupno gledajući, polovica oboljelih postaje invalidna u roku od 5-6 godina, a ovisna o drugima nakon 15-20 godina (28).

Simptomi MS ovise o lokalizaciji demijelinizacijskih lezija. One su najprisutnije u bijeloj masi mozga i kralježične moždine. U zadnje vrijeme je, napretkom radioloških tehnika, utvrđeno da su prisutne i u sivoj masi mozga. Na početku bolesti najčešće se javljaju vidni, osjetni i piramidni znaci. Rjeđe su prisutni znaci moždanog debla, malog mozga i sfinkterijalne smetnje. Neke MS lezije mogu izazvati pojačane električne impulse koje posljedično izazivaju "pozitivne" ili paroksizmalne simptome. Priroda tih simptoma ovisi o lokalizaciji lezija. Kortikalno locirane lezije mogu izazvati epileptičke napadaje, lezije u moždanom deblu neuralgiju trigeminalnog živca, facijalnu miokimiju i paroksizmalnu ataksiju. Za razliku od žarišnih neuroloških simptoma i znakova, kognitivne smetnje izgleda koreliraju sa stupnjem kortikalne atrofije, ali i s ukupnim brojem demijelinizirajućih lezija. Rijetko se javljaju na početku bolesti, da bi se u kasnijem tijeku javljale kod 30 do 60% bolesnika i ispoljavale kao smetnje pamćenja, apstraktnog mišljenja, pažnje, kao i brzine procesiranja informacija. Jedan od čestih simptoma je pojačan, neobjašnjiv umor (fatigue), koji se javlja u oko 40% bolesnika i predstavlja značajnu smetnju u svakodnevnom životu (29).

1.1.3. Dijagnoza multiple skleroze

Dijagnoza MS se postavlja na osnovu kliničke slike i neurološkog nalaza koji ukazuju na oštećenje živčanog sustava i tijeka oboljenja koji pokazuje "širenje u vremenu i prostoru". Dokaz o postojanju lezija unutar SŽS-a omogućuje MRI mozga i kralježične moždine i nalaz evociranih potencijala. Dokaz intratekalne sinteze IgG i oligoklonih traka IgG u cerebrospinalnom likvoru doprinosi dijagnozi MS. Prije postavljanja dijagnoze MS potrebno je isključiti oboljenja koja prema kliničkoj slici i

nalazu neuroradioloških pretraga podsjećaju na MS. Prilikom postavljanja dijagnoze MS primjenjuju se važeći dijagnostički kriteriji (u zadnje vrijeme McDonald-ovi kriteriji, revizija 2005.) (30).

Diferencijalno-dijagnostičke poteškoće stvaraju oboljenja koja su prema kliničkoj slici, tijeku oboljenja i neuroradiološkom nalazu slična MS, kao sistemski eritemski lupus, Sjögrenov sindrom, sarkoidoza, Lymeova bolest, antifosfolipidni sindrom, neurosifilis, AIDS, Wippleova bolest, HTLV-1 vezana mijelopatija, cerebrovaskularne bolesti (status lacunaris), CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy), vaskularne malformacije, Moyamoya bolest, cerebralni limfomi, mitohondrijske bolesti, funikularna mijelopatija, adrenoleukodistrofija s nastupom u odrasloj dobi, druge genetske leukodistrofije s povremenim nastupom u odrasloj dobi, borelioza, bruceloza, infekcije neurotrofnim virusima i posebno ADEM (akutni diseminirani encefalomijelitis (1, 31).

1.1.4. Patologija i patofiziologija multiple skleroze

Dokazano je da su infiltracija upalnih stanica, demijelinizacija i aksonska degeneracija osnovni patološki mehanizmi koji uzrokuju kliničke manifestacije MS. Aktiviranje autoimune upale koja dovodi do oštećenja mijelinske ovojnice aksona, a dijelom i samog aksona, nastaje djelovanjem još neidentificiranog okolišnog čimbenika na genetski predisponiranu osobu. Dok je autoimuni upalni proces uglavnom razjašnjen, neurodegenerativni još uvijek nije. Donedavno je smatrano da neurodegeneracija slijedi nakon autoimune upalne faze, ali je u zadnje vrijeme, koristeći suvremenije dijagnostičke pretrage, ustanovljeno da i jedan i drugi proces

teku od samog početka bolesti s tim da je upalni proces dominantniji na početku, a neurodegenerativni sve izrazitiji u kasnijoj fazi oboljenja (32-33).

Upalni proces započinje proliferacijom, aktivacijom i ulaskom autoreaktivnih T limfocita u cirkulaciju. Aktivirani T limfociti uzrokuju promjenu endotela (ekspresija adhezivnih molekula) krvno-moždane barijere nakon čega dolazi do njihovog ulaska u SŽS. U tom procesu sudjeluje niz različitih molekula, kao i kemokini koji privlače upalne stanice, adhezijske stanice koje omogućavaju imunoendotelijalnu interakciju, te metalproteinaze koje omogućuju migraciju imunih stanica parenhimom SŽS (33-35).

Nastalom upalnom reakcijom dolazi do oštećenja mijelinskog omotača, a dijelom i samog aksona. Na mjestu oštećenja nastane akutna, a potom kronična demijelinizacijska lezija ili plak. U ranoj fazi nastanka lezije se patomorfološki sastoje od perivaskularne infiltracije (limfocita i makrofaga) uz demijelinizirani dio aksona. Starije lezije pokazuju degenerativne promjene samog aksona.

Do nedavno je smatrano da su lezije raspoređene samo u bijeloj masi cerebralnih hemisfera, u cerebelumu, meduli spinalis i očnom živcu, a danas je poznato da je oko 25% lezija smješteno u dubokim sivim masama i kori mozga, čak i unutar retine. Osnovna karakteristika lezija u MS je tzv. pojava "širenja u vremenu i prostoru" što je u skladu s kliničkom slikom i tijekom oboljenja (29).

U lezijama nastaje remijelinizacija koja je većinom nepotpuna, a zapaženo je i remodeliranje živčanih vlakana u smislu promjene uobičajenih karakteristika živčanih vlakana, ali i redistribucije jonskih kanalića kao odgovor na gubitak uobičajene mijelinske potpore. Poremećaj skokovite kondukcije uzrokovane demijelinizacijom objašnjava brojne kliničke simptome u MS (36).

1. 1. 5. Etiologija multiple skleroze

Unatoč intenzivnom istraživanju u zadnjih pedeset godina uzrok oboljevanja od MS do sada nije razjašnjen. Opsežne epidemiološke studije širom svijeta rezultirale su dvjema pretpostavkama. Prva pretpostavlja da je MS bolest uvjetovana uticajem čimbenika okoliša na pojedinca, ne negirajući pri tom genetsku predispoziciju. Druga (genetska) pretpostavka tvrdi da geni, koji vjerovatno reguliraju funkciju imuniteta, određuju podložnost oboljevanju od MS. Ta pretpostavka ne poriče važnost okolišnih čimbenika kao pokretača razvoja MS u predisponiranih pojedinaca (3).

U prilog okolišne pretpostavke govore sljedeće činjenice:

- Zemljopisna rasprostranjenost MS u svijetu je neravnomjerna
- Jasna povezanost učestalosti bolesti i zemljopisne širine
- Incidencija se mijenja u relativno kratkim vremenskim intervalima za što je vjerovatnija promjena sredine nego genske mutacije
- Migracije u predpubertetsko doba mijenjaju podložnost MS u potomaka migranata čiji se morbiditet bitno razlikuje od morbiditeta njihovih predaka
- Postojanje vremenskih i prostornih žarišta (cluster)
- Opisani primjeri spornih epidemija (37-40)

U prilog genetske pretpostavke za nastanak MS govore sljedeće činjenice:

- Postojanje varijacija u oboljevanju unutar istog zemljopisnog područja. Tako npr. određene populacije rijetko ili gotovo nikako ne oboljevaju od MS čak iako žive u području visokog rizika (18, 41-42)
- Pripadnici bijele rase oboljevaju češće od pripadnika drugih rasa
- Povećan rizik oboljevanja kod članova obitelji MS bolesnika
- Znatno veća konkordantnost u monozigotnih u odnosu na dizigotne blizance (43-45)

Na temelju svih navedenih istraživanja danas se smatra da je MS složena bolest koja je uzrokovana genetičko-okolišnim međudjelovanjem, premda još uvijek postoje određena razilaženja glede relativnog značaja uzročnih faktora i prirode njihove interakcije (29).

Pod pojmom okolišnih čimbenika podrazumijevamo niz područja koja se međusobno prožimaju. Ta se područja često određuju kao geoklimatsko ili sociokulturno područje. Najčešće ispitivani okolišni čimbenici su infekcije, vakcinacije, stres, zanimanje, klima, geološka obilježja i način prehrane. Iako do sada nije otkriven okolišni čimbenik ili čimbenici koji se sa sigurnošću mogu povezati s nastankom MS, dosadašnja istraživanja najviše ukazuju na virusnu etiologiju (46-47). Pritom se može raditi o potencijalno izravnom djelovanju nekog virusa ili o neizravnoj, unakrsnoj reakciji s neuralnim antigenom tzv. molekularnoj mimikriji. Učinak takvog djelovanja ovisi o individualnoj reakciji imunskog sustava. Zbog zamjene peptida tj. antigena virusa s vlastitim antigenom mijelinske ovojnice, u predisponiranih osoba započinje autoimuni upalni proces koji oštećuje mijelin (36).

1.1.6. Genetika multiple skleroze

Dosadašnja genetičko-epidemiološka istraživanja MS ukazala su da je u pitanju bolest multifaktorijalne etiologije u kojoj genetički faktori određuju predispoziciju za bolest (48).

1.1.6.1. Familijarna multipla skleroza

Ispitivanja pojave MS u srodnika bolesnika (blizanaca, braće i sestara, roditelja i daljnjih srodnika) su pokazala da se sklonost za MS kod pojedinca povećava ako u obitelji ima bolesnog člana. Oko 15-20% bolesnika u svojoj bližoj ili daljnjoj rodbini ima oboljelog od MS i u većini slučajeva radi se o dvoje do troje oboljelih unutar jedne obitelji (49).

Studije koje su ispitivale učestalost među srođnicima oboljelih osoba utvrdile su da najčešće obolijevaju braća i sestre bolesnika (rizik 4%), što može biti posljedica konasljeđivanja faktora podložnosti, ali i dijeljenja zajedničkih okolišnih čimbenika tijekom djetinjstva. Rizik za djecu bolesnika iznosi 2%, dok srođnici drugog stupnja srodnosti imaju rizik javljanja bolesti oko 1% (20,49).

Prema Galtonu (50) razlikovanje relativnog doprinosa genetičkih i okolišnih čimbenika u multifaktorijalnim bolestima omogućuju studije blizanaca, a usporedba konkordantnih stopa između monozigotnih i dizigotnih parova omogućava procjenu specifično genetičkih čimbenika u etiologiji bolesti. Ako je jedan od blizanaca obolio od MS, mogućnost da oboli i drugi u prosjeku je 25-30% kod jednojajčanih i 3% u dvojajčanih blizanaca. Navedena visoka stopa podudarnosti bolesti u monozigotnih blizanaca u usporedbi s dizigotnim blizancima potvrđena je u više populacijskih

studija, dok su novija istraživanja u više od polovice blizanačkih parova otkrila demijelinizacijske asimptomatske lezije u blizanca koji nije obolio od MS (51).

Do sada su provedana svega dva sustavna istraživanja učestalosti MS u potomaka konjugalnih parova (52-53). U oba istraživanja rizik za potomke roditelja koji oboje boluju od MS značajno je viši (30,5%) negoli u onih potomaka kojima je samo jedan od roditelja obolio (2%). Konsangvinitet je rijedak među pripadnicima bijele rase i, koliko je poznato, samo je jedno populacijsko istraživanje rizika u potomaka provedeno u slučaju MS (54). Rezultati, iako dobiveni na malom uzorku, pokazuju da je rizik gotovo četiri puta veći za braću i sestre MS bolesnika čiji su roditelji prvi rođaci (51).

Rezultati studija adoptiranih bolesnika nedvojbeno pokazuju da usvojena djeca, iako od ranog djetinjstva odgojeni u MS bolesnika, nemaju povećan rizik za MS u odnosu na rizik opće populacije, što ukazuje da je obiteljska MS povezana s dijeljenjem zajedničkih gena prije negoli s dijeljenjem zajedničkog okoliša.

1.1.6.2. Genetička podložnost za multiplu sklerozu

Genetičke studije MS su ukazale da je u pitanju poligenška bolest u kojoj geni, djelujući neovisno ili epistatski, determiniraju podložnost za oboljevanje (48).

Nastojanja da se utvrde geni združeni s patogenezoj MS, ili pak oni koji utječu na klinički tijek bolesti, zasnivaju se uglavnom na funkcionalnim istraživanjima gena kandidata, genomskom probiru vezanosti (engl. linkage genome screen), te s njime povezanim studijama mapiranja gena kandidata, a u novije vrijeme provode se i genomska istraživanja genske ekspresije uz pomoć mikročipova (49,56).

Funkcionalna istraživanja gena kandidata temelje se na njihovoj potencijalnoj biološkoj važnosti u razvoju bolesti. Zbog autoimunog karaktera MS pokušaji identificiranja gena kandidata zasnivali su se uglavnom na istraživanju polimorfnih gena čiji su produkti uključeni u imunološki odgovor. Istraživanja mogućih gena kandidata, kao što su geni glavnog sustava tkivne podudarnosti (engl. human leukocyte antigen-HLA), T-stanični receptorni geni (engl. T-cell receptor gene - TCR), čimbenik nekroze tumora (engl. Tumor necrosis factor - TNF), geni za citokine, kemokine, mijelinski antigeni i imunoglobulinski geni, uglavnom nisu pokazala očekivani genetički utjecaj ovih gena na podložnost za MS (57-61).

Naime, s iznimkom HLA regije, brojni rezultati dobiveni za različite gene najčešće nisu ponovljeni u kasnijim neovisnim istraživanjima. Tako je npr. mijelin bazični protein (MBP) lociran na kromosomu 18q22-q23, koji je važan element u sustavu sintetiziranja mijelina, te ima ulogu u održavanju stabilnosti mijelina i inicijaciji remijelinizacije, pokazao pozitivnu korelaciju s MS u studijama provedenim u genetički izoliranoj finskoj populaciji, međutim rezultati nisu potvrđeni u drugim populacijama, što se može objasniti genetičkom i etiološkom heterogenosti u MS (62-63).

Također, geni kandidati ispitivani u eksperimentalnom encefalomijelitisu (engl. experimental encephalomyelitis-EAE), mišjem modelu MS, također su dali nekonzistentne rezultate (64-65).

HLA regija najpolimorfnije je genski sustav u čovjeka lokaliziran na 6q21.1-21.3, a povezuje se s čitavim nizom, najčešće autoimunih bolesti. Ipak, u ovoj regiji nalaze se i drugi geni koji nisu izravno povezani s imunološkim odgovorom. Danas se HLA regija, koja se proteže na 4,5 Mb i sadrži dvjestotinjak gena najčešće

uključenih u regulaciju razvoja i sazrijevanja T-stanica, kao i u različite imunološke procese, nedvojbeno povezuje s MS (66).

Medutim, identifikacija uzročnih alela i dokazivanje prezentacije antigena direktno povezanih s MS odvija se sporo. Iako je najprije prijavljena združenost HLA klase I antigena A3 i B7 s MS, daljnja istraživanja utvrdila su jaču povezanost HLA klase II antigena DR15 i DQ6 s polimorfizmima Dw2 i DR2. U svakom slučaju, HLA uzorci u MS bolesnika razlikuju se od onih u zdravih osoba. Istraživanja provedena u sjevernoj Europi i Americi detektirala su tri HLA varijante koje se češće javljaju u MS bolesnika negoli u općoj populaciji. Tako čvrstu asocijaciju s 2 - 4 puta većim relativnim rizikom bolesti pokazuje HLA DRB1*1501, DQA1*0102 i DQB1*0602 haplotip. Medutim, jaku neravnotežu vezanosti gena (engl. linkage disequilibrium-LD) u ovoj regiji otežava utvrđivanje specifične podložnosti s obzirom da se u sjevernoeuropskim populacijama HLA DRB1*1501, DQA1*0102 i DQB1*0602 gotovo uvijek javljaju zajedno (62).

Studije genomskog probira vezanosti izdvojile su takođe HLA regiju kao jedinu jasno povezanu s MS (49).

Izgleda da povezanost s HLA-DR2 alelom objašnjava signal u ovom probiru, ali točan mehanizam kojim gen ili geni utječu na rizik za bolest tek treba utvrditi. Nekoliko populacija koje nisu podrijetlom iz sjeverne Europe imaju različite DRB1 asocijacije s MS. Tako je u bolesnika sa Sardinije utvrđena povezanost s DRB1*1501 i s DRB1*0301 (DRB1*17) i DRB1*0405 alelima, na Kanarskim otocima i u Turskoj s DR4 alelom. U američkih Afrikanaca koji boluju od MS utvrđen je DQB1*0602-DQA1*0102 genotip prisutan na DRB1*1501 haplotipu, kao i DRB1*1503 i DRB1*1101 koji nosi DQ6 haplotip. Iako su lokusi DR15 i DQ6 usko vezani, pa se

crossing-over između njih rijetko događa, nedavna istraživanja u ovoj populaciji ukazuju da su geni podložnosti za MS smješteni bliže DQ negoli DR genima (51, 49).

Ispitivanje MS i antigena HLA sustava u Gorskom kotaru ukazalo je da se autohtoni MS bolesnici razlikuju od kontrola za antigen DR2, te da imaju povišen rizik za antigene A1 (RR=2,39). Genska analiza pak izdvojila je prvenstveno DRB1*15, ali i DRB1*04, DQB1*0303 i DQB1*0602 kao rizične alele (67).

Spoznaja da se klinički fenotip MS i prisutnost oligoklonskih područja u spinalnoj tekućini mogu pojaviti i u svezi s patološkim mutacijama u mitohondrijskoj DNA potaklo je detaljnu procjenu mitohondrijskih gena kao kandidata za podložnost u MS, ali niti jedna mutacija niti polimorfizam nisu pokazali povezanost s MS u sistemskom probiru neselektiranih bolesnika.

S druge strane, inicijalne studije genomskog probira koje traže genetičku povezanost svojstva i polimorfnih markera u cijelom genomu identificirale su više od 70 lokusa podložnosti. Međutim, samo su neke regije, uključujući 6p21, 3q21-22, 18p11, 17q22-24, 17p11 i 19q13, potvrđene u dva ili više istraživanja (62).

Unatoč većem broju studija vezanosti provedenih na razini cijelog genoma, očekivani genetički doprinos u razjašnjavanju MS nije postignut. Studije genomskog probira pokazuju nedovoljnu statističku snagu, čemu pridonosi i ipak podcijenjena genetička složenost bolesti.

1.2. Hemostaza i fibrinoliza

Hemostaza je proces zaustavljanja krvarenja na mjestu ozljede krvne žile i ponovnog uspostavljanja kolanja krvi nakon sanacije ozljede. U ranoj fazi, tzv. primarnoj hemostazi, koja nastaje jednu do dvije sekunde nakon lezije, dolazi

do stiskanja krvne žile i stvaranja trombocitnog čepa koji zatvori otvor u stijenci. U drugoj fazi, tzv. sekundarnoj hemostazi, stvara se fini ugrušak, koji učvrsti trombocitni čep. U trećoj fazi, tzv. tercijalnoj hemostazi, ugrušak se učvrsti, dolazi do obnavljanja krvne stijenke, a potom do fibrinolize i uklanjanja ugruška.

U procesu hemostaze sudjeluju krvne žile, trombociti, čimbenici zgrušavanja, čimbenici fibrinolize i njihovi regulatori.

Fibrinoliza je esencijalni fiziološki mehanizam. Obavlja dvije važne funkcije u hemostatskim procesima :

1. razlaganje ugruška bogatog fibrinom nakon što je završio proces zaustavljanja krvarenja
2. ograničava stvaranje ugruška

U procesu fibrinolize sudjeluju: plazminogen (inaktivni proenzim), aktivatori plazminogena (tkivni plazminogen aktivator-t-PA, urokinaza aktivator-u-PA i XIIa, zatim potiskivači aktivatora (plazminogen aktivator inhibitor-PAI), plazmin (aktivirani plazminogen) i potiskivači plazmina (slika 1) (68-69).

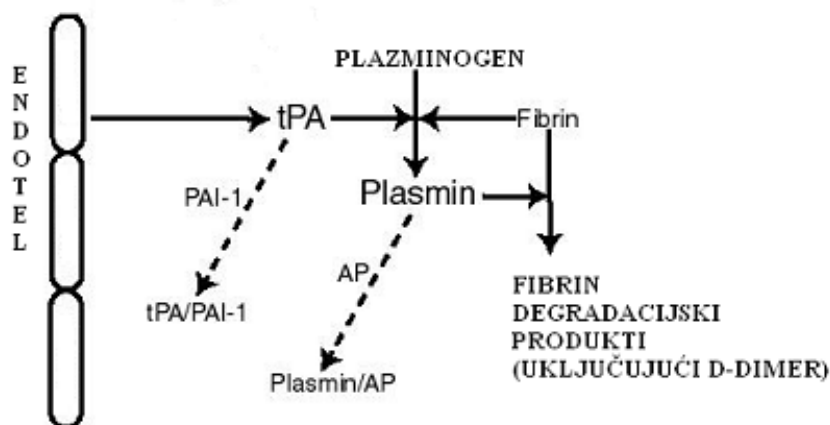
Pod fiziološkim uvjetima događa se stalna aktivacija fibrinolize budući da se degradacijski proizvodi fibrina (fdp) mogu otkriti i u uvjetima mirovanja. Kontinuirana pojava fibrina kao i stalni učinci hormona su vjerovatno odgovorni za bazalnu aktivaciju fibrinolitičkog puta. U aktivaciji fibrinolize sudjeluju t-PA, koji se kontinuirano luči u vanjskom putu aktivacije, i urokinaza (69).

U fiziološkim uvjetima t-PA je slab aktivator plazminogena dok obje komponente nisu vezane za fibrin. Čak ni povećanje koncentracije t-PA od 20 do 100 puta (npr. kod teškog fizičkog napora) neće dovesti do sistemske aktivacije fibrinolize. Stvaranje slobodnog plazmina s posljedičnom fibrinogenolizom neće se

dogoditi sve dok ne postoji veliko (1000 do 5000 puta veće) povećanje i koncentracija t-PA. Kako tijelo želi spriječiti intravaskularnu formaciju fibrina, t-PA i plazminogen se brzo vežu u slučaju produkcije fibrina kako bi se stvorio plazmin za degradaciju fibrina. Nastali fibrin degradacioni produkt ograničava daljnje nastajanje fibrina sprječavajući polimerizaciju fibrina kao i agregaciju trombocita (69).

Nekoliko mehanizama i sistema uključeno je u aktivaciju fibrinolize :

1. regulacija biosinteze t-PA
2. inhibicija fibrinolize putem djelovanja inhibitora koji kolaju krvotokom
3. lokalizacija fibrinolize čime se sprečava sistemska aktivacija
4. uklanjanje fibrinolitičkih aktivatora koji se javljaju lokalno u povišenim koncentracijama krvnom strujom i postepeno odstranjenje iz cirkulacije mononuklearnim fagocitnim sistemom u jetri i slezeni.
5. inhibicija fibrinolitičkog puta u koju je uključeno nekoliko inhibitora, pri čemu većina spada u vrstu serpina, a to su α -2-antiplazmin, α -2-makroglobulin, inhibitor plazmin-aktivatora tip 1 (PAI-1), inhibitor plazmin-aktivatora tip 2 (PAI-2), c1 inhibitor i glikoprotein bogat histidinom (69).



Slika 1. Proces fibrinolize.

1.3. Fibrinoliza i multipla skleroza

Posljednjih godina sve značajnije mjesto među ispitivanim faktorima rizika za MS zauzimaju i poremećaji hemostatskog sustava koji se primarno odnose na promjene fibrinolitičkog potencijala. Naime, pokazano je da karakteristična upala, fokalna demijelinizacija i degeneracija aksona u MS nastaju nakon narušavanja krvno-moždane barijere pri čemu dolazi do ulaska serumskih proteina, uključujući fibrin(ogen), u SŽS. Kod MS bolesnika, kao i kod EAE, nađeni su na demijeliniziranim aksonima depoziti fibrina, koji se neučinkovito uklanjaju uslijed reducirane fibrinolize (70-71).

Pojačana aktivnost plazminogen aktivatora korelira s početkom inflamacije i migracije limfocita u parenhim mozga (72-73). Priljev fibrin(ogena) je udružen s pojačanom aktivnošću t-PA, ključnog fibrinolitičkog enzima. U MS aktivacija t-PA je usklađena sa značajnim porastom PAI-1, prevenirajući učinkovito uklanjanje fibrina (74-75).

Nadalje, EAE miševi deficitarni za TPA gen pate od ranijeg početka i teže forme bolesti što je udruženo s visokom razinom PAI-1 i neučinkovitim uklanjanjem

fibrina (70). Slični nalazi su objavljeni kod oboljenja perifernih živaca kod kojih je fibrin pokazao učinak ometanja procesa remijelinizacije i doprinosio demijelinizaciji i degeneraciji aksona (76). Također, dokazano je da u akutnom EAE perivaskularni depoziti fibrina koreliraju s nastankom paralitičkih kliničkih znakova (77).

1.3.1. Tkivni plazminogen aktivator (t-PA) i multipla skleroza

Tkivni plazminogen aktivator je visoko specifična serin proteinaza i jedan od dva glavna aktivatora plazminogena. Primarni supstrat za t-PA *in vivo* je zimogen plazminogena, kojeg t-PA aktivira do široko specifične proteinaze plazmina. Izvan SŽS-a, t-PA je primarno trombolitički enzim, jer je glavni supstrat plazmina fibrin. No, unutar SŽS-a, uloga t-PA i plazmina nisu toliko razjašnjena kao što nisu poznati ni njihovi primarni supstrati (74,75,70).

Tkivni plazminogen aktivator je značajan u migraciji stanica i remoduliranju tkiva. Povećana enzimska aktivnost uzrokuje hiperfibrinolizu, koja se očituje kao pretjerano krvarenje; smanjena aktivnost dovodi do hipofibrinolize koja može rezultirati trombozom ili embolijom.

Biosinteza t-PA nije stalna i jednolika, već je podložna kružnom ritmu. Endotelne stanice su primarno mjesto sinteze t-PA. Te stanice u raznim dijelovima tijela sintetiziraju i oslobađaju t-PA u različitim koncentracijama. Dodatno, t-PA sintetiziraju mezotelne stanice, megakariociti i monociti.

U plazmi, t-PA je prisutan kao kompleks s PAI-1, stoga je koncentracija slobodnog t-PA u plazmi samo 20%. Biološki poluživot t-PA je 4 minute, što je slično poluživotu PAI-1. Vezanje t-PA za fibrin je karakterizirano relativno visokim afinitetom (78).

TPA gen je mapiran na kromosomu 8p12-p11.2, a I/D polimorfizam je rezultat prisutnosti ili odsutnosti ponavljanja *Alu* sljeda u osmom intronu TPA gena i određuje tri genotipa: II, ID i DD (79).

1.3.2. Inhibitor plazminogen aktivatora-1 (PAI-1) i multipla skleroza

Inhibitor plazminogen aktivatora-1 je glikoprotein koji regulira fibrinolitički sustav, prvenstveno inhibirajući tkivni i urokinazni aktivator plazminogena. Osnovna funkcija PAI-1 je smanjenje fibrinolize što dovodi do akumulacije fibrina, a povišenje u plazmi PAI-1 utječe na normalni degradacijski mehanizam fibrina i potiče trombozu. Prema novijim istraživanjima povišenje PAI-1 osim što vodi do hipofibrinolize, smanjuje aktivnost matriks metaloproteaza (MMP) i staničnu adheziju.

Da bi se ispitalo moguće značenje proteolitičkih mehanizama na razvoj upalnih lezija u MS, ispitivan je polimorfizam u promotorskoj regiji PAI-1 kao rizični čimbenik u MS. Aktivatori plazminogena (PA) glavni su pokretači kaskadne aktivnosti nekoliko metaloproteaza. Aktivnost samoga PA može biti zakočena posredstvom PAI-1. U žarištima MS prisutni su i PA i PAI-1.

PAI-1 gen je lociran na 7q21.3-22 kromozomu što se poklapa s glavnim lokusom podložnosti za MS na 7q21-22. U promotorskoj regiji PAI-1 gena utvrđeno je postojanje specifičnog polimorfizma 4G/5G koji utječe na ekspresiju PAI-1. Funkcionalni polimorfizam 4G/5G označava inserciju/deleciju jednog guanina na poziciji 675 u promotorskoj regiji PAI-1 gena (80). Studije su pokazale da homozigotne osobe 4G4G imaju u plazmi koncentraciju PAI-1 25% višu negoli osobe genotipa 5G5G (81).

Luomala i suradnici (82) pokazali su povezanost navedenog polimorfizma PAI-1 gena s podložnošću za bolest u žena. Alel povezan s bolešću korelira s nižom PAI-1 produkcijom, što smanjuje inhibiciju proteinaze i stoga pojačava migraciju stanica kroz izvanstanični matriks.

U hrvatskih i slovenskih MS bolesnika uz PAI-1 istražen je i utjecaj *Alu* I/D TPA polimorfizma na podložnost i kliničku ekspresiju MS (83). Iako pojedinačno gledajući navedeni polimorfizmi ne utječu na predispoziciju za bolest, TPA DD/PAI-1 4G4G kombinacija genotipa pokazala je graničnu značajnost u reduciranom riziku za MS, sugerirajući gen-gen interakciju.

1.3.3. Angiotenzin konvertirajući enzim (ACE) i multipla skleroza

Renin-angiotenzinski sustav važan je regulator krvnog tlaka i homeostaze elektrolita. Angiotenzin-konvertirajući enzim (engl. angiotensin-converting enzyme, ACE) katalizira hidrolizu angiotenzina I u angiotenzin II koji je snažan vazokonstriktor. Enzim također inaktivira bradikinin koji je snažan vazodilatator.

Također je poznato da su plazmatski t-PA i PAI-1 djelomično regulirani renin-angiotenzinskim sustavom (RAS). Naime, angiotenzin II pored toga što uzrokuje vazokonstrikciju i zadržavanje soli i vode, također inhibira fibrinolizu (83).

Brojna istraživanja su pokazala da angiotenzin II nakon što se veže za endotelne stanice promovira proizvodnju PAI-1, tako da viša ekspresija ACE indirektno vodi do više razine PAI-1. ACE je peptidaza koju mogu stvarati aktivirani makrofazi (84). To je enzim koji posreduje u upali, participira u stimulaciji T stanica putem antigenskih peptida i utječe na propusnost krvno-moždane barijere. Povećana ekspresija ACE je uočena u serumu (85) i cerebrospinalnom likvoru (86) MS

bolesnika, a također blokiranjem tog enzima u EAE je opaženo da dolazi do suprimiranja bolesti, što govori o mogućoj patogenetskoj ulozi ovog enzima u MS (85).

ACE gen se nalazi unutar kromosomske regije 17q23 koja je također jedna od regija podložnosti za MS prema rezultatima asocijacijskih studija. Insercijsko/delecijski (I/D) polimorfizam odražava se kao prisutnost (I) ili odsutnost (D) 285-bp Alu ponavljajućeg sljeda unutar introna 16 i određuje tri genotipa: DD, II i ID. Koncentracija ACE u serumu i tkivima varira ovisno o I/D polimorfizmu koji je odgovoran za 14-50% interindividualne varijabilnosti aktivnosti enzima. Tako je pokazano da je srednja vrijednost aktivnosti plazmatskog ACE u osoba s DD genotipom dvaput viša od osoba s II genotipom, dok ID osobe imaju intermedijarne vrijednosti (87).

Do sada je objavljeno samo jedno istraživanje o uticaju I/D polimorfizma ACE gena na podložnost za MS u slovenskih i hrvatskih bolesnika, koje je pokazalo da DD genotip doprinosi povećanom riziku za MS u muškaraca (88).

2. CILJ RADA

S obzirom na dokazanu reduciranu fibrinolizu u MS bolesnika, posljednjih se godina kao mogući rizični čimbenici istražuju geni koji posredno ili neposredno reguliraju taj proces. Stoga je osnovni cilj ovog rada istraživanje specifičnih polimorfizama gena za tkivni plazminogen aktivator (TPA), inhibitor plazminogen aktivatora-1 (PAI-1) i angiotenzin-konvertirajući enzim (ACE) u MS bolesnika, te utvrđivanje njihovog pojedinačnog i međusobnog utjecaja na predispoziciju i kliničku ekspresiju bolesti (dob nastupa, trajanje bolesti, stupanj invaliditeta, te progresiju MS).

Također, tijekom istraživanja dodatno će se dobiti podatci o učestalostima ispitivanih polimorfizama u stanovništvu Bosne i Hercegovine što će doprinjeti boljem poznavanju genetičke strukture navedene populacije, te istraživanju drugih složenih poligenskih bolesti u ovoj regiji.

Specifični ciljevi istraživanja su sljedeći:

- analizirati frekvenciju TPA, PAI-1 i ACE alela i genotipova u skupini MS bolesnika, podskupinama s PP i RR+SP tipovima bolesti, kao i u skupini kontrolnih ispitanika
- usporediti distribuciju TPA, PAI-1 i ACE alela i genotipova u skupinama MS bolesnika i kontrolnih ispitanika ovisno o njihovom spolu
- utvrditi utjecaj različitih TPA, PAI-1 i ACE alela i/ili genotipova, kao i njihovo zajedničko djelovanje, na predispoziciju za bolest u muških i ženskih bolesnika s PP i RR+SP tipovima bolesti usporedbom s kontrolnim skupinama muških i ženskih ispitanika

- ispitati utjecaj različitih TPA, PAI-1 i ACE genotipova na dob javljanja bolesti u muških i ženskih bolesnika s PP i RR+SP tipovima bolesti
- ispitati utjecaj različitih TPA, PAI-1 i ACE genotipova na trajanje bolesti u muških i ženskih bolesnika s PP i RR+SP tipovima bolesti
- ispitati utjecaj različitih TPA, PAI-1 i ACE genotipova na skalu invaliditeta (EDSS) u muških i ženskih bolesnika s PP i RR+SP tipovima bolesti
- ispitati utjecaj različitih TPA, PAI-1 i ACE genotipova na indeks progresije bolesti (PI) u muških i ženskih bolesnika s PP i RR+SP tipovima bolesti
- ispitati međusobno djelovanje TPA, PAI-1 i ACE genotipova na kliničke karakteristike bolesti kod muških i ženskih bolesnika s PP i RR+SP tipovima bolesti

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici

U istraživanje je uključeno 170 MS bolesnika koji žive na području Bosne i Hercegovine (BIH) i liječe se u KB Mostar i KUC Tuzla. Od toga je bilo 120 (70,6%) žena i 50 (29,4%) muškaraca, pa je odnos spolova iznosio 2,4 :1.

Svi bolesnici imali su dijagnozu MS prema McDonald-ovim kriterijima (30), te su klinički obrađeni sukladno EDMUS (European Database for Multiple Sclerosis) protokolu (89).

Za svakog bolesnika utvrđena je dob početka bolesti, početni simptomi/znaci, kliničke karakteristike bolesti, kao i familijarna pojavnost bolesti. Stupnjevi invalidnosti izraženi su u proširenoj ljestvici invaliditeta (engl. Expanded Disability Status Scale - EDSS) prema Kurtzke-u (90). Dužina trajanja bolesti određena je kao vrijeme od prvog nastupa bolesti do zadnjeg kliničkog pregleda, a indeks progresije (PI) izračunat kao odnos EDSS i dužine trajanja bolesti. Kliničke karakteristike MS bolesnika prikazane su u tablici 1.

Kontrolnu skupinu je činilo 170 zdravih, dobrovoljnih davatelja krvi, stanovnika BIH, koji u svojim obiteljima nemaju neurodegenerativnih bolesti. Za svakog bolesnika određen je kontrolni ispitanik istog spola, dobi, mjesta rođenja i življenja, te etničke pripadnosti.

Molekularno-genetička analiza krvi napravljena je na Zavodu za biologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Rijeci.

Istraživanjem je osigurano poštivanje temeljnih etičkih i bioetičkih principa u skladu s Nürnberškim kodeksom i najnovijom revizijom Helsinške deklaracije.

Medicinski podaci i humani materijal prikupljen je u skladu s etičkim i bioetičkim principima, pri čemu je osigurana privatnost ispitanika uključenih u istraživanje i zaštita tajnosti podataka. Svi su ispitanici bili upoznati sa svrhom i metodologijom samog istraživanja, te su dali pismeni pristanak. Istraživanje su odobrila Etička povjerenstva Medicinskog fakulteta u Rijeci, SKB Mostar i UKC Tuzla.

Tablica 1. Kliničke karakteristike MS bolesnika (N=170)

	Ukupno (n=170)	Muškarci (n=50)	Žene (n=120)	p
Dob	39,4±9,4	38,1±8,7	40,0±9,6	0,224
Dob nastupa ^a	30,8±8,3	27,5±7,0	30,5±8,3	0,023
Tijek bolesti, n (%)				
primarno- progresivni (PP)	10 (5,9)	2 (4,0)	8 (6,7)	
sekundarno- progresivni (SP)	31 (18,2)	11 (22,0)	20 (16,7)	
relapsno- remitirajući (RR)	129 (75,9)	37 (74,0)	92 (76,6)	0,603
Trajanje bolesti ^a	8,3±7,0	10,0±7,5	8,3±7,1	0,164
EDSS ^b	3,4±2,8	3,2±2,0	3,5±3,1	0,612
PI ^c	0,43±0,32	0,37±0,31	0,46±0,32	

EDSS- skala invaliditeta (engl. expanded disability status scale)

PI-indeks progresije

^a srednja vrijednost (godine) ± SD

^b srednja vrijednost EDSS ± SD

^c srednja vrijednost PI ± SD

3.2. Metode

3.2.1. Molekularno-genetička analiza

3.2.1.1. Izolacija DNA

Ispitanicima je izvađeno po 5 ml periferne krvi, koja je do DNA izolacije zamrznuta u epruvetama s antikoagulansom (EDTA) na -20°C . Za molekularno-genetičku analizu izolirali smo genomsku DNA iz periferne krvi ispitanika pomoću kitova za izolaciju (Macherey-Nagel), prema uputama proizvođača. Izoliranu DNA pohranili smo na -20°C na Zavodu za biologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Rijeci.

3.2.1.2. Genotipizacija

3.2.1.2.1. Analiza *Alu* I/D polimorfizma TPA gena

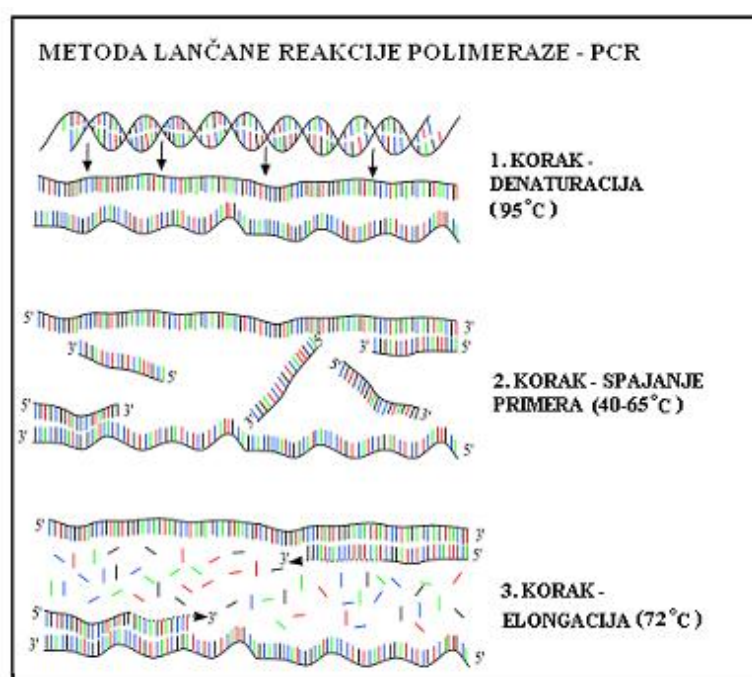
Polimorfizam *Alu* I/D u TPA genu utvrdili smo pomoću metode lančane reakcije polimerazom (PCR)(91). Metoda se bazira na sintezi tj. umnožavanju molekula DNA *in vitro* pomoću specifične DNA polimeraze (enzim koji katalizira sintezu DNA), a toliko je osjetljiva da sinteza može započeti od jedne molekule DNA. DNA polimeraza koja se danas upotrebljava za PCR reakciju, termostabilna je polimeraza izolirana iz termofilnih bakterija. Najčešće je to Taq polimeraza, koja za svoju aktivnost treba DNA slobodne nukleotide, magnezijeve jone i kratke odsječke DNA zvane klice ili početnice (eng. primeri).

Početnice su kratki oligonukleotidni lanci komplementarni početnom i završnom dijelu gena koji želimo umnožiti. Početnice koje smo koristili u našem istraživanju prikazane su u tablici 2, a uvjeti PCR reakcije u tablici 3. Uzorke smo analizirali u serijama od po 10-20 uzoraka, uz negativnu kontrolu.

Tablica 2. Sekvence početnica i temperatura njihovog spajanja (Ts)

Početnice	Sekvence početnica	Ts
TPA / F	TCCGTAACAGGACAGCTCA	60,0
TPA / R	ACCGTGGCTTCAGTCATGGA	60,0

PCR reakcija je prikazana na slici 2.



Slika 2. Prikaz metode lančane reakcije polimerazom (PCR).

Čine je tri stupnja (92):

DENATURACIJA (95°C) – denaturirana toplinom dvostruka uzvojnica DNA se razdvaja na visokoj temperaturi na dvije jednolančane DNA (> 90°).

ANNEALING (40°-65°C) – vezanje početnica za ciljnu sekvencu jednolančane DNA. Početnice služe kao pokretači serije sintetskih reakcija kataliziranih termostabilnom Taq polimerazom, a imaju sekvence komplementarne krajevima DNA ulomka koji se želi umnožiti. Taj proces se odvija na temperaturi 40°- 65°C ovisno o temperaturi taljenja pojedinog para klica.

ELONGACIJA (72°C) – temperatura se podiže na 72°C i enzim Taq polimeraza se koristi za udvostručavanje i produljivanje DNA ulomka.

Nakon PCR reakcije produkte smo provjerili elektroforezom u trajanju od 35-45 minuta pri 80V. Po 8 µl PCR produkta i 2 µl boje BPB nanosili smo na 2% agarozni gel u koji smo prethodno dodali 2,5 µl etidium bromida. PCR produkte analizirali smo pod UV lampom na transluminatoru. Veličinu PCR produkta utvrdili smo primjenom standardnog DNA markera.

Tablica 3. Program TPA, PCR – temperaturni ciklusi

Korak PCR postupka	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
1.	94°C	4 min	1
2.	94°C 58°C 72°C	1 min 0.5 sec 1 min 0.5 sec 2 min 0.5 sec	32x
3.	72°C	10 min	1

3.2.1.2.2. Analiza 4G/5G polimorfizma PAI-1 gena

Polimorfizam 4G/5G u promotorskoj regiji PAI-1 gena utvrđivali smo pomoću kombinacije metode PCR-RFLP, uz specifične početnice i uvjete prema navedenim procedurama (Tablice 4-7) (82). Uzorke smo analizirali u serijama od 10-40 uzoraka, uz negativnu kontrolu (bez DNA).

Tablica 4. Sekvenca početnica i temperatura njihovog spajanja (Ts)

Početnice	Sekvenca početnica	Ts
PAI-1/F	5' CAG AGA GAG AGT CTG GCC ACGT 3'	60,0
PAI-1/R	5' CCA ACA GAG GAC TCT TGG TCT 3'	60,0

Tablica 5. Reakcijska smjesa u konačnom volumenu od 15 µl

	Količina (za 1 uzorak)	Konačna koncentracija
10 x PCR pufer	1.5 µl	1 x PCR pufer
50 x mM MgCl	0.45 µl	1 mM
10 x mM dNTP	0.3 µl	0.05 mM
10 x primer PAI/F	0.375 µl	0.2 µl
10 x primer PAI/R	0.375 µl	0.2µl

Tablica 6. Program-PAI , PCR-temperaturni ciklusi

Korak PCR postupka	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
1.	94°C	5 min	1
2.	94°C 60°C 72°C	1 min 0.5 sec 1 min 0.5 sec 2 min 0.5 sec	30x
3.	72°C	7 min	1

PCR produkte provjerili smo elektroforezom u trajanju 30 min pri 80 V. Po 6µl PCR produkta i 2µl boje XC/BPB nanosili smo na 2 % agarozni gel u koji smo prethodno dodali 2,5 µl etidium bromida. PCR produkte analizirali smo pod UV lampom na transluminatoru. Veličinu PCR produkta utvrdili smo primjenom standardnog DNA markera (od 100 bp).Očekivana veličina PCR produkta bila je 99 bp za 5G i 98 bp za 4G fragment.

Nakon ove aplikacije napravili smo restrikciju PCR produkta. U preostali 9µl PCR produkta dodali smo: 2 µl pufera REact 2, 0.2 µl Enz.Bsi YI, 8.8 µl bidestilirane vode. Restrikcijsku smjesu inkubirali smo tijekom 2,5 sata na 55 °C u PCR aparatu prema programu R55 (Tablica 7).

Tablica 7. Program: R55, restrikcijski uvjeti

Korak	Temperatura	Vrijeme	Br.ciklusa
1.	55 °C	2:30 min.	1
2.	8 °C	0:00 min:	1

Restriksijske fragmente (8 µl produkta + 2 µl boje XC/BPB) provjeravali smo elektroforezom (60 min pri 80V) na 4 % agaroznom gelu u koji smo prethodno dodali 2,5 µl etidium bromida. Restriksijske fragmente analizirali smo UV lampom. Veličinu restriksijskih fragmenata utvrdili smo primjenom standardnog DNA markera (od 100 bp). Ovisno o migraciji restriksijskih fragmenata na gelu jasno su se razlikovali 4G /4G, 4G/5G i 5G/5G PAI-1 genotipovi (Tablica 8).

Tablica 8. Veličina PCR produkta i veličina restriksijskih fragmenata u analizi polimorfizma 4G/5G u promotorskoj regiji PAI-1 gena

Genotip	PCR produkt (bp)	Restriksijski fragmenti (bp)		
4G4G	98 ,99	98		
4G5G		98	77	22
5G5G		77	22	

3.2.1.2.3. Analiza *Alu* I/D polimorfizma ACE gena

Polimorfizam *Alu* I/D u ACE genu utvrdili smo pomoću PCR metode (93-94). Početnice koje smo koristili u našem istraživanju prikazane su u tablici 9, a uvjeti PCR postupka u tablici 10.

Tablica 9. Sekvenca početnica i temperatura njihovog spajanja (Ts)

Početnice	Sekvenca početnih oligonukleotida	Ts
ACE/F	CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT	60,0
ACE/R	GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT	60,0

Tablica 10. Program ACE, PCR – temperaturni ciklusi

Korak PCR postupka	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
1.	94°C	5 min	1
2.	94°C 60°C 72°C	1 min 0.5 sec 1 min 0.5 sec 2 min 0.5 sec	30x
3.	72°C	10 min	1

Alu I/D polimorfizam je rezultat prisutnosti ili odsutnosti ponavljanja *Alu* sekvence u intronu 16 ACE gena. Umnožavanjem ili PCR reakcijom razlikuju se tri moguća genotipa: DD genotip (vidljiv kao fragment veličine 190 bp), II genotip (fragment od 490 bp) i ID genotip (dva fragmenta od 190bp i 490 bp) (93,94).

3.3. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka je provedena uz pomoć računalnih programa Statistica 8.0 for Windows, Epi 6 i MedCalc. Usporedba učestalosti različitih alela i genotipova u grupi i podgrupama bolesnika s grupom zdravih ispitanika izvršena je pomoću χ^2 testa i Fisher egzaktnog testa. Omjer izgleda (engl. odds ratio-OR) i pripadajući 95% raspon pouzdanosti (engl. confidence interval-CI) izračunati su kako bi se procijenio učinak različitih alela/genotipova u podložnosti za MS.

Za izračunavanje očekivane prevalencije homozigota i heterozigota za ispitivane polimorfizme koristili smo Hardy-Weinbergovu jednadžbu: $(p+q)^2=p^2+2pq+q^2$; gdje p predstavlja frekvenciju alela divljeg tipa, a q frekvenciju mutiranog alela. Eventualna odstupanja u distribucijama genotipova od onih očekivanih prema Hardy-Weinbergovom zakonu ispitana su također χ^2 testom.

Korelacijskom analizom i analizom varijance ustanovljen je utjecaj različitih TPA, PAI-1 i ACE alela i/ili genotipova na kliničke karakteristike bolesti (dob nastupa, trajanje, EDSS, PI). Statistička značajnost razlika izražena je na razini 0,05.

4. REZULTATI

4.1. Kliničke karakteristike bolesnika s obzirom na spol i tijek bolesti

Prije negoli smo pristupili analiziranju učinka TPA, PAI-1 i ACE polimorfizama na podložnost i ekspresiju MS, ispitali smo da li postoje razlike u kliničkim karakteristikama bolesnika s obzirom na spol i tijek bolesti. U tablici 11. prikazane su vrijednosti kliničkih parametara (dob nastupa bolesti, trajanje bolesti i EDSS) za sve bolesnike ukupno, te u skupinama od 120 (70,6%) žena i 50 (29,4%) muškaraca, uzimajući u obzir i pojedine tipove bolesti (PP, SP, RR, kao i skupinu RR+SP).

Srednja vrijednost dobi nastupa bolesti u uzorku MS bolesnika iznosi 30,8 godina (SD 8,35). Bolest značajno ranije ($p=0,023$) počinje u muškaraca ($27,5\pm7,0$) negoli žena ($30,5\pm8,3$), što se posebice očituje u skupinama bolesnika s RR ($p=0,001$) i RR+SP ($p=0,002$) tipovima bolesti.

Srednja vrijedost EDSS u svih bolesnika je 3,39 (SD 2,80) bez značajne razlike između muškaraca i žena, osim u SP tipa bolesnika gdje je značajno viši ($p=0,031$) u skupini žena ($8,29\pm4,33$) negoli muškaraca ($5,14\pm2,01$).

U MS bolesnika srednja vrijednost trajanja bolesti od početka do termina zadnjeg pregleda iznosi 8,3 godine (SD 7,0). U skupinama s RR i RR+SP tipovima bolesti njeno trajanje je značajno duže u muškaraca ($p=0,004$ i $0,047$).

Tablica 11. Kliničke karakteristike MS bolesnika ukupno i prema spolu i tijeku bolesti

Ukupno MS	Ukupno (n=170)	Muškarci (n=50)	Žene (n=120)	p
Dob	39,4±9,4	38,1±8,7	40,0±9,6	0,224
Dob nastupa bolesti	30,8±8,3	27,5±7,0	30,5±8,3	0,023
Trajanje bolesti (godine)	8,30±7,0	10,0±7,5	8,30±7,1	0,164
EDSS	3,4±2,8	3,2±2,0	3,5±3,1	0,612
PPMS	Ukupno (n=10)	Muškarci (n=2)	Žene (n=8)	p
Dob nastupa bolesti	34,5±8,1	34,0±4,2	34,6±9,0	0,929
Trajanje bolesti (godine)	8,2±4,7	9,0±1,4	8,0±5,3	0,805
EDSS	5,1±1,8	4,7±3,2	5,2±1,7	0,750
SPMS	Ukupno (n=31)	Muškarci (n=11)	Žene (n=20)	p
Dob nastupa bolesti	31,7±7,8	30,6±8,1	32,2±7,8	0,592
Trajanje bolesti (godine)	14,3±8,6	12,8±9,1	15,1±8,5	0,481
EDSS	7,1±3,9	5,1±2,0	8,3±4,3	0,031
RRMS	Ukupno (n=129)	Muškarci (n=37)	Žene (n=92)	p
Dob nastupa bolesti	30,2±8,5	26,5±6,4	31,7±8,7	0,001
Trajanje bolesti (godine)	6,8±5,8	9,1±7,0	5,9±5,1	0,004
EDSS	2,4±1,4	2,6±1,5	2,3±1,3	0,277
RR+SPMS	Ukupno (n=160)	Muškarci (n=48)	Žene (n=112)	p
Dob nastupa bolesti	30,5±8,3	27,5±7,0	31,8±8,5	0,002
Trajanje bolesti(godine)	8,3±7,1	10,0±7,5	7,5±6,8	0,047
EDSS	3,5±3,1	3,2±2,0	3,3±3,1	0,743

4.2. Utjecaj polimorfizama gena uključenih u fibrinolizu na podložnost za MS

S obzirom na utvrđene statistički značajne razlike u kliničkim karakteristikama bolesnika u odnosu na spol i tijek bolesti, u daljnjim analizama se vodilo računa da se utjecaj polimorfizama gena uključenih u fibrinolizu na MS ispituje i po tim kategorijama.

4.2.1. Utjecaj *A/u I/D* polimorfizma TPA gena na podložnost za MS

Analizirane distribucije TPA I/D genotipova bile su podudarne s očekivanim vrijednostima prema Hardy-Weinbergovoj jednadžbi (bolesnici $p=0,522$, kontrola $p=0,977$).

Tablice 12 i 13 prikazuju učestalost TPA genotipova (II, ID, DD) i alela (I, D) u ukupnom uzorku MS bolesnika, kao i u bolesnika s određenim podtipovima bolesti, u usporedbi s kontrolnim ispitanicima.

Iako su kod bolesnika učestalosti II genotipa (31,8%) i I alela (53,5%) bile više negoli u kontrolnih ispitanika (II=24,7%, I=50,3%), razlike nisu bile statistički značajne ($p=0,149$ i $0,399$). Također, nije uočena statistički značajna razlika u zastupljenosti pojedinih TPA I/D genotipova i alela ni kada su odvojeno analizirane podskupine bolesnika i uspoređene s kontrolnim ispitanicima ($p>0,05$).

Tablica 12. Frekvencija alela i genotipova TPA gena u MS bolesnika (N=170) i kontrolnih ispitanika (N=170)

Genotip	MS bolesnici %				Kontrola % (N=170)	p	OR (95% CI)
	PP ^a (N=10)	SP ^b (N=31)	RR ^c (N=129)	Total (N=170)			
II	3 (30,0)	9 (29,0)	42 (32,6)	54 (31,8)	42 (24,7)	0,149	1,42 (0,88-2,28)
ID	2 (20,0)	16 (51,6)	56 (43,4)	74 (43,5)	87 (51,2)	0,158	0,73 (0,48 - 1,12)
DD	5 (50,0)	6 (19,4)	31 (24,0)	42 (24,7)	41 (24,1)	0,899	1,03 (0,63 - 1,69)
Alel %							
I	40,0	54,8	54,3	53,5	50,3	0,399	1,14 (0,84 – 1,54)
D	60,0	45,2	45,7	46,5	49,7	0,399	0,88 (0,65 – 1,12)

^a PP - primarno progresivni tijek bolesti

^b SP - sekundarno progresivni tijek bolesti

^c RR - relapsno-remitirajući tijek bolesti

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda

CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Tablica 13. Usporedba frekvencije alela i genotipova TPA gena u MS bolesnika i kontrolnih ispitanika s obzirom na tijek bolesti

Genotip	MS bolesnici %		Kontrola % (N=170)	p ¹	OR ¹ (95% CI)	p ²	OR ² (95% CI)
	PP ^a (N=10)	RR+SP ^b (N=160)					
II	3 (30,0)	51 (31,9)	42 (24,7)	0,708	1,31 (0,32–5,28)	0,149	1,42 (0,88-2,31)
ID	2 (20,0)	72 (45,0)	87 (51,2)	0,075	0,24 (0,05-1,16)	0,262	0,78 (0,51-1,20)
DD	5 (50,0)	37 (23,1)	41 (24,1)	0,081	3,15 (0,87-11,41)	0,832	0,95 (0,57-1,57)
Alel %							
I	40,0	54,4	50,3	0,374	0,66 (0,26-1,65)	0,294	1,18 (0,87-1,60)
D	60,0	45,6	49,7	0,374	1,52 (0,63-3,81)	0,293	0,85 (0,63-1,15)

^a PP - primarno progresivni tijek bolesti

^b RR+SP - relapsno-remitirajući + sekundarno progresivni tijek bolesti

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda

CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

¹ – razlika između PP i kontrole

² – razlika između (RR+SP) i kontrole

Isti trend više frekvencije II genotipa i I alela je zamijećen kada smo usporedili bolesnike i kontrolne ispitanike u odnosu na spol, ali ni tada razlike nisu dosegle razinu statističke značajnosti ($p > 0,05$) (tablice 14 i 15).

Tablica 14. Frekvencija alela i genotipova TPA gena u muških MS bolesnika (N=50) i kontrolnih ispitanika (N=50)

Genotip	Muškarci			
	MS bolesnici % (N=50)	Kontrola % (N=50)	p	OR
II	19 (38,0)	17 (34,0)	0,677	1,12 (0,59-2,69)
ID	22 (44,0)	23 (46,0)	0,841	0,92 (0,42-2,03)
DD	9 (18,0)	10 (20,0)	0,799	0,88 (0,33-2,39)
Alel %				
I	60,0	57,0	0,667	1,13 (0,64-1,99)
D	40,0	43,0	0,667	0,88 (0,50-1,55)

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda

CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Tablica 15. Frekvencija alela i genotipova TPA gena u MS bolesnica (N=120) i kontrolnih ispitanica (N=120)

Genotip	Žene			
	MS bolesnici % (N=120)	Kontrola % (N=120)	p	OR
II	35 (29,2)	25 (20,8)	0,137	1,56 (0,87-2,83)
ID	52 (43,3)	64 (53,3)	0,122	0,67 (0,40-1,11)
DD	33 (27,5)	31 (25,9)	0,770	1,09 (0,61-1,93)
Alel %				
I	50,9	47,5	0,465	1,14 (0,80-1,63)
D	49,1	52,5	0,465	0,88 (0,61-1,25)

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda

CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

4.2.2. Utjecaj 4G/5G polimorfizma PAI-1 gena na podložnost za MS

Frekvencije PAI-1 genotipova i alela u tri podskupine bolesnika ovisno o tijeku bolesti, zatim u svih bolesnika, te u zdravih ispitanika prikazane su u tablicama 16 i 17. Analiza je pokazala da su pojedini genotipovi i aleli podjednako zastupljeni među bolesnicima i kontrolnom skupinom ($p > 0,05$).

Također, analizirane distribucije PAI-1 genotipova bile su podudarne s očekivanim vrijednostima prema Hardy-Weinbergovoj jednadžbi (bolesnici $p=0,424$, kontrola $p=0,978$).

Tablica 16. Frekvencija alela i genotipova PAI-1 gena u MS bolesnika (N=170) i kontrolnih ispitanika (N=170)

Genotip	MS bolesnici % (N)				Kontrola % (N=170)	p	OR (95% CI)
	PP ^a (N=10)	SP ^b (N=31)	RR ^c (N=129)	Total (N=170)			
4G4G	3 (30,0)	8 (25,8)	30 (23,2)	41 (24,1)	44 (25,9)	0,707	0,91 (0,56-1,49)
4G5G	6 (60,0)	17 (54,8)	74 (57,4)	97 (57,1)	87 (51,2)	0,277	1,26 (0,83-1,94)
5G5G	1 (10,0)	6 (19,4)	25 (19,4)	32 (18,2)	39 (22,9)	0,351	0,78 (0,46-1,32)
Alel %							
4G	60,0	53,2	51,9	52,6	51,5	0,759	1,05 (0,78-1,42)
5G	40,0	46,8	48,1	47,4	48,5	0,759	0,95 (0,71-1,29)

^a PP - primarno progresivni tijek bolesti

^b SP - sekundarno progresivni tijek bolesti

^c RR - relapsno-remitirajući tijek bolesti

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda

CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Tablica 17. Usporedba frekvencije alela i genotipova PAI-1 gena u MS bolesnika i kontrolnih ispitanika s obzirom na tijek bolesti

Genotip	MS bolesnici %		Kontrola % (N=170)	p ¹	OR ¹ (95% CI)	p ²	OR ² (95% CI)
	PP ^a (N=10)	RR+SP ^b (N=160)					
4G4G	3 (30,0)	38 (23,8)	44 (25,9)	0,774	1,23 (0,30-4,95)	0,654	0,89 (0,54-1,47)
4G5G	6 (60,0)	91 (56,9)	87 (51,2)	0,589	1,43 (0,39-5,25)	0,299	1,26 (0,821-1,94)
5G5G	1 (10,0)	31 (19,3)	39 (22,9)	0,369	0,37 (0,05-3,04)	0,429	0,81 (0,47-1,37)
Alel %							
4G	60,0	52,2	51,5	0,460	1,41 (0,56-3,55)	0,854	1,03 (0,76-1,40)
5G	40,0	47,8	48,5	0,460	0,71 (0,28-1,77)	0,854	0,97 (0,72-1,32)

^a PP - primarno progresivni tijek bolesti

^b RR+SP - relapsno-remitirajući + sekundarno progresivni tijek bolesti

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda

CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

¹ – razlika između PP i kontrole

² – razlika između (SP + RR) i kontrole

Nadalje smo ispitali postoji li razlika u učestalosti pojedinih PAI-1 genotipova i alela između MS bolesnika i kontrolnih ispitanika s obzirom na spol, ali rezultati su ukazali da ne postoje značajne razlike u njihovoj distribuciji između navedenih skupina ($p > 0,05$) (tablice 18 i 19).

Tablica 18. Frekvencija alela i genotipova PAI-1 gena u muških MS bolesnika (N=50)
i kontrolnih ispitanika (N=50)

Genotip	Muškarci			
	MS bolesnici % (N=50)	Kontrola % (N=50)	p	OR
4G4G	13 (26,0)	11 (22,0)	0,640	1,25 (0,50-3,13)
4G5G	29 (58,0)	28 (56,0)	0,840	1,09 (0,49-2,40)
5G5G	8 (16,0)	11 (22,0)	0,446	0,68 (0,25-1,85)
Alel %				
4G	55,0	50,0	0,479	1,22 (0,70-2,13)
5G	45,0	50,0	0,479	0,81 (0,47-1,43)

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda

CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Tablica 19. Frekvencija alela i genotipova PAI-1 gena u MS bolesnica (N=120) i kontrolnih ispitanica (N=120)

Genotip	Žene			
	MS bolesnici % (N=120)	Kontrola % (N=120)	p	OR
4G4G	28 (23,3)	33 (27,5)	0,459	0,80 (0,45-1,44)
4G5G	68 (56,7)	59 (49,2)	0,245	1,35 (0,81-2,25)
5G5G	24 (20,0)	28 (23,3)	0,531	0,82 (1,44-1,52)
Alel %				
4G	51,7	52,1	0,927	0,98 (0,69-1,41)
5G	48,3	47,9	0,927	1,02 (0,71-1,45)

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda

CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

4.2.3. Utjecaj *A/u* I/D polimorfizma ACE gena na podložnost za MS

Distribucija ACE I/D genotipova i alela u ukupnom uzorku MS bolesnika, kao i kod pojedinih subtipova bolesti, nije se značajno razlikovala od distribucije u zdravih ispitanika ($p>0,05$) (tablice 20 i 21).

Navedene distribucije ACE I/D genotipova bile su podudarne s očekivanim vrijednostima prema Hardy-Weinbergovoj jednadžbi (bolesnici $p=0,964$, kontrola $p=0,885$).

Tablica 20. Frekvencija alela i genotipova ACE gena u MS bolesnika (N=170) i kontrolnih ispitanika (N=170)

Genotip	MS bolesnici % (N)				Kontrola % (N=151)	p	OR (95% CI)
	PP ^a (N=10)	SP ^b (N=31)	RR ^c (N=129)	Total (N=170)			
II	3 (30)	2 (6,4)	32 (24,8)	36 (21,2)	31 (18,3)	0,496	1,20 (0,71-2,06)
ID	2 (20,0)	22 (71,0)	60 (46,5)	87 (51,2)	89 (52,3)	0,828	0,95 (0,62-1,46)
DD	5 (50,0)	7(22,6)	37 (28,7)	47 (27,6)	50 (29,4)	0,719	0,92 (0,57-1,47)
Alel %							
I	40,0	41,9	48,1	46,8	44,4	0,538	1,10 (0,81-1,49)
D	60,0	58,1	51,9	53,2	55,6	0,538	0,91 (0,67-1,23)

^a PP - primarno progresivni tijek bolesti

^b SP - sekundarno progresivni tijek bolesti

^c RR - relapsno-remitirajući tijek bolesti

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda

CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Tablica 21. Usporedba frekvencije alela i genotipova ACE gena u MS bolesnika i kontrolnih ispitanika s obzirom na tijek bolesti

Genotip	MS bolesnici %		Kontrola % (N=170)	p ¹	OR ¹ (95% CI)	p ²	OR ² (95% CI)
	PP ^a (N=10)	RR+SP ^b (N=160)					
II	3 (30)	34 (21,2)	31 (18,3)	0,363	1,92 (0,47-7,85)	0,492	1,21 (0,70-2,08)
ID	2 (20,0)	82 (51,3)	89 (52,3)	0,066	0,23 (0,05-1,10)	0,841	0,96 (0,62-1,47)
DD	5 (50,0)	44 (27,5)	50 (29,4)	0,181	2,40 (0,67-8,66)	0,701	0,91 (0,56-1,47)
Alel %							
I	40,0	46,9	44,4	0,533	0,75 (0,29-1,87)	0,937	0,99 (0,72-1,34)
D	60,0	53,1	55,6	0,533	1,34 (0,53-3,37)	0,937	1,01 (0,74-1,38)

^a PP - primarno progresivni tijek bolesti

^b RR+SP - relapsno-remitirajući + sekundarno progresivni tijek bolesti

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda

CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

¹ – razlika između PP i kontrole

² – razlika između (SP + RR) i kontrole

Također, ACE I/D polimorfizam podjednako je zastupljen u muškaraca i žena obje ispitivane skupine (p>0,05) (tablice 22 i 23).

Tablica 22. Frekvencija alela i genotipova ACE gena u muških MS bolesnika
(N=50) i kontrolnih ispitanika (N=50)

Genotip	Muškarci			
	MS bolesnici % (N=50)	Kontrola % (N=50)	p	OR
II	11 (22,0)	7 (14,0)	0,301	1,73 (0,61-4,91)
ID	26 (52,0)	27 (54,0)	0,841	0,92 (0,42-2,02)
DD	13 (26,0)	16 (32,0)	0,747	0,75 (0,31-1,78)
Alel %				
I	48,0	41,0	0,320	1,33 (0,76-2,32)
D	52,0	59,0	0,320	0,75 (0,43-1,32)

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda

CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Tablica 23. Frekvencija alela i genotipova ACE gena u MS bolesnica (N=120) i kontrolnih ispitanica (N=120)

Genotip	Žene			
	MS bolesnici % (N=120)	Kontrola % (N=120)	p	OR
II	25 (20,8)	24 (20,0)	0,838	1,05 (0,56-1,97)
ID	61 (50,8)	62 (51,7)	0,897	0,97 (0,58-1,60)
DD	34 (28,4)	34 (28,3)	1,000	1,00 (0,57-1,75)
Alel %				
I	46,3	45,8	0,927	1,02 (0,71-1,46)
D	53,7	54,2	0,927	0,98 (0,69-1,41)

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda

CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

4.2.4. Učinak međudjelovanja gena uključenih u fibrinolizu na podložnost za MS

4.2.4.1. Međudjelovanje TPA i PAI-1 gena u podložnosti za MS

Interakciju TPA i PAI-1 gena u podložnosti za MS ispitali smo uspoređujući kombinacije genotipova u skupini bolesnika/bolesnica i u kontrolnim skupinama (tablice 24 i 25).

Tablica 24. Interakcija TPA i PAI-1 gena u MS bolesnika (N=50) i kontrolnoj skupini (N=50)

TPA genotipovi	PAI-1 genotipovi	MS bolesnici% (N=50)	Kontrola% (N=50)	OR	95%CI	p
II	4G4G	4 (8,0)	3 (6,0)	1,36	0,29- 6,34	0,696
II	4G5G+5G5G	15 (30,0)	14 (28,0)	1,10	0,46- 2,62	0,826
ID+DD	4G4G	9 (18,0)	8 (16,0)	1,15	0,41- 3,28	0,790
ID+DD	4G5G+5G5G	22 (44,0)	25 (50,0)	0,79	0,36- 1,73	0,548

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda

CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Tablica 25. Interakcija TPA i PAI-1 gena u MS bolesnica (N=120) i kontrolnoj skupini (N=120)

TPA genotipovi	PAI-1 genotipovi	MS bolesnice% (N=120)	Kontrola% (N=120)	OR	95%CI	p
II	4G4G	9 (7,5)	7 (5,8)	1,31	0,47-3,64	0,606
II	4G5G+5G5G	26 (21,7)	18 (15,0)	1,57	0,81-3,04	0,184
ID+DD	4G4G	19 (15,8)	26 (21,7)	0,68	0,35-1,31	0,249
ID+DD	4G5G+5G5G	66 (55,0)	69 (57,5)	0,90	0,54-1,50	0,696

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda

CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji kombinacija TPA i PAI-1 genotipova kod bolesnika/bolesnica i kontrolnih ispitanika ($p>0,05$).

4.2.4.2. Međudjelovanje ACE i PAI-1 gena u podložnosti za MS

Kombinacije ACE i PAI-1 genotipova uspoređene su između skupine bolesnika/bolesnica i kontrolnih ispitanika, pri čemu nisu utvrđene statistički značajna razlike u distribuciji niti za jednu postojeću kombinaciju ($p>0,05$) (tablice 26 i 27).

Tablica 26. Interakcija ACE i PAI-1 gena u MS bolesnika i kontrole

ACE genotipovi	PAI-1 genotipovi	MS bolesnici% (N=50)	Kontrola% (N=50)	OR	95%CI	p
DD	4G4G	4 (8,0)	1 (2,0)	4,27	0,46- 39,55	0,202
DD	4G5G+5G5G	9 (18,0)	15 (30,0)	0,51	0,20- 1,31	0,164
ID+II	4G4G	9 (18,0)	10 (20,0)	0,88	0,32- 2,39	0,799
ID+II	4G5G+5G5G	28 (56,0)	24 (48,0)	1,38	0,63- 3,03	0,424

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda

CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Tablica 27. Interakcija ACE i PAI-1 gena u MS bolesnica i kontrole

ACE genotipovi	PAI-1 genotipovi	MS bolesnice (N=120)	Kontrola (N=120)	OR	95%CI	p
DD	4G4G	11 (9,2)	12 (10,0)	0,91	0,38- 2,15	0,826
DD	4G5G+5G5G	23 (19,1)	22 (18,3)	1,06	0,55- 2,02	0,869
ID+II	4G4G	17 (14,2)	21 (17,5)	0,78	0,39- 1,56	0,480
ID+II	4G5G+5G5G	69 (57,5)	65 (54,2)	1,15	0,69- 1,91	0,603

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda

CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

4.2.4.3. Međudjelovanje TPA, PAI-1 i ACE gena u podložnosti za MS

Analizom međusobne interakcije TPA, PAI-1 i ACE polimorfizama nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji kombinacija genotipova u skupini MS bolesnika, kao i u skupini bolesnica, u odnosu na kontrolne ispitanike ($p > 0,05$) (tablice 28 i 29). Uspoređeni su samo bolesnici koji su imali RR+SP tijekom bolesti zbog malog broja bolesnika s PP tijekom MS.

Tablica 28. Interakcija TPA, PAI-1 i ACE gena u podložnosti za bolest kod SP+RR

MS bolesnika

TPA II	PAI-1 4G4G	ACE DD	MS bolesnici % (N=48)	Kontrola % (N=50)	OR	95%CI	p
-	-	-	16 (33,3)	14 (28,0)	1,29	0,51- 3,04	0,567
-	+	-	7 (14,6)	8 (16,0)	0,89	0,29- 2,69	0,846
-	+	+	2 (4,2)	0 (0,0)	5,43	0,25- 116,09	0,279
+	-	-	10 (20,8)	10 (20,0)	1,05	0,39- 2,81	0,918
+	+	-	2 (4,2)	2 (4,0)	1,04	0,14- 7,72	0,967
+	+	+	2 (4,2)	1 (2,0)	2,13	0,18- 24,29	0,542
-	-	+	5 (10,4)	11 (22,0)	0,41	0,13- 1,29	0,128
+	-	+	4 (8,3)	4 (8,0)	1,05	0,25- 4,44	0,953

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda

CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Tablica 29. Interakcija TPA, PAI-1 i ACE gena u podložnosti za bolest kod SP+RR

MS bolesnica

TPA II	PAI-1 4G4G	ACE DD	MS bolesnice % (N=112)	Kontrola % (N=120)	OR	95%CI	p
-	-	-	48 (42,9)	52 (43,3)	0,98	0,58- 1,65	0,942
-	+	-	11 (9,8)	15 (12,5)	0,76	0,33 - 1,74	0,519
-	+	+	5 (4,5)	10 (8,3)	0,51	0,17- 1,55	0,238
+	-	-	18 (16,1)	14 (11,7)	1,45	0,68- 3,07	0,333
+	+	-	4 (3,6)	5 (4,2)	0,85	0,22- 3,26	0,815
+	+	+	4 (3,6)	2 (1,7)	2,18	0,39- 12,17	0,372
-	-	+	15 (13,4)	18 (15,0)	0,88	0,42- 1,84	0,726
+	-	+	7 (6,1)	4 (3,3)	1,93	0,55- 6,79	0,304

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda

CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

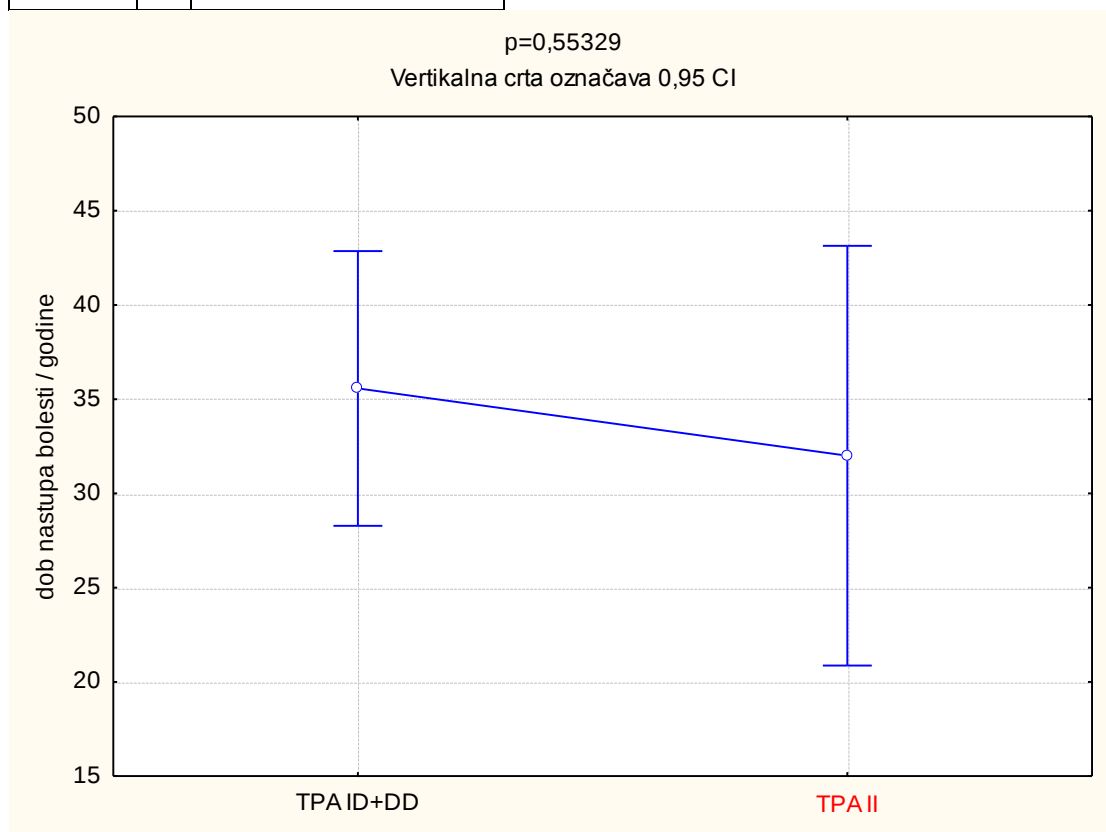
4.3. Utjecaj polimorfizama gena uključenih u fibrinolizu na kliničku ekspresiju MS

U rezultatima su prikazani utjecaji pojedinačnih polimorfizama gena koji su uključeni u proces fibrinolize na ekspresiju bolesti, kao i njihovo međudjelovanje na dob nastupa, trajanje bolesti, progresijski indeks (PI) i stupanj invaliditeta (EDSS). S obzirom da se različiti subtipovi bolesti međusobno razlikuju analize su učinjene kod bolesnika s PP i RR+SP tijekom bolesti. Također, kako su kliničke karakteristike bolesti pokazale razliku u nekim parametrima ovisno o spolu, sve navedene analize su provedene odvojeno u ispitanika muškog i ženskog spola.

4.3.1. Utjecaj *A/u* *I/D* polimorfizma TPA gena na kliničku ekspresiju MS

Kod bolesnika s PP tijekom koji imaju II genotip bolest počinje ranije ($32,0 \pm 8,5$) u odnosu na bolesnike s ID+DD genotipom ($35,6 \pm 8,3$), ali razlika nije statistički značajna ($p=0,553$) (slika 3).

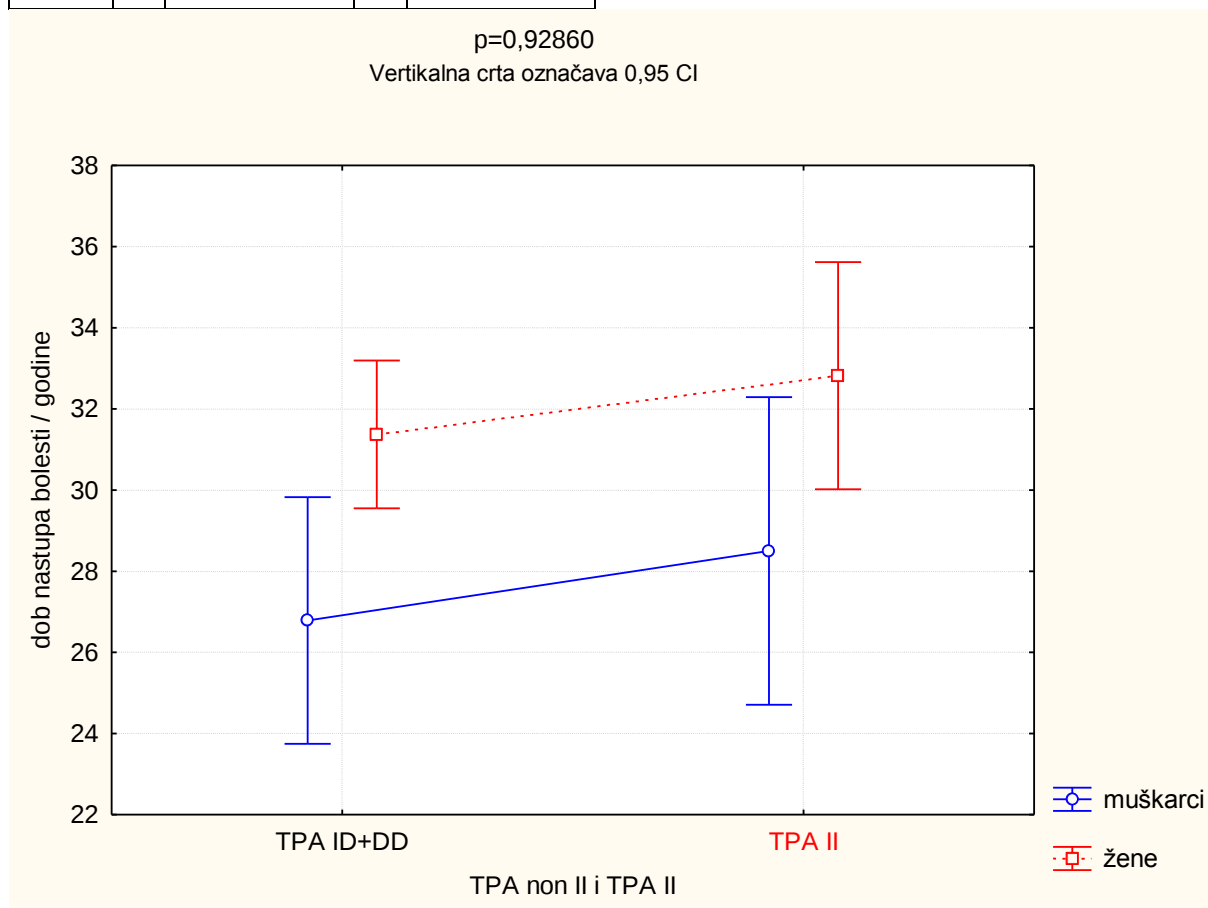
Genotip	MS bolesnici s PP tijekom bolesti	
	N	Dob nastupa bolesti ($\bar{x} \pm SD$)
TPA II	3	32,000 $\pm$ 8,5440
TPA ID+DD	7	35,5714 $\pm$ 8,304



Slika 3. Srednja dob nastupa bolesti (godine) u PP bolesnika s obzirom na njihov TPA genotip.

Kod bolesnika s RR+SP tijekom uspoređena je dob nastupa bolesti u muškaraca i žena ovisno o prisutnom TPA genotipu. U obje skupine nema značajne razlike u dobi nastupa između osoba s II genotipom u odnosu na osobe s ID+DD genotipovima (slika 4).

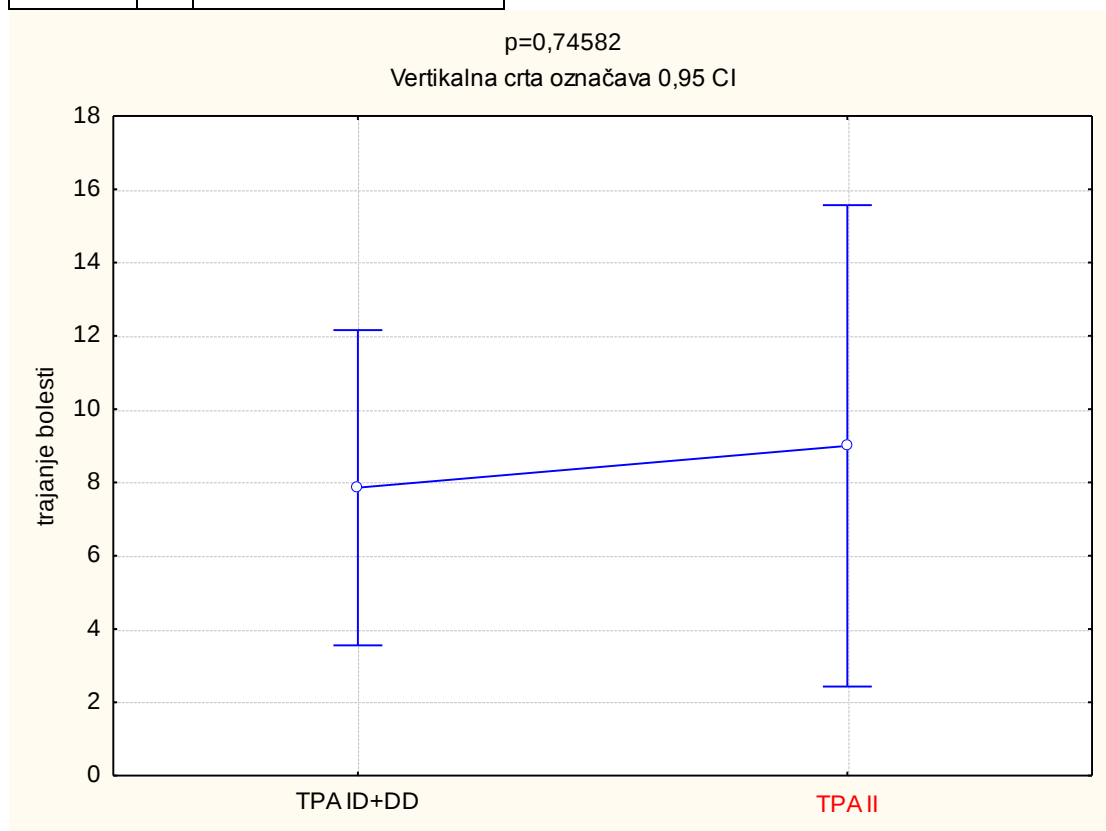
Genotip	MS bolesnici s RR+SP tijekom bolesti			
	Muškarci		Žene	
	N	Dob nastupa bolesti ($\bar{x} \pm SD$)	N	Dob nastupa bolesti ($\bar{x} \pm SD$)
TPA II	18	28,500 $\pm$ 7,123	33	32,818 $\pm$ 9,761
TPA ID+DD	30	26,785 $\pm$ 6,914	78	31,371 $\pm$ 8,001



Slika 4. Srednja dob nastupa bolesti (godine) u RR+SP bolesnika s obzirom na njihov TPA genotip.

Dužina trajanja bolesti u bolesnika s PP tijekom bolesti je nešto viša kod osoba II genotipa u usporedbi s ID+DD genotipom, ali ne i statistički značajno ($p=0,746$) (slika 5).

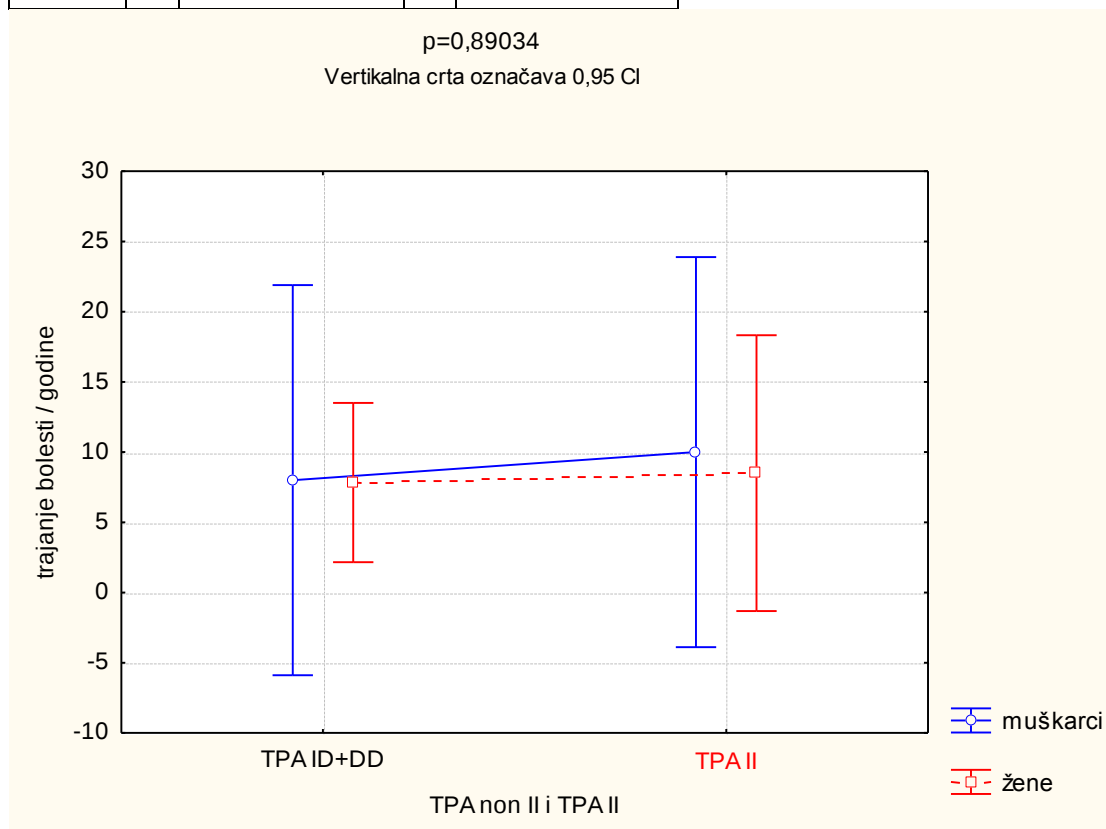
Genotip	MS bolesnici s PP tijekom bolesti	
	N	Trajanje bolesti (x±SD)
TPA II	3	9,000±7,5498
TPA ID+DD	7	7,8571±3,6710



Slika 5. Prosječno trajanje bolesti (godine) u PP bolesnika s obzirom na njihov t-PA genotip.

U MS bolesnika s RR+SP tijekom bolesti TPA genotip ne utječe na trajanje bolesti ni u muških ni u ženskih bolesnika (p=0,890) (slika 6).

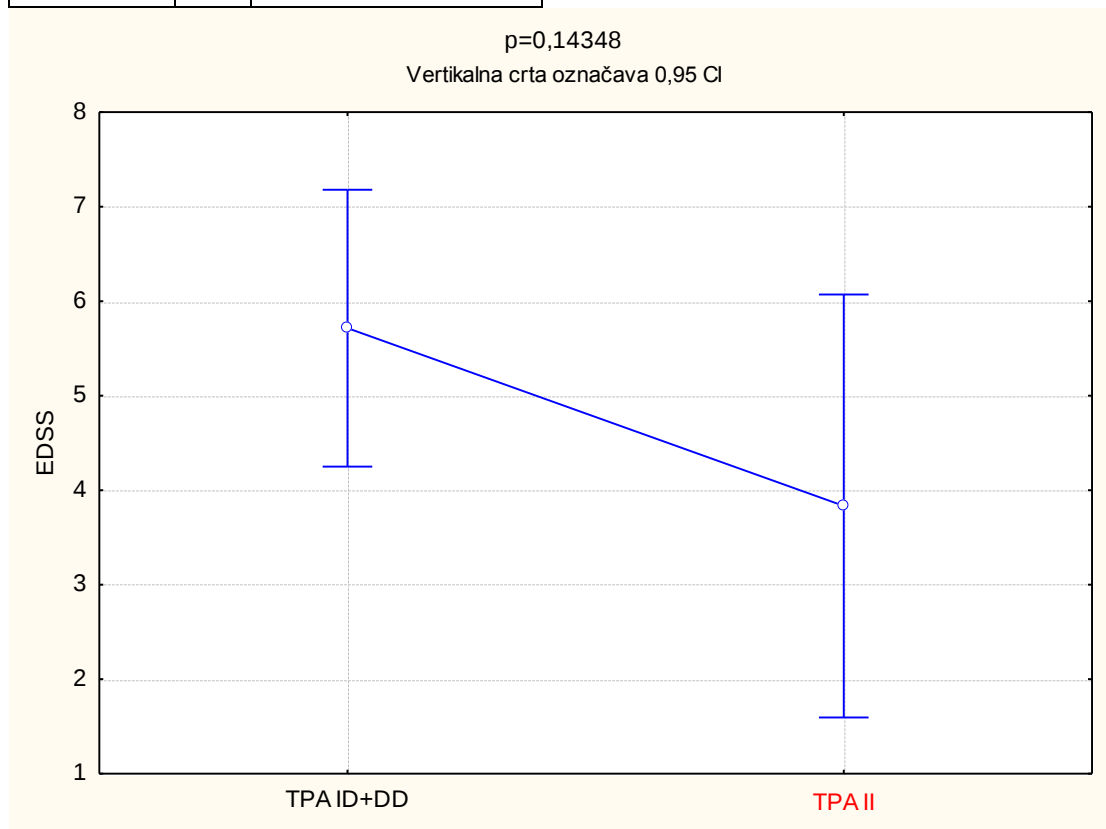
Genotip	MS bolesnici s RR+SP tijekom bolesti			
	Muškarci		Žene	
	N	Trajanje bolesti ($\bar{x} \pm SD$)	N	Trajanje bolesti ($\bar{x} \pm SD$)
TPA II	18	10,2222 $\pm$ 7,009	33	6,7273 $\pm$ 5,589
TPA ID+DD	30	9,8000 $\pm$ 7,932	78	7,8718 $\pm$ 7,306



Slika 6. Prosječno trajanje bolesti (godine) u RR+SP bolesnika s obzirom na njihov TPA genotip.

Bolesnici s PP tijekom bolesti imaju niži EDSS ($3,8 \pm 1,3$) ukoliko imaju II genotip od onih s ID+DD genotipom ($5,7 \pm 1,8$), ali razlika nije značajna ($p=0,143$) (slika 7).

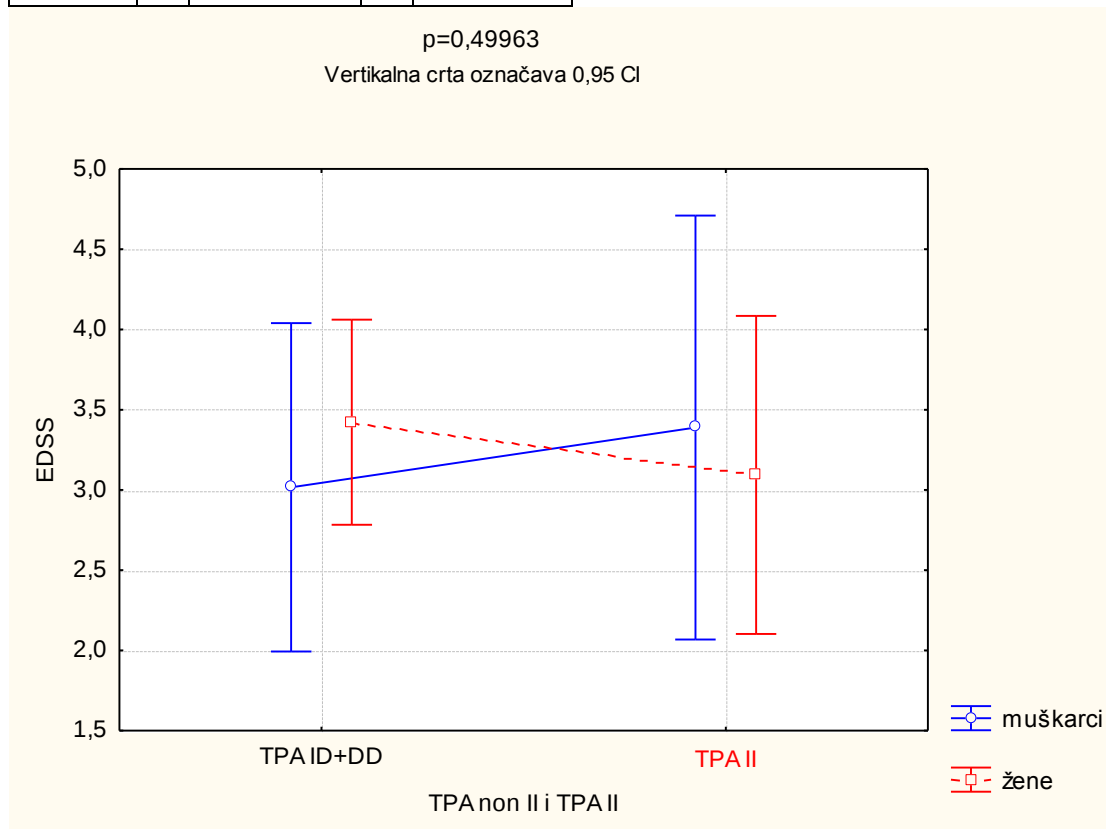
Genotip	MS bolesnici s PP tijekom bolesti	
	N	EDSS ($\bar{x} \pm SD$)
TPA II	3	3,8333 $\pm$ 1,2583
TPA ID+DD	7	5,7142 $\pm$ 1,7995



Slika 7. Stupanj invalidnosti (EDSS) u PP bolesnika s obzirom na njihov TPA genotip.

Vrijednosti EDSS se ne razlikuju u skupinama muškaraca i žena s obzirom na njihov TPA genotip ($p=0,500$) (slika 8).

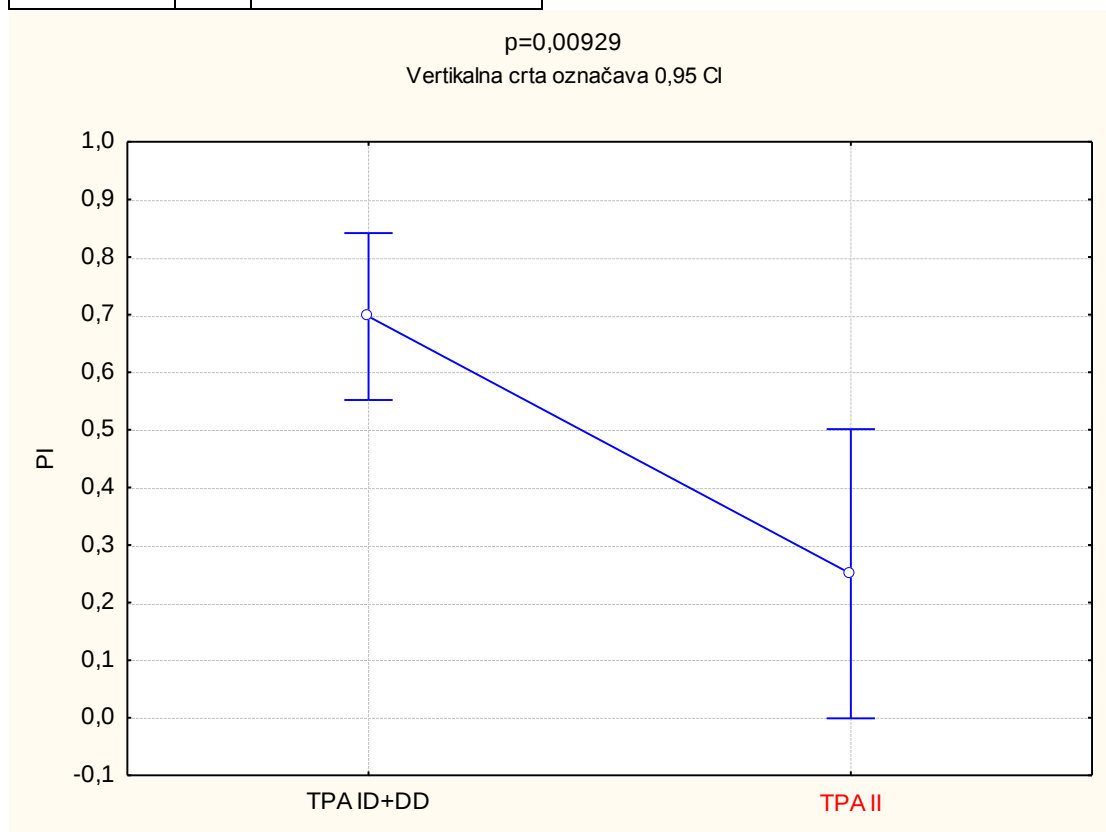
Genotip	MS bolesnici s RR+SP tijekom bolesti			
	Muškarci		Žene	
	N	EDSS ($\bar{x} \pm SD$)	N	EDSS ($\bar{x} \pm SD$)
TPA II	18	3,3889 $\pm$ 2,272	33	3,0937 $\pm$ 2,431
TPA ID+DD	30	3,0167 $\pm$ 1,7835	78	3,4221 $\pm$ 3,380



Slika 8. Stupanj invalidnosti (EDSS) u RR+SP bolesnika s obzirom na njihov TPA genotip.

U bolesnika s PP tijekom bolesti uspoređen je PI ovisno o prisutnom TPA genotipu, pri čemu je bio značajno viši ($p=0,010$) kod bolesnika s ID+DD genotipom ($0,70 \pm 0,16$) u odnosu na II genotip ($0,25$) (slika 9).

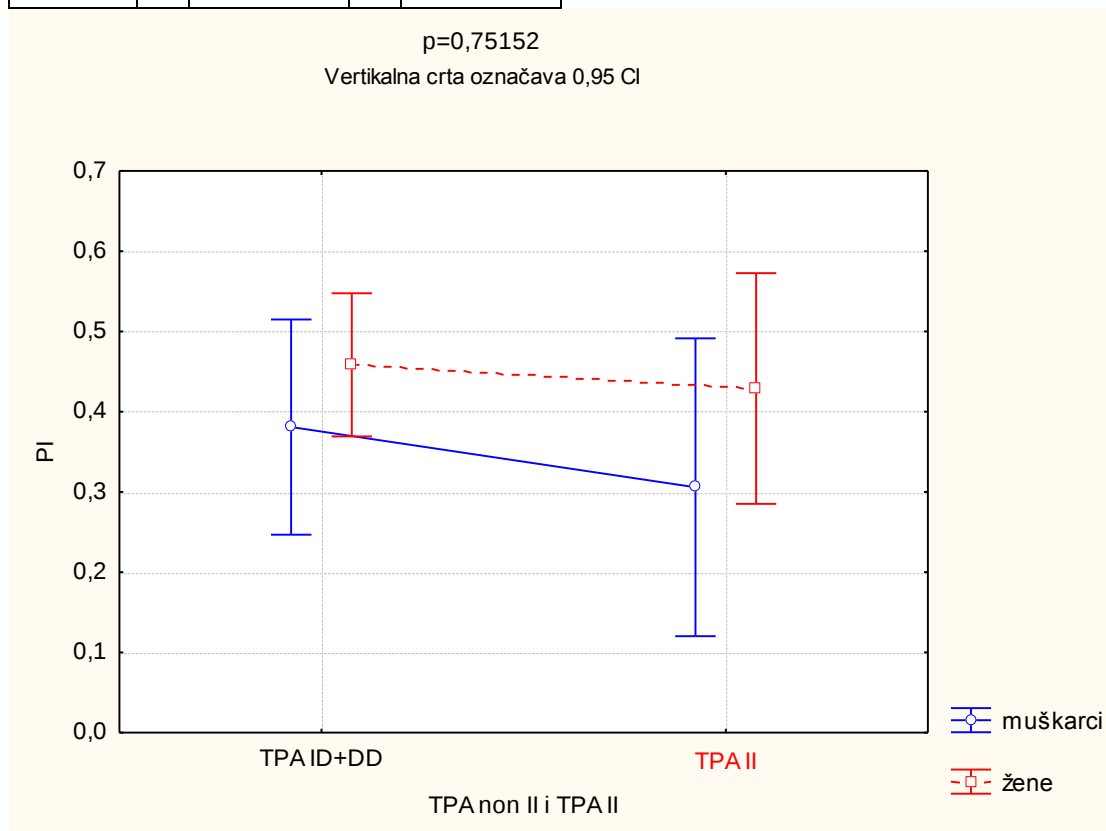
Genotip	MS bolesnici s PP tijekom bolesti	
	N	PI ($\bar{x} \pm SD$)
TPA II	2	0,2500
TPA ID+DD	6	0,6967 $\pm$ 0,1589



Slika 9. Progresijski indeks (PI) u PP bolesnika s obzirom na njihov TPA genotip.

U bolesnika s SP+RR tijekom bolesti PI nije ovisio o TPA genotipu (p=0,751) (slika 10).

Genotip	MS bolesnici s RR+SP tijekom bolesti			
	Muškarci		Žene	
	N	PI ($\bar{x} \pm SD$)	N	PI ($\bar{x} \pm SD$)
TPA II	12	0,3058 $\pm$ 0,168	20	0,4290 $\pm$ 0,297
TPA ID+DD	23	0,3809 $\pm$ 0,352	52	0,4585 $\pm$ 0,346

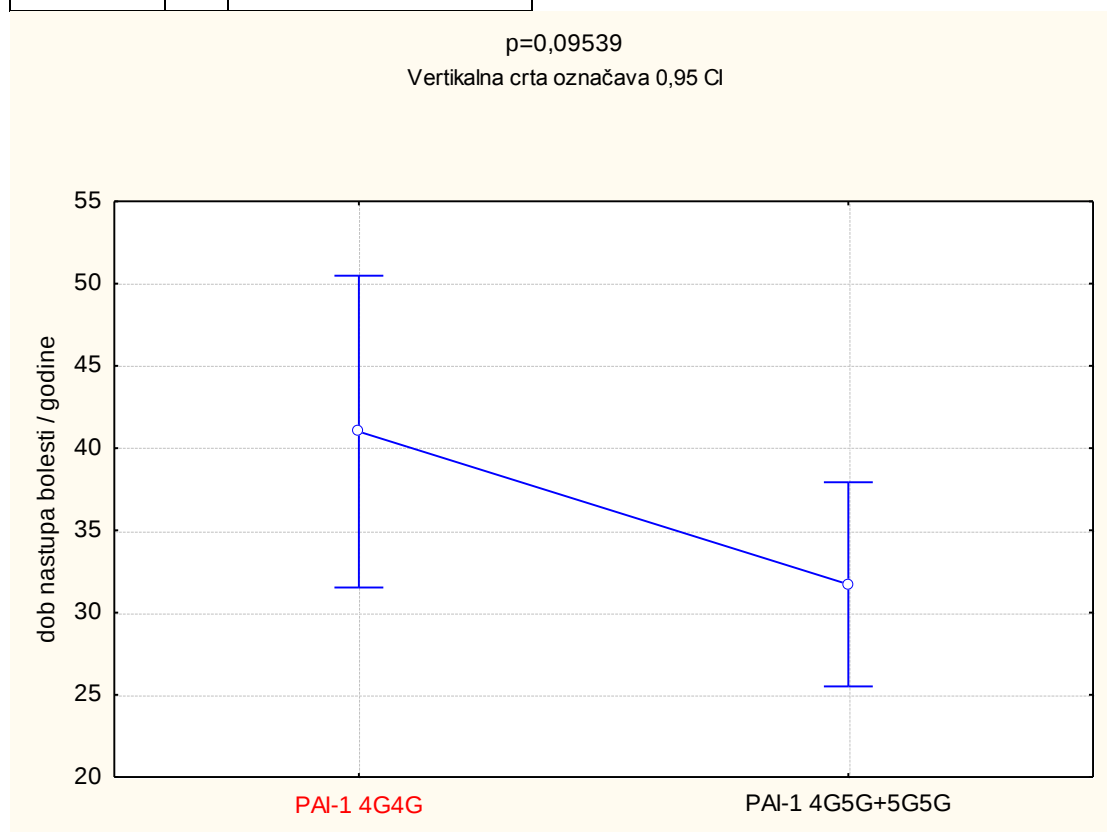


Slika 10. Progresijski indeks (PI) u RR+SP bolesnika s obzirom na njihov TPA genotip.

4.3.2. Utjecaj 4G/5G polimorfizma PAI-1 gena na kliničku ekspresiju MS

Kod bolesnika s PP tijekom i 4G5G+5G5G genotipom bolest počinje deset godina ranije ($31,7 \pm 7,2$) u odnosu na bolesnike s genotipom 4G4G ($41,0 \pm 7,0$), ali razlika ipak nije statistički značajna ($p=0,095$) (slika 11).

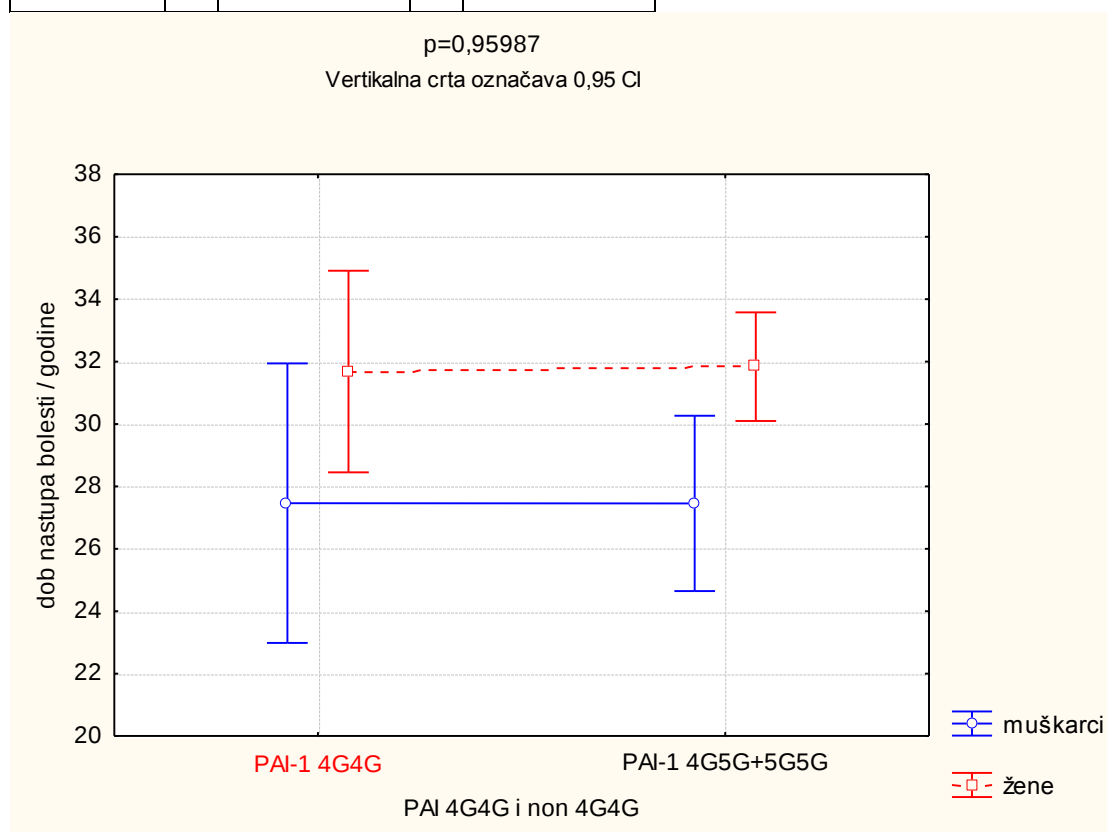
Genotip	MS bolesnici s PP tijekom bolesti	
	N	Dob nastupa bolesti ($\bar{x} \pm SD$)
4G4G	3	$41,000 \pm 7,000$
4G5G+5G5G	7	$31,7143 \pm 7,1580$



Slika 11. Srednja dob nastupa bolesti (godine) u PP bolesnika s obzirom na njihov PAI-1 genotip.

U bolesnika s RR+SP tijekom bolesti dob nastupa u muškaraca i u žena je ista, bez obzira na PAI-1 genotip ($p=0,960$) (slika 12).

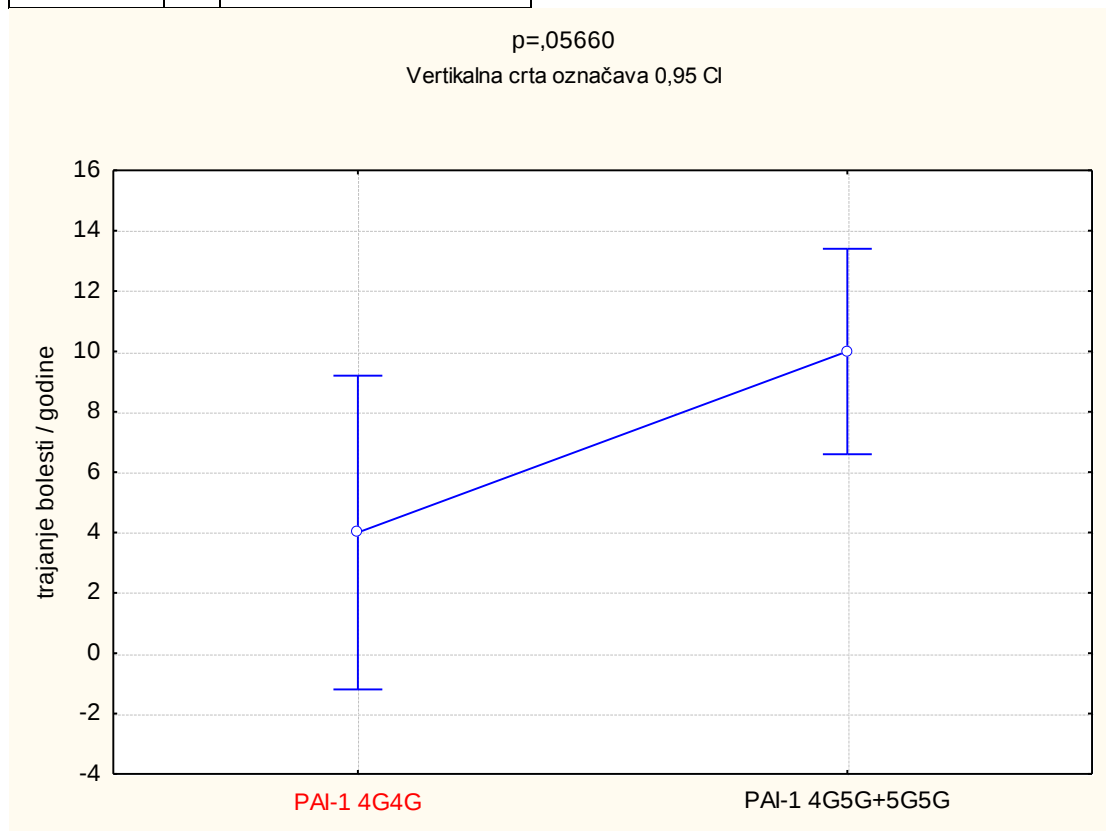
Genotip	MS bolesnici s RR+SP tijekom bolesti			
	Muškarci		Žene	
	N	Dob nastupa bolesti ($\bar{x} \pm SD$)	N	Dob nastupa bolesti ($\bar{x} \pm SD$)
4G4G	13	27,46 $\pm$ 6,41	25	31,68 $\pm$ 9,34
4G5G+5G5G	35	27,45 $\pm$ 7,27	86	31,84 $\pm$ 8,36



Slika 12. Srednja dob nastupa bolesti (godine) u RR+SP bolesnika s obzirom na njihov PAI-1 genotip.

Trajanje bolesti u bolesnika s PP tijekom bolesti i genotipom 4G4G je šest godina kraće u odnosu na trajanje bolesti u nosilaca 4G5G+5G5G genotipa, a razlika u dužini trajanja je na granici statističke značajnosti ($p=0,057$) (slika 13).

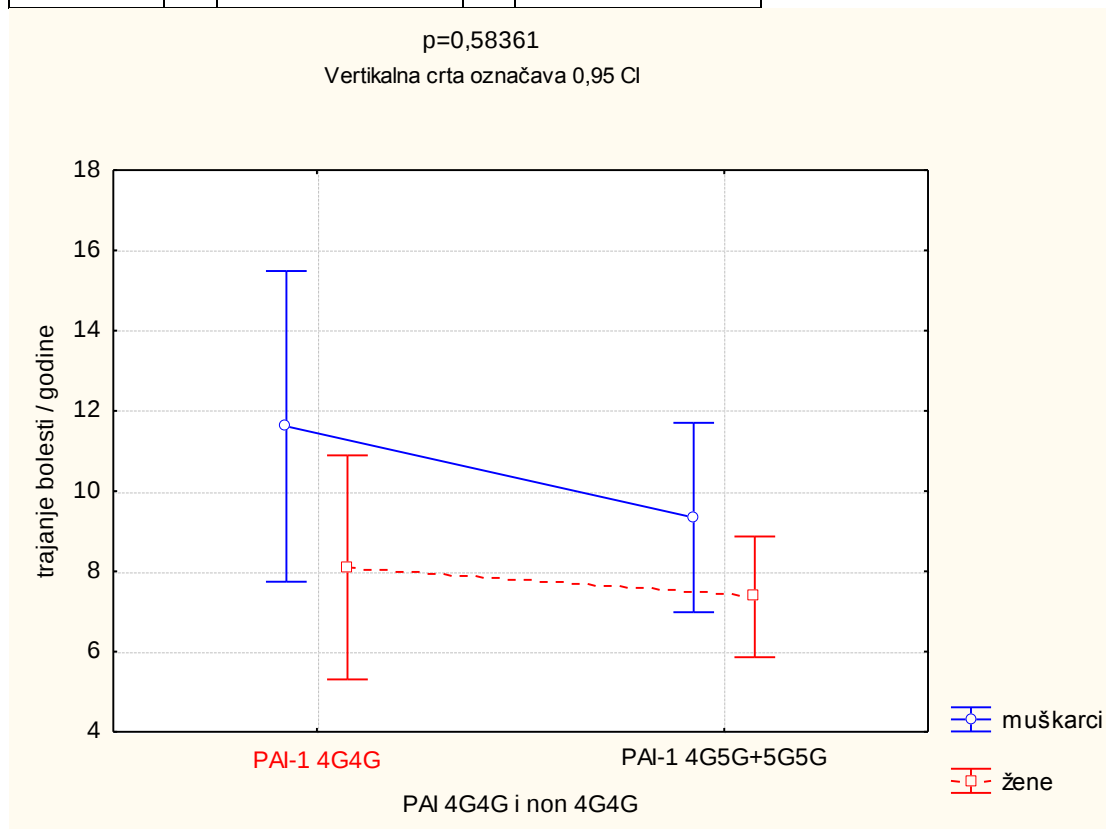
Genotip	MS bolesnici s PP tijekom bolesti	
	N	Trajanje bolesti (x±SD)
4G4G	3	4,000±
4G5G+5G5G	7	10,000±



Slika 13. Prosječno trajanje bolesti (godine) u PP bolesnika s obzirom na njihov PAI-1 genotip.

Kod MS bolesnika s RR+SP tijekom (muškaraca i žena) nije nađena statistički značajna razlika u trajanju bolesti s obzirom na PAI-1 genotip (p=0,584) (slika 14).

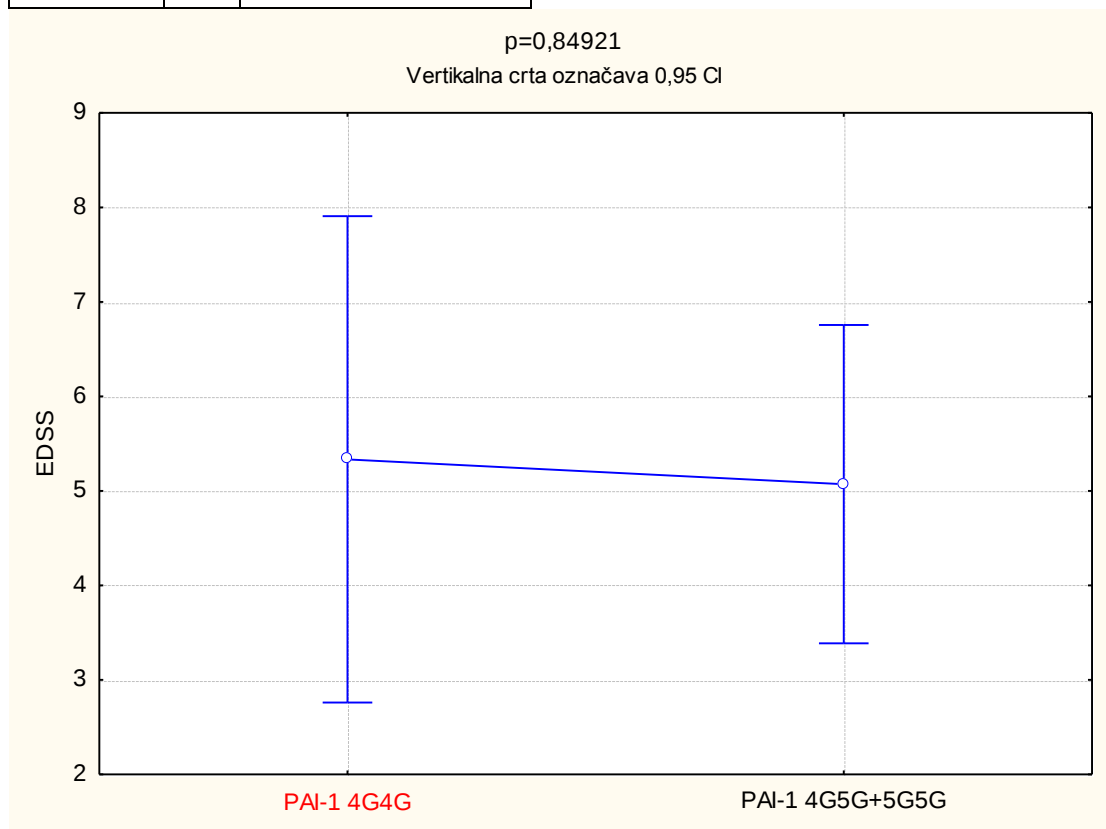
Genotip	MS bolesnici s RR+SP tijekom bolesti			
	Muškarci		Žene	
	N	Trajanje bolesti (x±SD)	N	Trajanje bolesti (x±SD)
4G4G	13	11,61±7,27	25	8,10±8,60
4G5G+5G5G	35	9,34±7,63	86	7,37±6,28



Slika 14. Prosječno trajanje bolesti (godine) u RR+SP bolesnika s obzirom na njihov PAI-1 genotip.

U skupini MS bolesnika s PP tijekom, razlika u stupnju invalidnosti između nosilaca 4G4G i 4G5G+5G5G genotipova je minimalna (p=0,849) (slika 15).

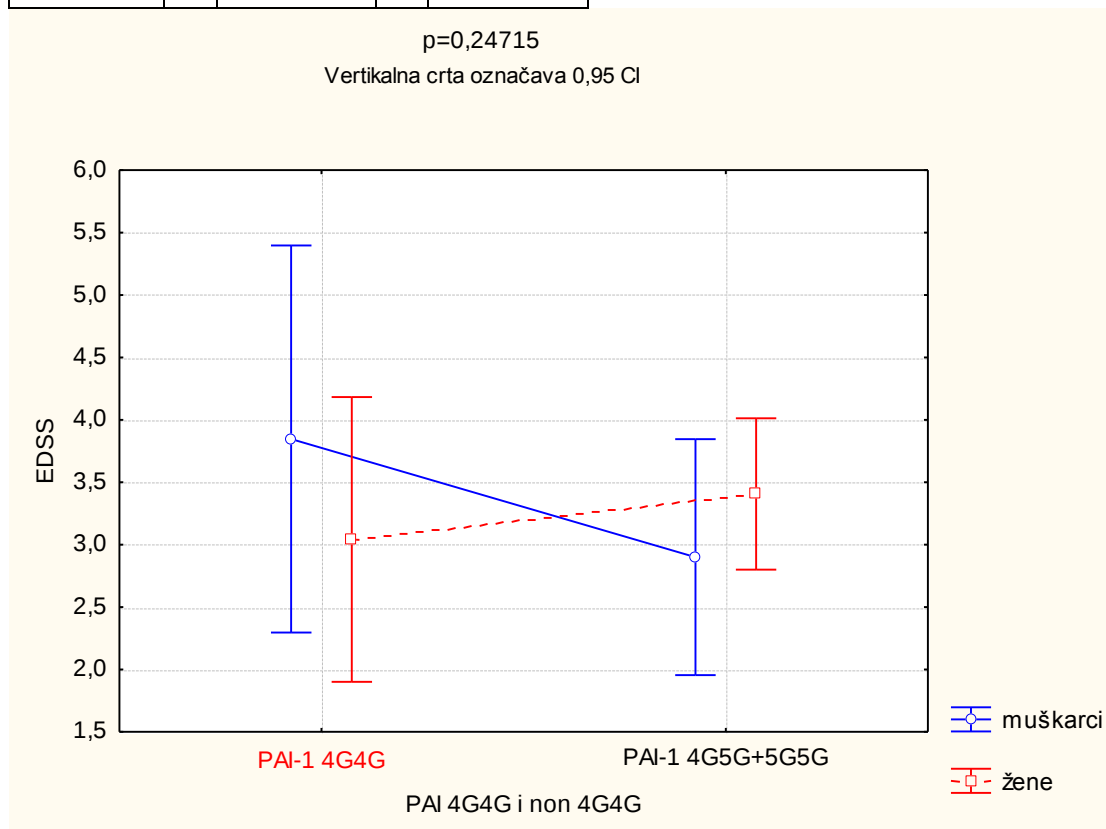
Genotip	MS bolesnici s PP tijekom bolesti	
	N	EDSS ($\bar{x} \pm SD$)
4G4G	3	5,3333 $\pm$ 2,5166
4G5G+5G5G	7	5,0714 $\pm$ 1,6938



Slika 15. Stupanj invalidnosti (EDSS) u PP bolesnika s obzirom na njihov PAI-1 genotip.

Razlika u stupnju invaliditeta u bolesnika i bolesnica s RR+SP tijekovima bolesti s obzirom na prisutni PAI-1 genotip nije statistički značajna (p=0,247) (slika 16).

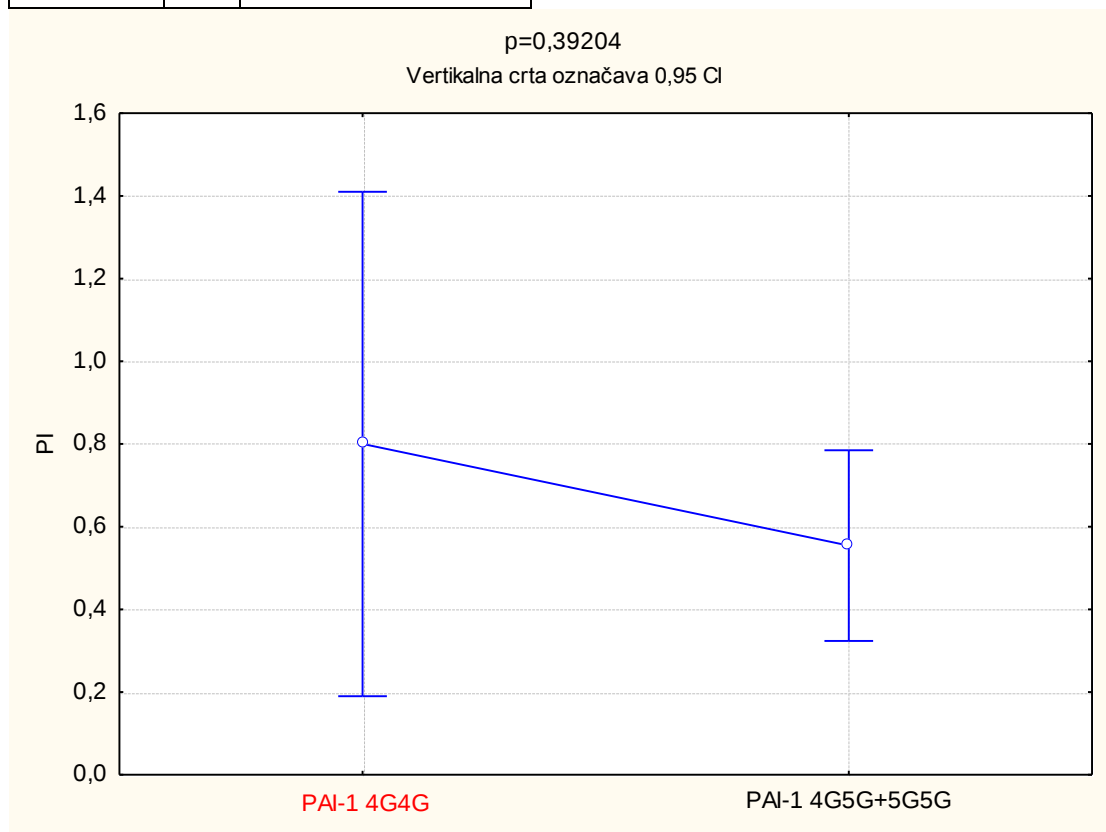
Genotip	MS bolesnici s RR+SP tijekom bolesti			
	Muškarci		Žene	
	N	EDSS ($\bar{x} \pm SD$)	N	EDSS ($\bar{x} \pm SD$)
4G4G	13	3,85 $\pm$ 2,71	86	3,04 $\pm$ 2,37
4G5G+5G5G	35	2,90 $\pm$ 1,58	25	3,40 $\pm$ 3,31



Slika 16. Stupanj invalidnosti (EDSS) u RR+SP bolesnika s obzirom na njihov PAI-1 genotip.

Vrijednost PI kod MS bolesnika s PP tijekom bolesti ne ovisi o PAI-1 genotipu (p=0,392) (slika 17).

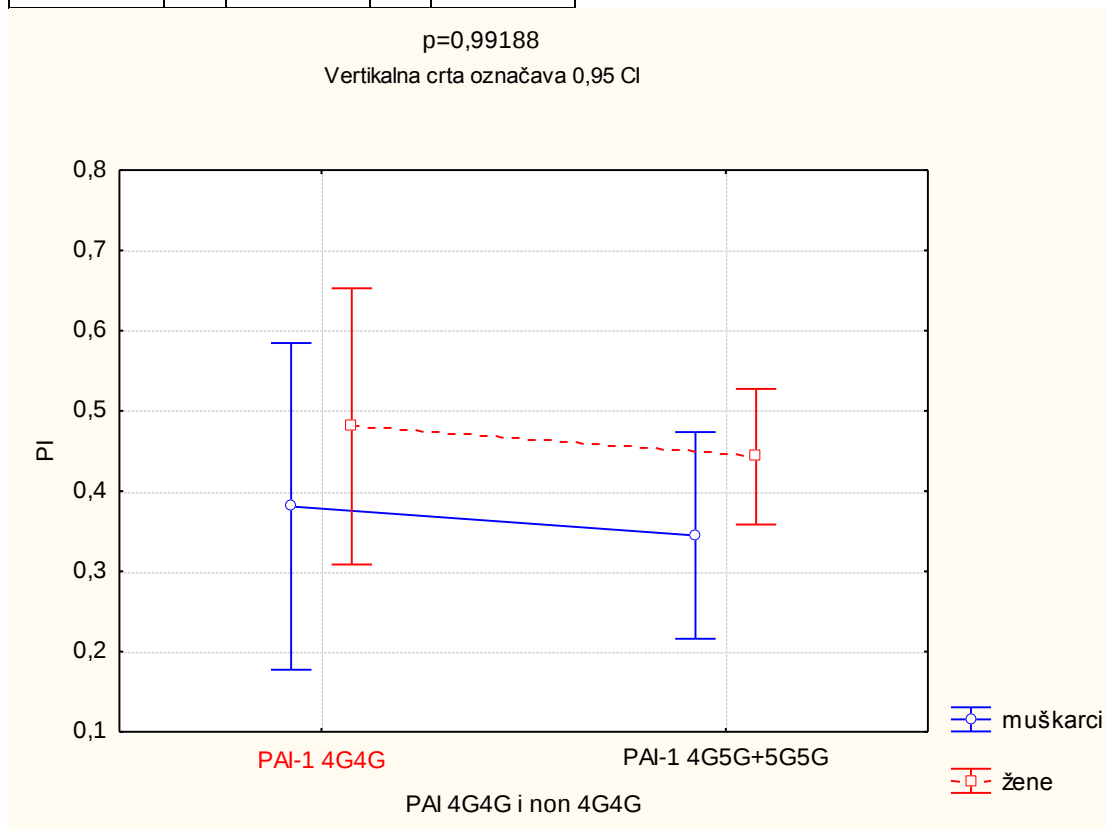
Genotip	MS bolesnici s PP tijekom bolesti	
	N	PI ($\bar{x} \pm SD$)
4G4G	1	0,8
4G5G+5G5G	7	0,5543 $\pm$ 0,2492



Slika 17. Progresijski indeks (PI) u PP bolesnika s obzirom na njihov PAI-1 genotip.

U MS bolesnika s RR+SP tijekom bolesti razlike u vrijednosti PI s obzirom na PAI-1 genotip nisu pokazale statističku značajnost (p=0,992) (slika 18).

Genotip	MS bolesnici s RR+SP tijekom bolesti			
	Muškarci		Žene	
	N	PI (x±SD)	N	PI (x±SD)
4G4G	10	0,38±0,25	14	0,48±0,33
4G5G+5G5G	25	0,34±0,32	58	0,44±0,33

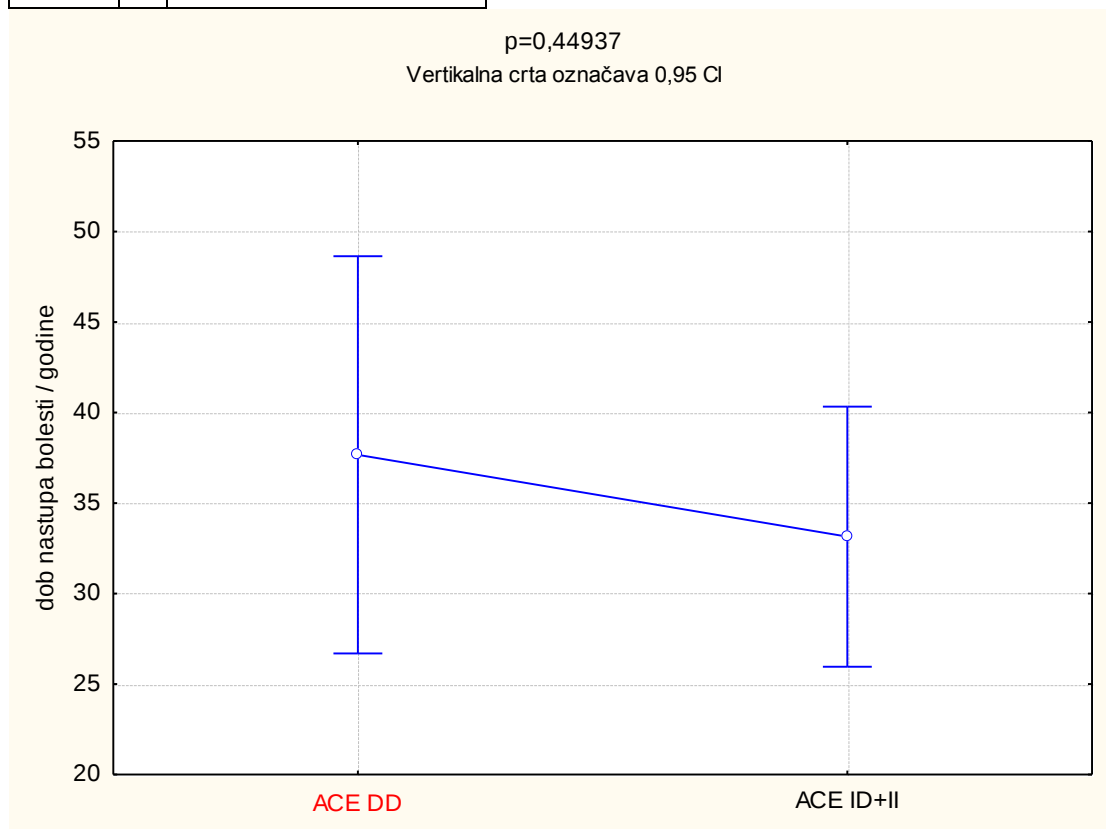


Slika 18. Progresijski indeks (PI) u RR+SP bolesnika s obzirom na njihov PAI-1 genotip.

4.3.3. Utjecaj I/D polimorfizma ACE gena na kliničku ekspresiju MS

U MS bolesnika s PP tijekom bolesti i DD genotipom bolest počinje kasnije ($37,7 \pm 12,3$) u odnosu na one s genotipovima ID+II ($33,1 \pm 6,3$), ali razlika nije statistički značajna ($p=0,449$) (slika 19).

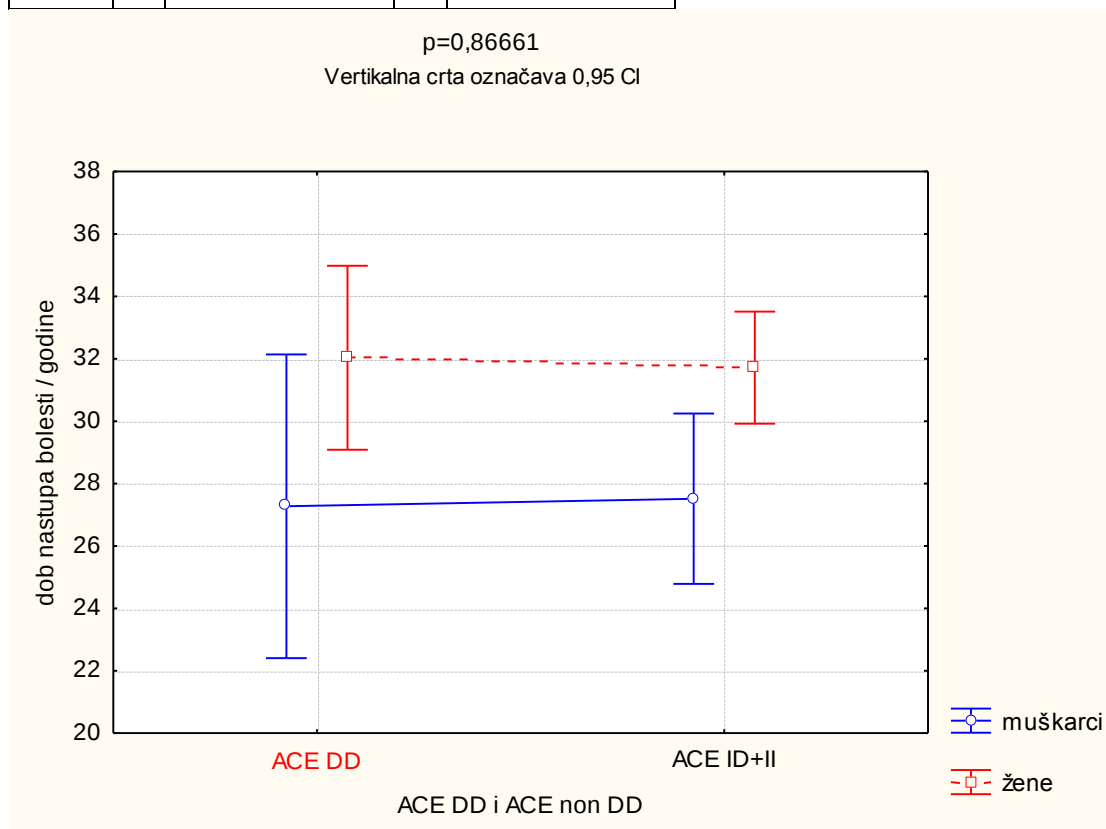
Genotip	MS bolesnici s PP tijekom bolesti	
	N	Dob nastupa bolesti (x±SD)
DD	3	37,6666±12,3423
ID+II	7	33,1429±6,3095



Slika 19. Srednja dob nastupa bolesti (godine) u PP bolesnika s obzirom na njihov ACE genotip.

Početak bolesti ne ovisi o ACE genotipu kod bolesnika s RR+SP tijekom bolesti u oba spola (slika 20).

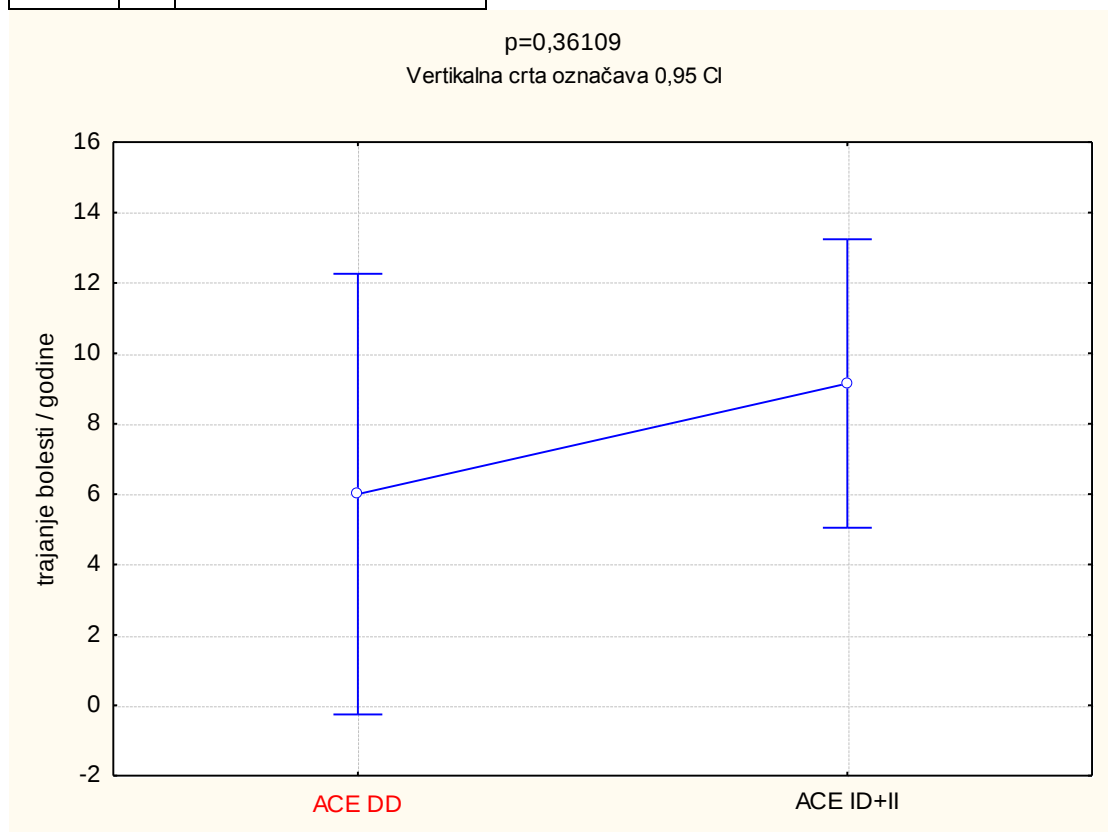
Genotip	MS bolesnici s RR+SP tijekom bolesti			
	Muškarci		Žene	
	N	Dob nastupa bolesti ($\bar{x} \pm SD$)	N	Dob nastupa bolesti ($\bar{x} \pm SD$)
DD	11	27,27273 $\pm$ 3,690282	30	32,03333 $\pm$ 7,792496
ID+II	35	27,51429	81	31,71605 $\pm$ 8,856120



Slika 20. Srednja dob nastupa bolesti (godine) u RR+SP bolesnika s obzirom na njihov ACE genotip.

U bolesnika s PP tijekom bolesti i DD genotipom bolest je trajala kraće ($6,0 \pm 8,7$) u odnosu na one s ACE genotipom ID+II ($9,1 \pm 2,1$), ali razlika nije statistički značajna ($p=0,361$) (slika 21).

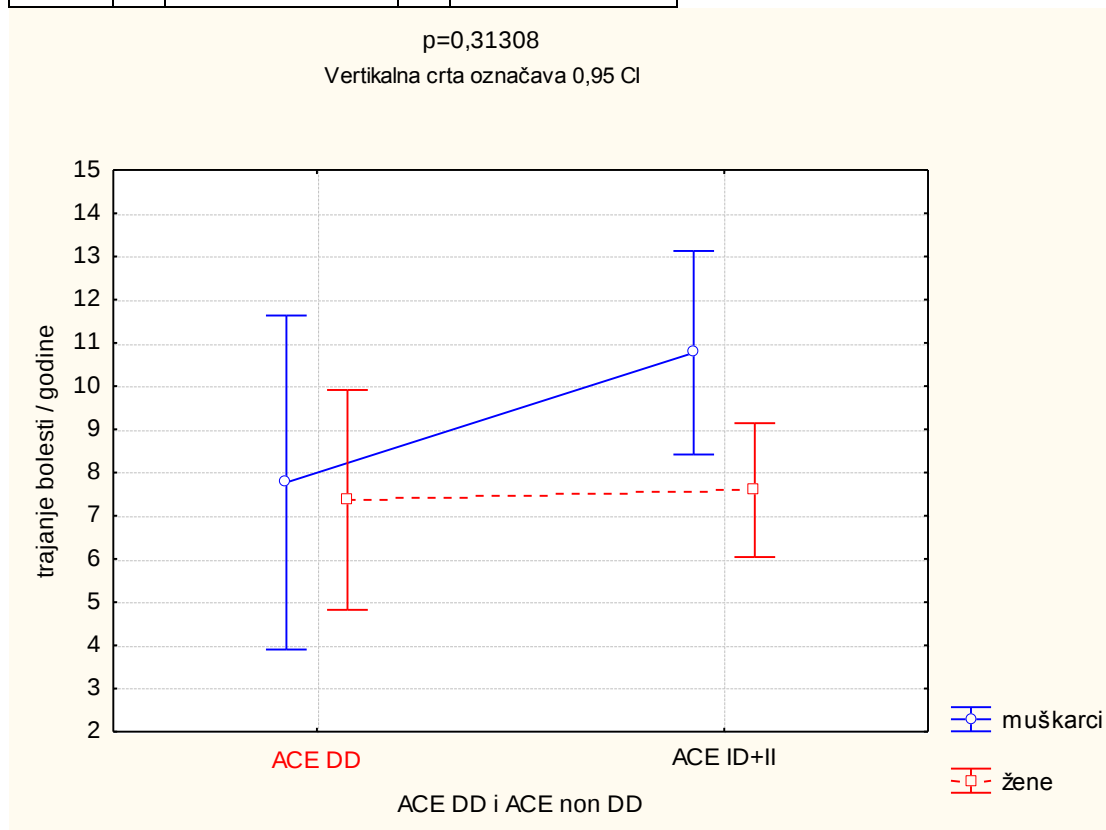
Genotip	MS bolesnici s PP tijekom bolesti	
	N	Trajanje bolesti ($\bar{x} \pm SD$)
DD	3	6,0000 $\pm$ 8,6602
ID+II	7	9,1429 $\pm$ 2,1157



Slika 21. Prosječno trajanje bolesti (godine) u PP bolesnika s obzirom na njihov ACE genotip.

Trajanje bolesti u RR+SP bolesnika oba spola bilo je podjednako bez obzira na PAI-1 genotip (p=0,313) (slika 22).

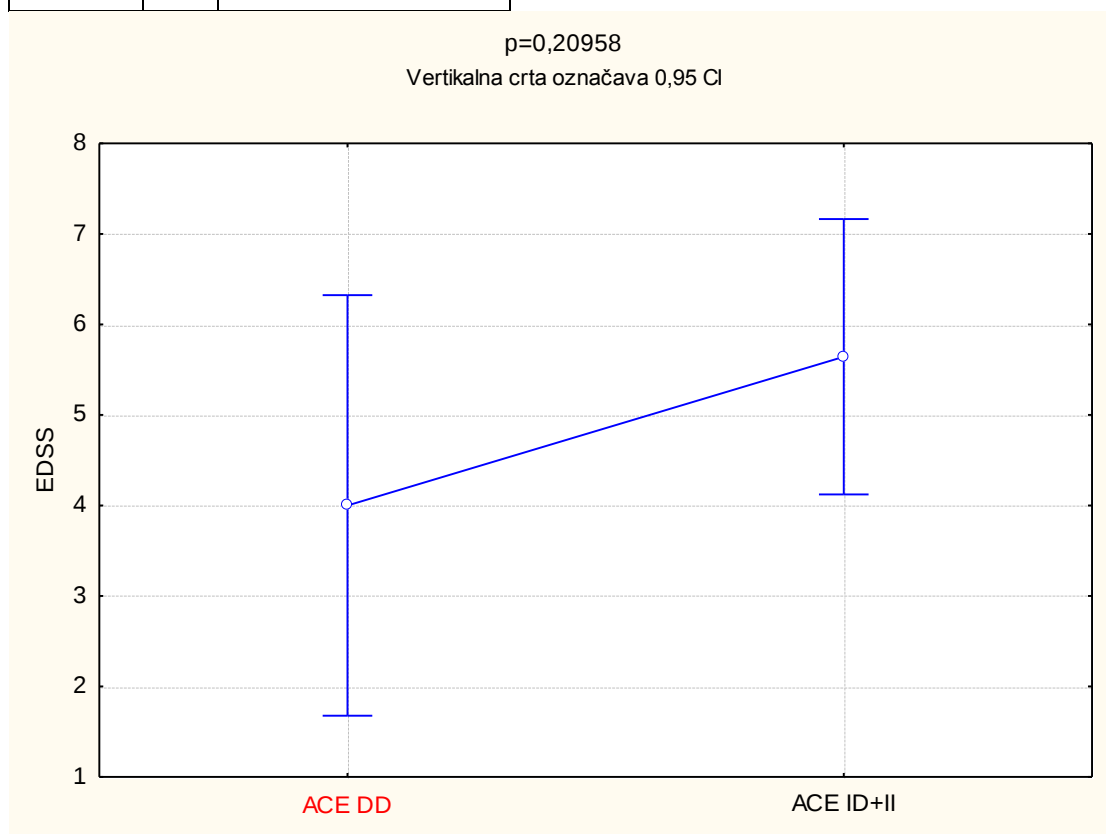
Genotip	MS bolesnici s RR+SP tijekom bolesti			
	Muškarci		Žene	
	N	Trajanje bolesti ($\bar{x} \pm SD$)	N	Trajanje bolesti ($\bar{x} \pm SD$)
DD	13	27,27 $\pm$ 3,69	30	32,03 $\pm$ 7,79
ID+II	35	27,51 $\pm$ 7,76	81	31,72 $\pm$ 8,86



Slika 22. Prosječno trajanje bolesti (godine) u RR+SP bolesnika s obzirom na njihov ACE genotip.

EDSS u bolesnika s PP tijekom bolesti nije pokazao statistički značajnu razliku s obzirom na ACE genotip (p=0,210) (slika 23).

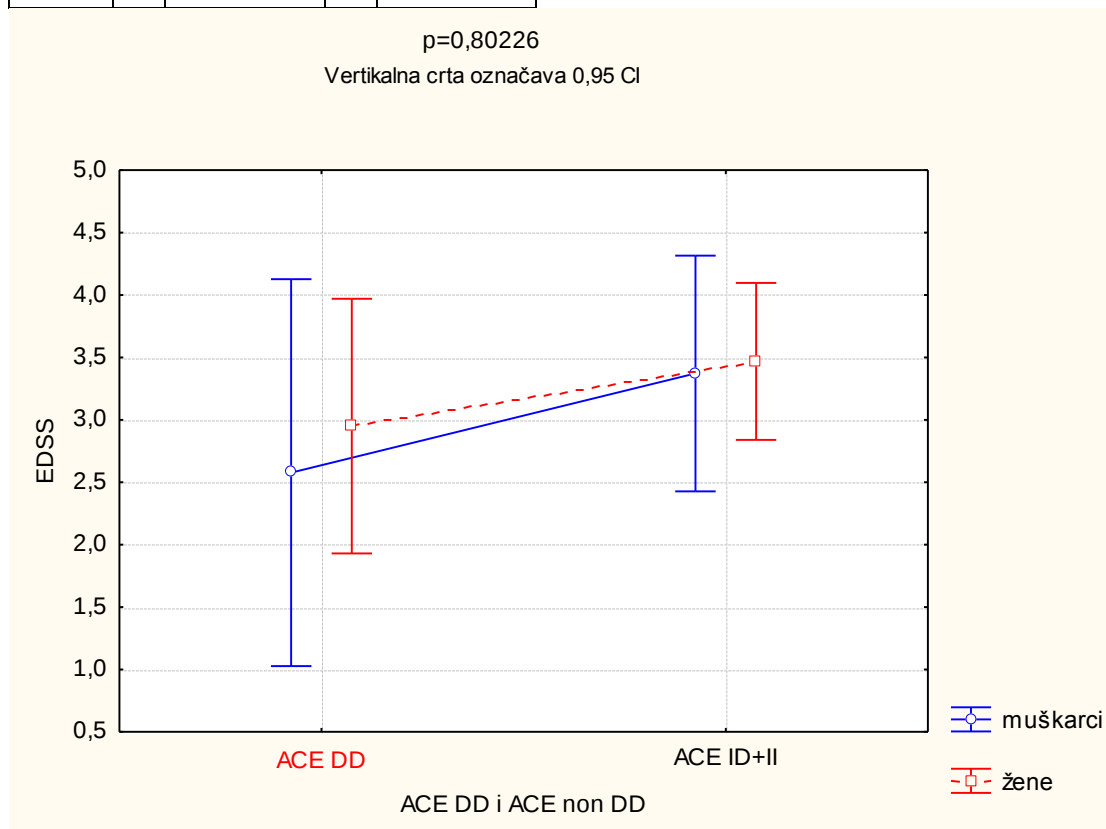
Genotip	MS bolesnici s PP tijekom bolesti	
	N	EDSS ($\bar{x} \pm SD$)
DD	3	4,0000 $\pm$ 1,0000
ID+II	7	5,6429 $\pm$ 1,9303



Slika 23. Stupanj invalidnosti (EDSS) u PP bolesnika s obzirom na njihov ACE genotip.

EDSS u RR+SP bolesnika oba spola nije značajno različit između osoba s DD i ID+II genotipovima (p=0,802) (slika 24).

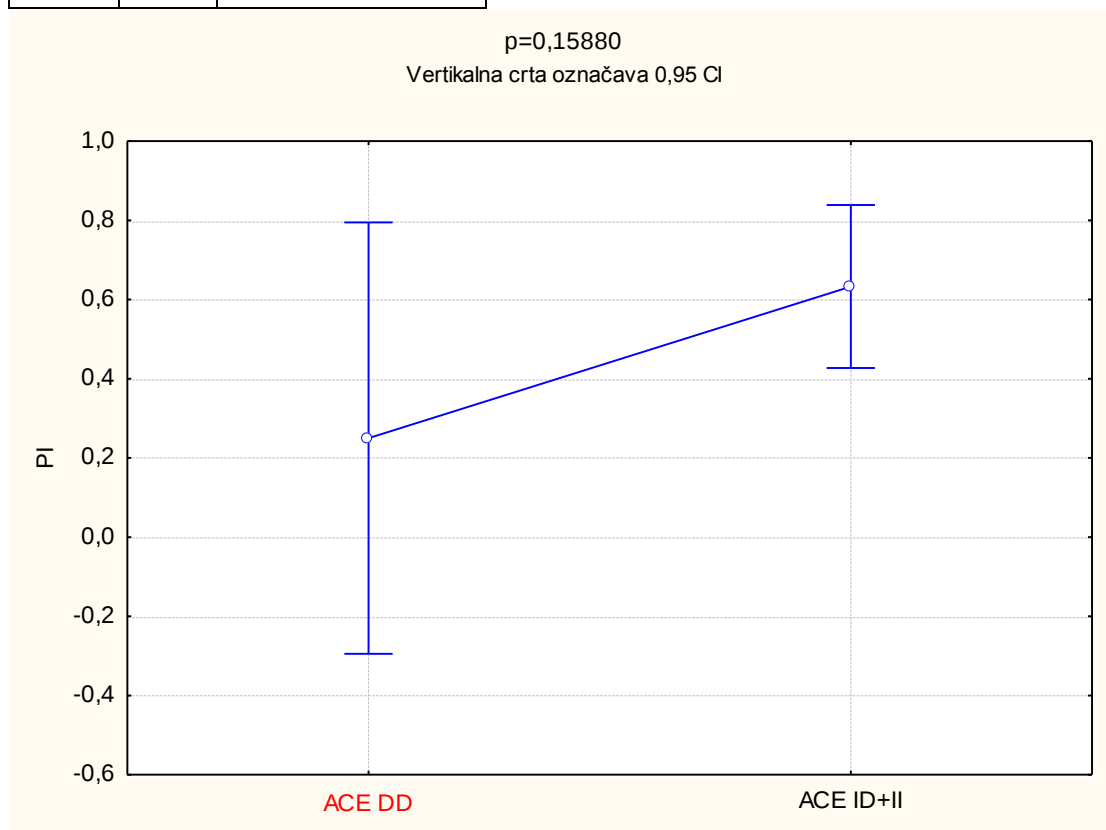
Genotip	MS bolesnici s RR+SP tijekom bolesti			
	Muškarci		Žene	
	N	EDSS (x±SD)	N	EDSS (x±SD)
DD	13	7,77±8,64	30	7,37±7,79
ID+II	35	10,77±7,03	81	7,59±6,95



Slika 24. Stupanj invalidnosti (EDSS) u RR+SP bolesnika s obzirom na njihov ACE genotip.

Svega jedan bolesnik s PP tijekom bolesti je imao DD genotip i njegov PI je bio niži (0,25) negoli PI u bolesnika s ID+II genotipovima (0,63) (slika 25).

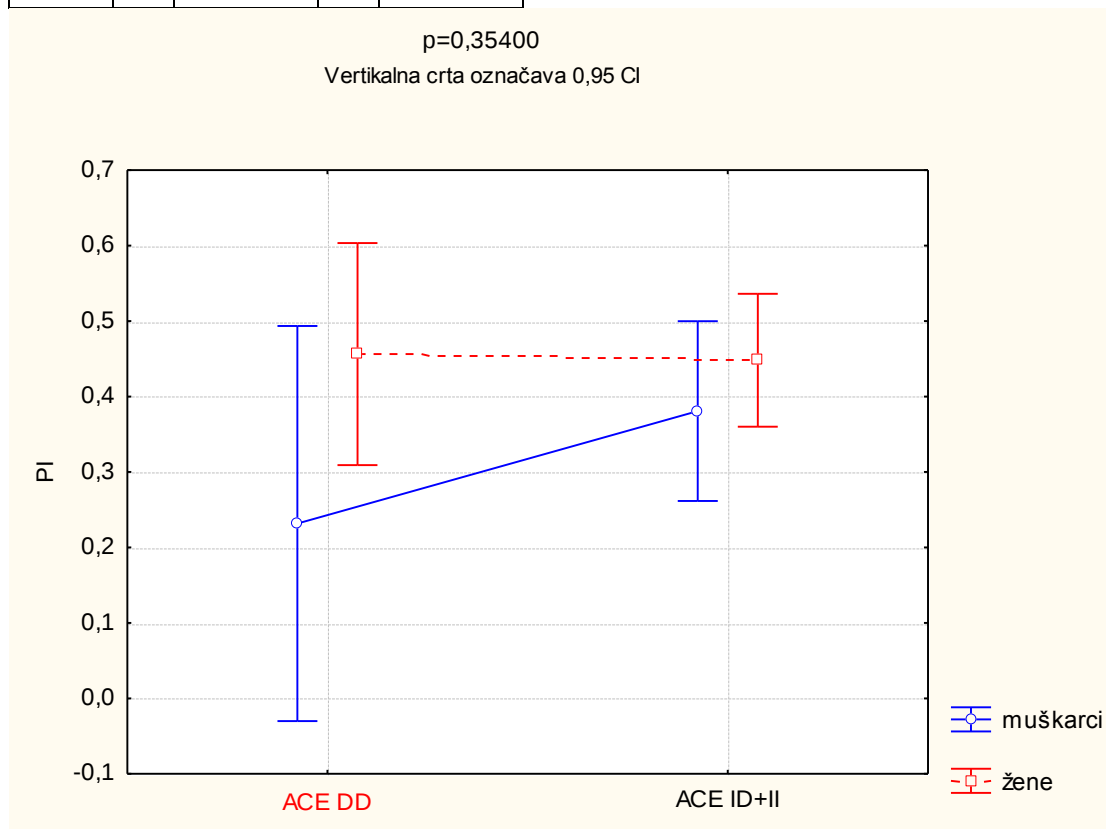
Genotip	MS bolesnici s PP tijekom bolesti	
	N	PI ($\bar{x} \pm SD$)
DD	1	0,25
ID+II	7	0,6328 $\pm$



Slika 25. Progresijski indeks (PI) u PP bolesnika s obzirom na njihov ACE genotip.

U RR+SP bolesnika muškog spola PI je viši u skupini s ID+II genotipovima ($0,38 \pm 0,32$) negoli u osoba s DD genotipom ($0,23 \pm 0,12$), dok je u bolesnika PI gotovo jednak u obje genotipske skupine, ali razlike nisu značajne ($p=0,354$) (slika 26).

Genotip	MS bolesnici s RR+SP tijekom bolesti			
	Muškarci		Žene	
	N	PI ($\bar{x} \pm SD$)	N	PI ($\bar{x} \pm SD$)
DD	6	0,23 $\pm$ 0,12	53	0,45 $\pm$ 0,33
ID+II	29	0,38 $\pm$ 0,32	19	0,45 $\pm$ 0,34



Slika 26. Progresijski indeks (PI) u RR+SP bolesnika s obzirom na njihov ACE genotip.

4.3.4. Učinak međudjelovanja gena uključenih u fibrinolizu na kliničku ekspresiju MS

Učinak međudjelovanja gena TPA, PAI-1 i ACE na kliničku ekspresiju bolesti (dob nastupa i trajanje bolesti, PI, EDSS) ispitivali smo samo u bolesnika s RR+SP

tipovima bolesti, jer je u uzorku bilo svega deset bolesnika s PP tijekom bolesti što bi dovelo u pitanje korektnost rezultata. Također su analize učinjene odvojeno kod bolesnika i bolesnica, uzimajući u obzir da se i proces fibrinolize razlikuje ovisno o spolu.

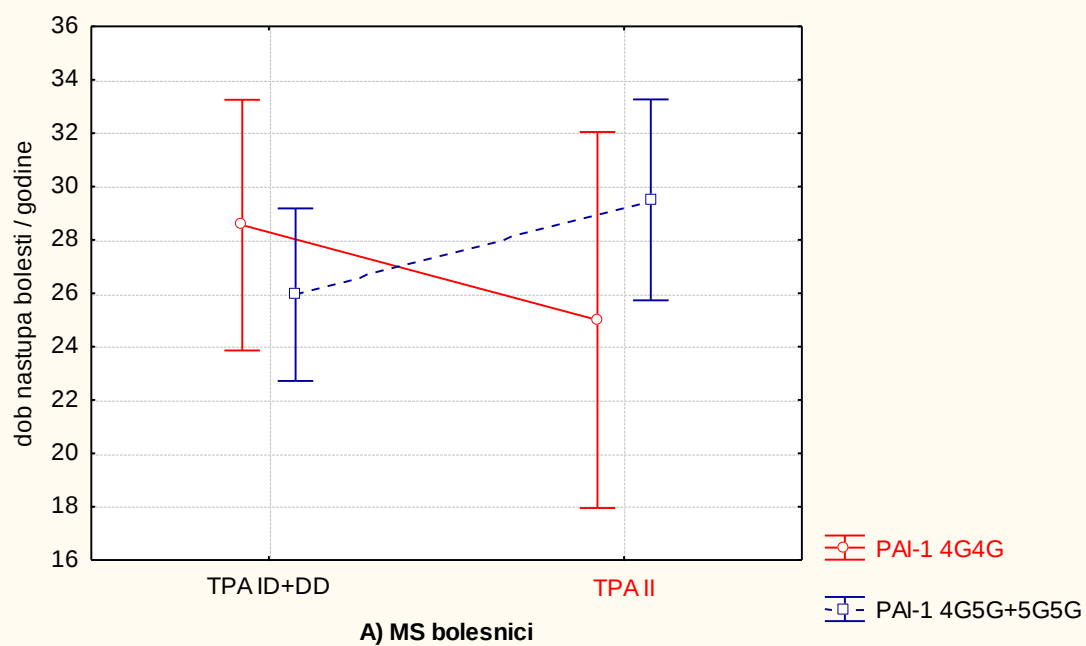
4.3.4.1. Učinak međudjelovanja TPA i PAI-1 gena na kliničku ekspresiju MS

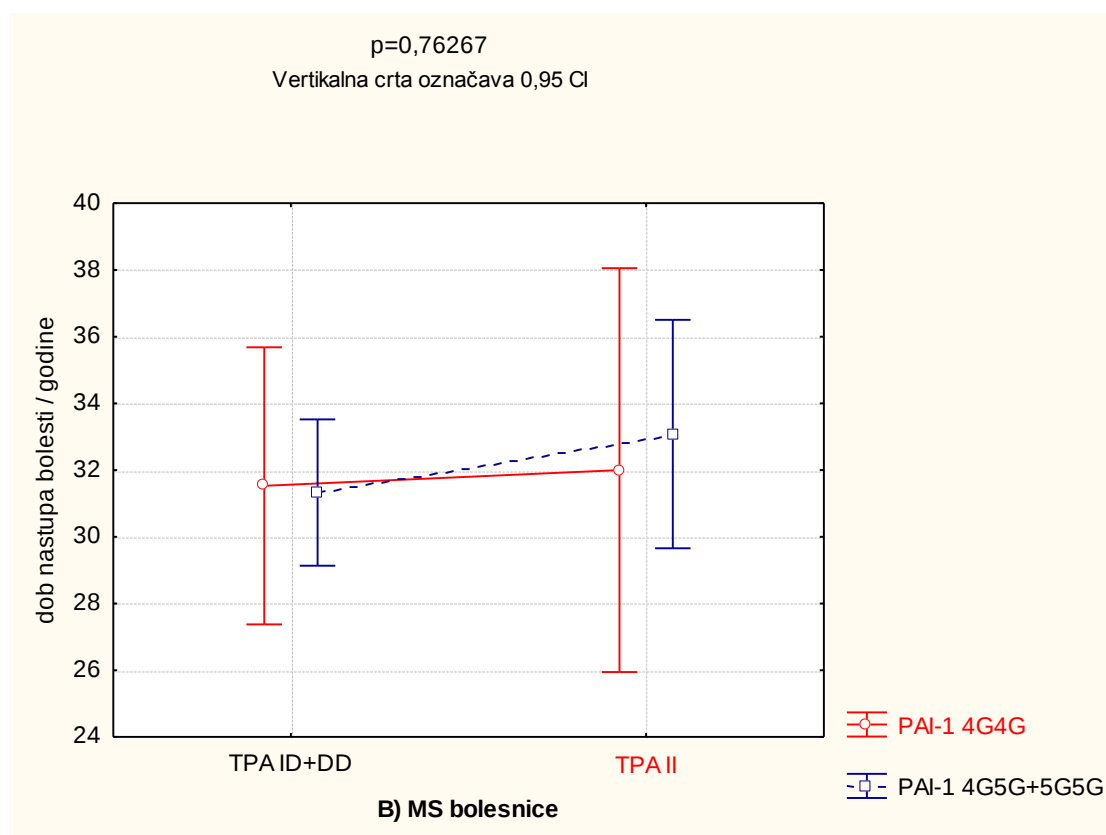
Iako je u bolesnika muškog spola uočena najniža dob početka bolesti u onih s TPA II i PAI-1 4G4G kombinacijom genotipova, učinak međudjelovanja navedenih polimorfizama nije značajno utjecao na ovu kliničku karakteristiku ($p=0,151$). Također, dob nastupa bolesti kod bolesnica ne ovisi o različitim kombinacijama genotipova TPA i PAI-1 gena ($p=0,763$) (slika 27).

TPA	PAI-1	MS bolesnici		MS bolesnice	
		N	Dob nastupa (x±SD)	N	Dob nastupa (x±SD)
II	4G4G	4	25,00±7,66	8	32,00±8,38
II	4G5G+5G5G	14	29,50±6,92	25	33,08±10,31
ID+DD	4G4G	9	28,55±5,94	17	31,53±10,00
ID+DD	4G5G+5G5G	21	25,94±7,33	61	31,32±7,46

p=0,15141

Vertikalna crta označava 0,95 CI





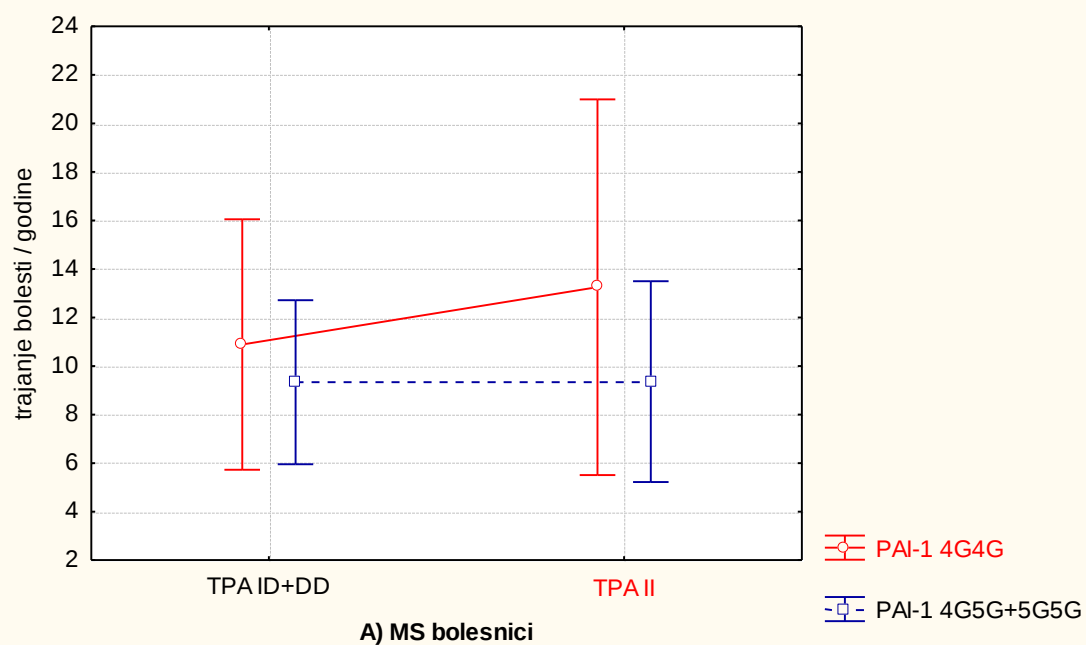
Slika 27. Učinak međudjelovanja TPA i PAI-1 polimorfizama na dob nastupa bolesti (godine) kod MS bolesnika (A) i bolesnica (B).

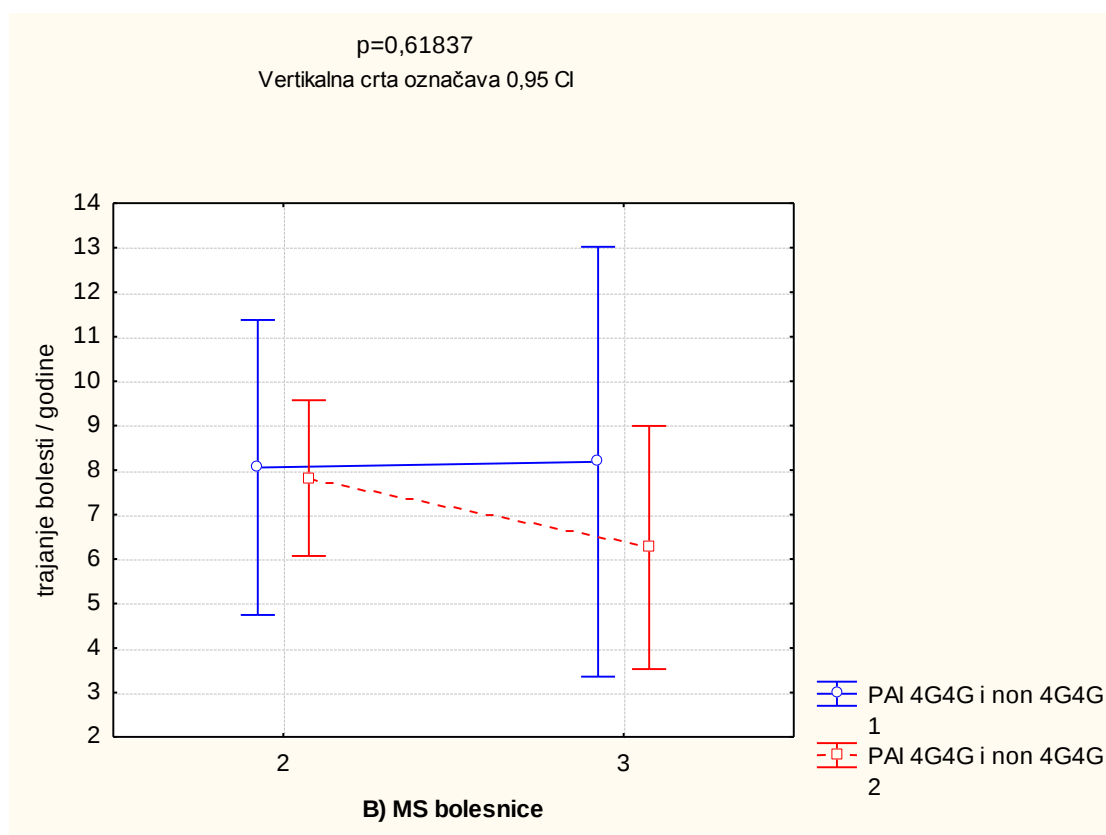
Niti trajanje bolesti nije ovisilo o različitim kombinacijama TPA i PAI-1 genotipova u skupinama muških i ženskih bolesnika ($p=0,663$ kod muškaraca, $p=0,618$ kod žena) (slika 28).

TPA	PAI-1	MS bolesnici		MS bolesnice	
		N	Trajanje bolesti (x±SD)	N	Trajanje bolesti (x±SD)
II	4G4G	4	13,25±8,38	8	8,19±5,64
II	4G5G+5G5G	14	9,36±6,67	25	6,26±5,60
ID+D	4G4G	9	10,89±7,15	17	8,06±9,86
ID+D	4G5G+5G5G	21	9,33±8,37	61	7,82±6,52

p=0,66281

Vertikalna crta označava 0,95 CI





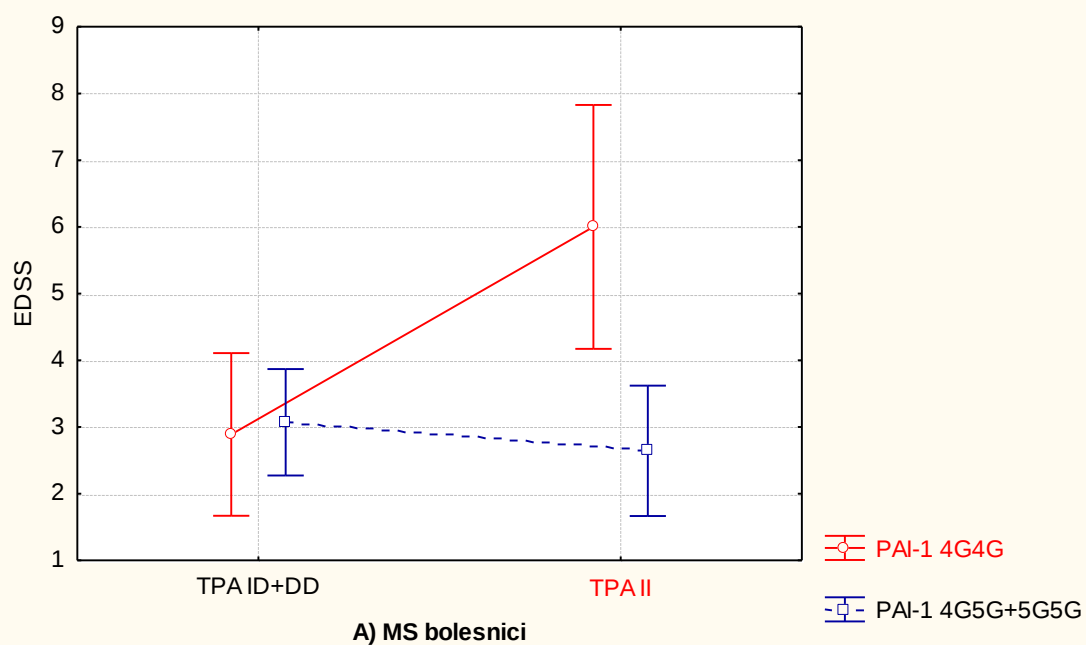
Slika 28. Učinak međudjelovanja TPA i PAI-1 polimorfizama na trajanje bolesti (godine) kod MS bolesnika (A) i bolesnica (B).

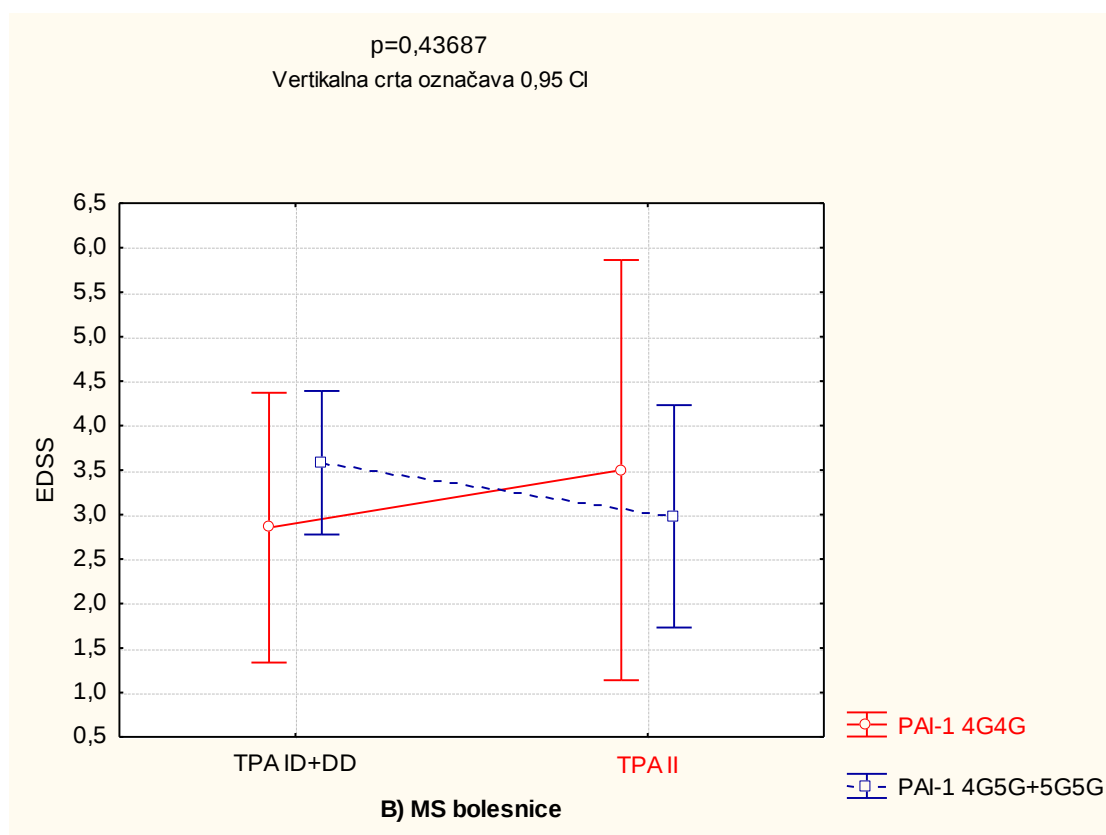
U skupini muških bolesnika EDSS je značajno ovisio o interakciji TPA i PAI-1 polimorfizama ($p=0,007$), a najviša vrijednost je uočena u osoba s kombinacijom genotipova TPA II i PAI-1 4G4G ($6,0 \pm 3,6$). U bolesnica nije bilo statistički značajne razlike u vrijednostima EDSS između skupina s različitim kombinacijama genotipova ($p=0,437$) (slika 29).

TPA	PAI-1	MS bolesnici		MS bolesnice	
		N	EDSS (x±SD)	N	EDSS (x±SD)
II	4G4G	4	6,00±3,58	8	3,50±2,36
II	4G5G+5G5G	14	2,64±1,04	25	2,98±2,48
ID+DD	4G4G	9	2,89±1,69	17	2,85±2,42
ID+DD	4G5G+5G5G	21	3,07±1,86	61	3,58±3,60

p=0,00724

Vertikalna crta označava 0,95 CI





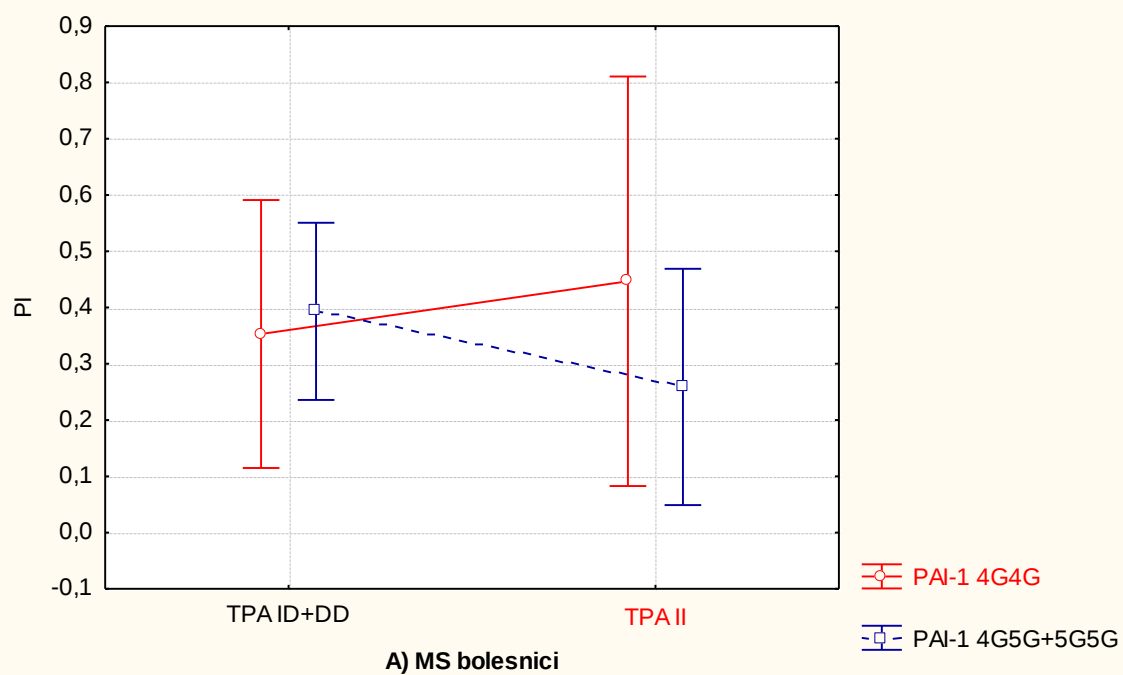
Slika 29. Učinak međudjelovanja TPA i PAI-1 polimorfizama na stupanj invalidnosti (EDSS) kod MS bolesnika (A) i bolesnica (B).

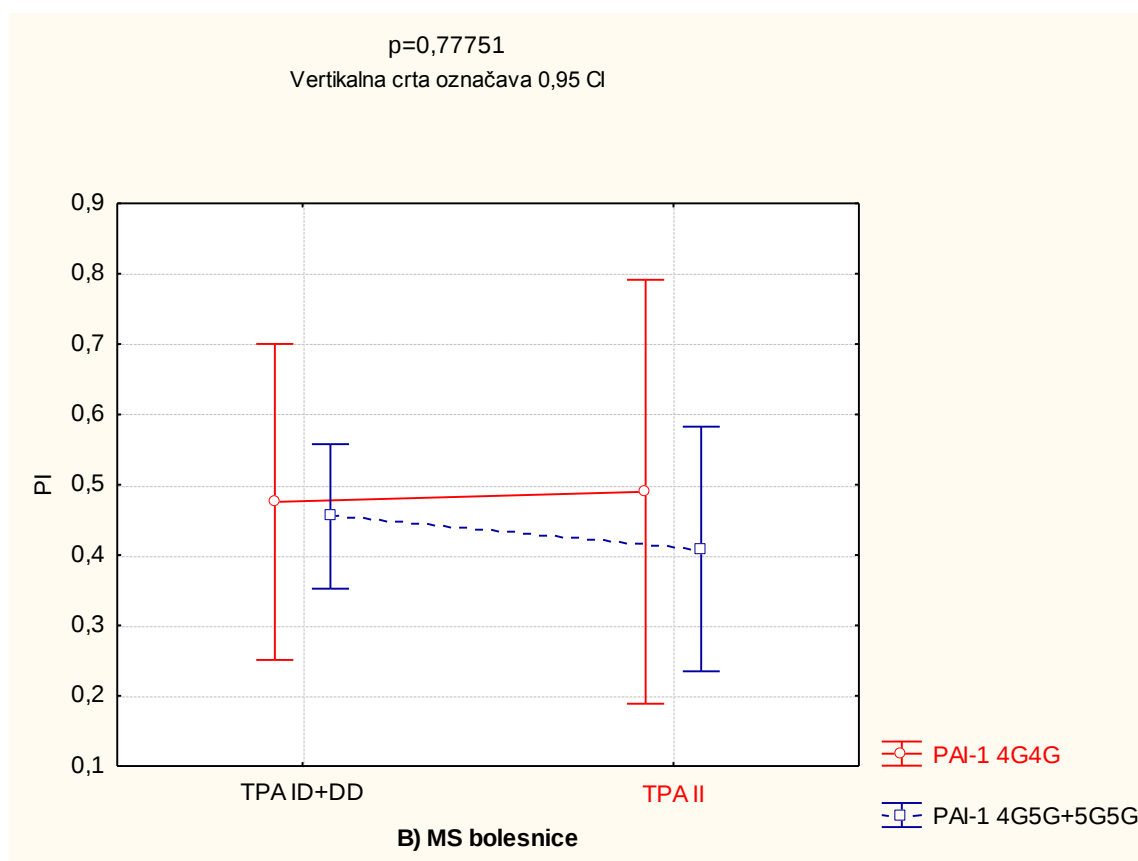
U skupinama oba spola na vrijednost PI nije utjecala različita kombinacija TPA i PAI-1 genotipova ($p=0,367$ kod muškaraca, $p=0,777$ kod žena), premda su najviše vrijednosti u obje skupine zabilježene kod ispitanika s kombinacijom TPA II i PAI-1 4G4G (slika 30).

TPA	PAI-1	MS bolesnici		MS bolesnice	
		N	PI (x±SD)	N	PI (x±SD)
II	4G4G	3	0,45±0,13	5	0,49±0,24
II	4G5G+5G5G	9	0,26±0,16	15	0,41±0,32
ID+DD	4G4G	7	0,35±0,29	9	0,47±0,39
ID+DD	4G5G+5G5G	16	0,39±0,38	43	0,45±0,34

p=0,36686

Vertikalna crta označava 0,95 CI





Slika 30. Učinak međudjelovanja TPA i PAI-1 polimorfizama na progresijski indeks (PI) kod MS bolesnika (A) i bolesnica (B).

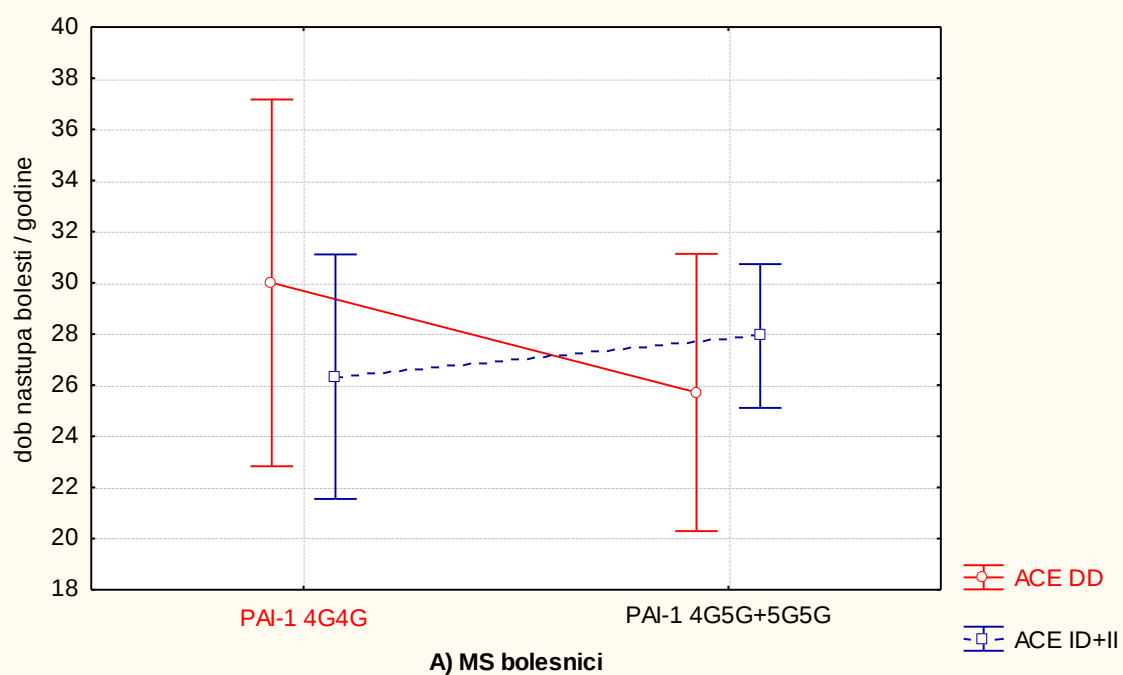
4.3.4.2. Učinak međudjelovanja ACE i PAI-1 gena na kliničku ekspresiju MS

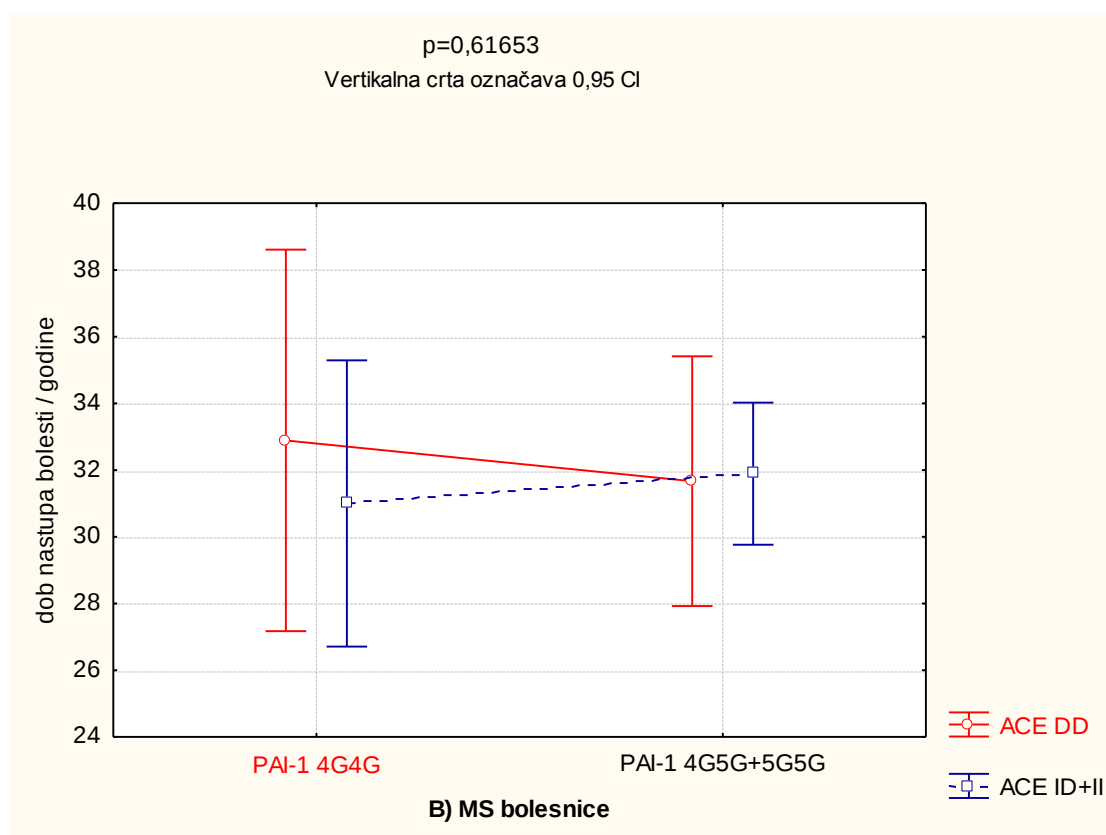
U skupinama MS bolesnika i bolesnica dob nastupa bolesti nije značajno ovisio o različitim kombinacijama ACE i PAI-1 genotipova ($p=0,268$ u muškaraca, $p=0,616$ u žena). Bolest je u obje skupine imala najkasniji početak u nosiocima ACE DD i PAI-1 4G4G genotipova (slika 31).

ACE	PAI-1	MS bolesnici		MS bolesnice	
		N	Dob nastupa (x±SD)	N	Dob nastupa (x±SD)
DD	4G4G	4	30,00±1,41	9	32,89±8,34
DD	4G5G+5G5G	9	25,71±3,73	21	31,67±7,73
ID+II	4G4G	9	26,33±7,50	16	31,00±10,05
ID+II	4G5G+5G5G	26	27,92±7,95	65	31,89±8,61

p=0,26802

Vertikalna crta označava 0,95 CI





Slika 31. Učinak međudjelovanja PAI-1 i ACE polimorfizama na dob nastupa bolesti (godine) kod MS bolesnika (A) i bolesnica (B).

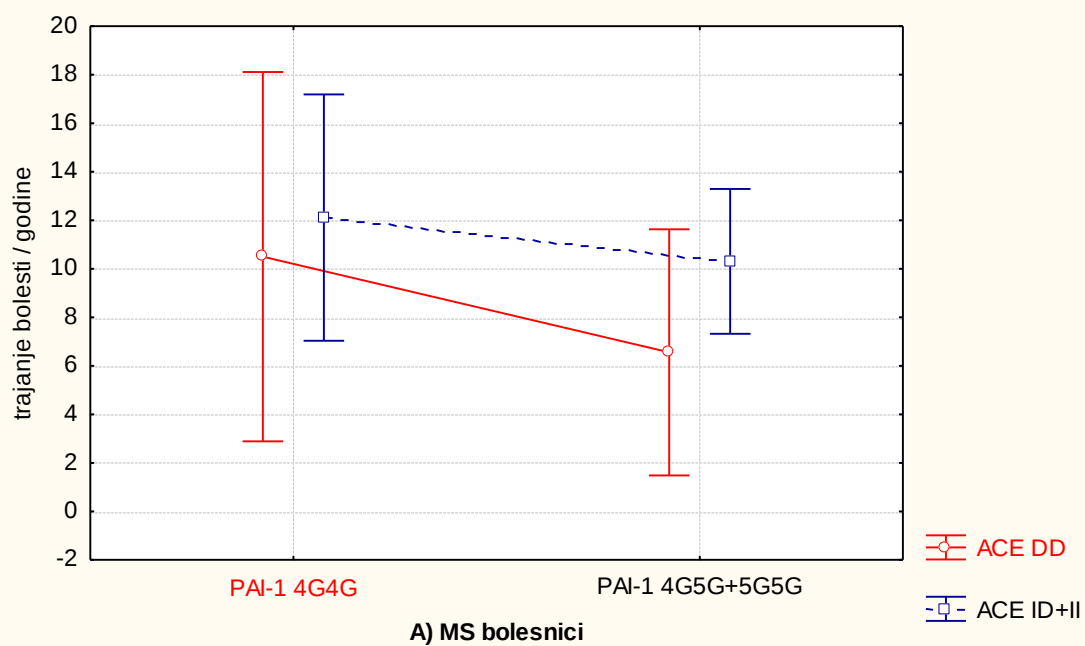
Međudjelovanje PAI-1 i ACE genotipova pokazuje da je trajanje bolesti najkraće (6,5 godina) u muških bolesnika s ACE DD i PAI-1 4G4G+4G5G genotipovima, ali u odnosu na druge kombinacije genotipova razlika nije statistički značajna ($p=0,694$) (slika 32).

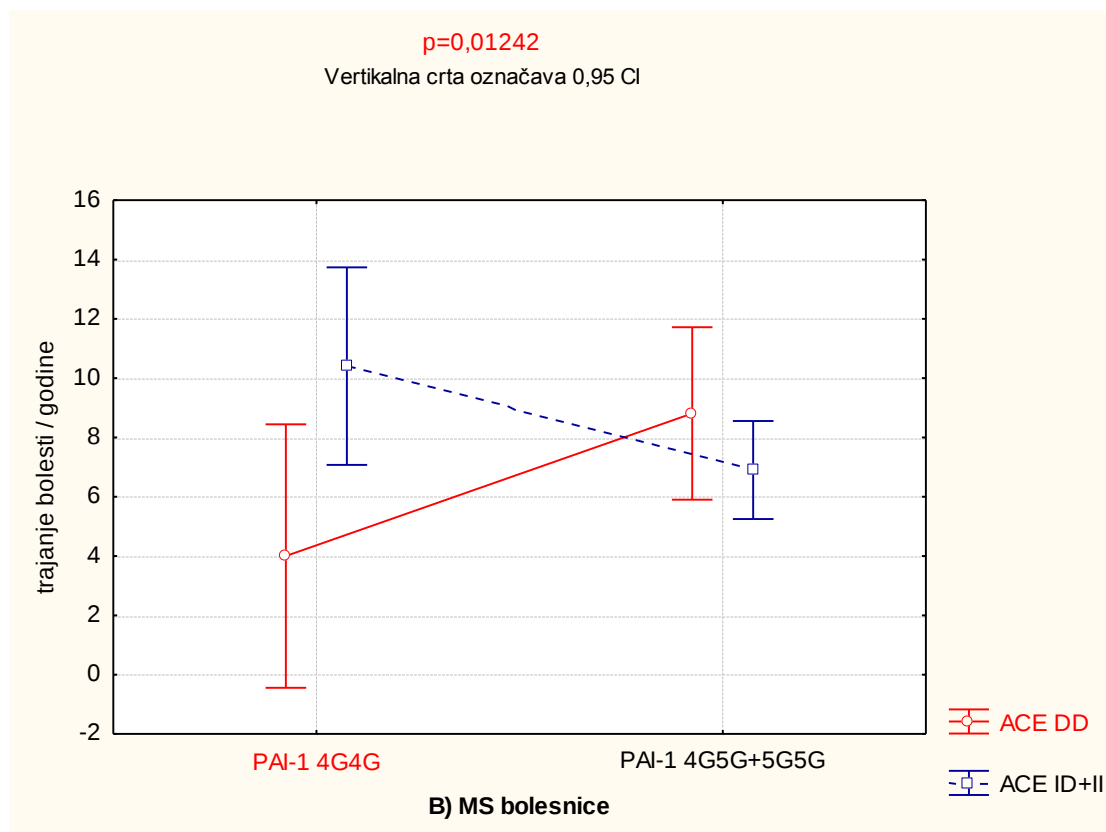
U bolesnica se pak trajanje bolesti statistički značajno razlikuje ($p=0,012$) s obzirom na interakciju PAI-1 i ACE polimorfizama. Tako u bolesnica koje imaju ACE DD i PAI-1 4G4G genotip bolest traje 2 do 6 godina kraće u odnosu na bolesnice s ostalim kombinacijama ovih genotipova (slika 32).

ACE	PAI-1	MS bolesnici		MS bolesnice	
		N	Trajanje bolesti (x±SD)	N	Trajanje bolesti (x±SD)
DD	4G4G	4	10,50±10,40	9	4,00±3,23
DD	4G5G+5G5G	9	6,55±8,12	21	8,80±7,23
ID+II	4G4G	9	12,11±6,15	16	10,40±9,86
ID+II	4G5G+5G5G	26	10,30±7,36	65	6,90±5,92

p=0,69362

Vertikalna crta označava 0,95 CI





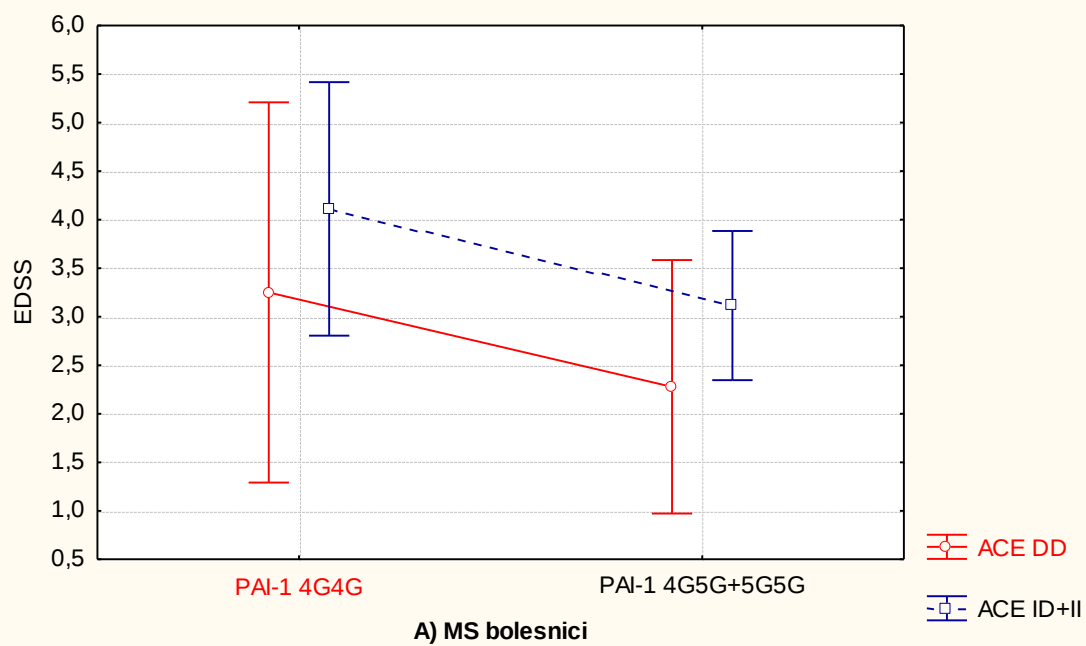
Slika 32. Učinak međudjelovanja PAI-1 i ACE polimorfizama na trajanje bolesti (godine) kod MS bolesnika (A) i bolesnica (B).

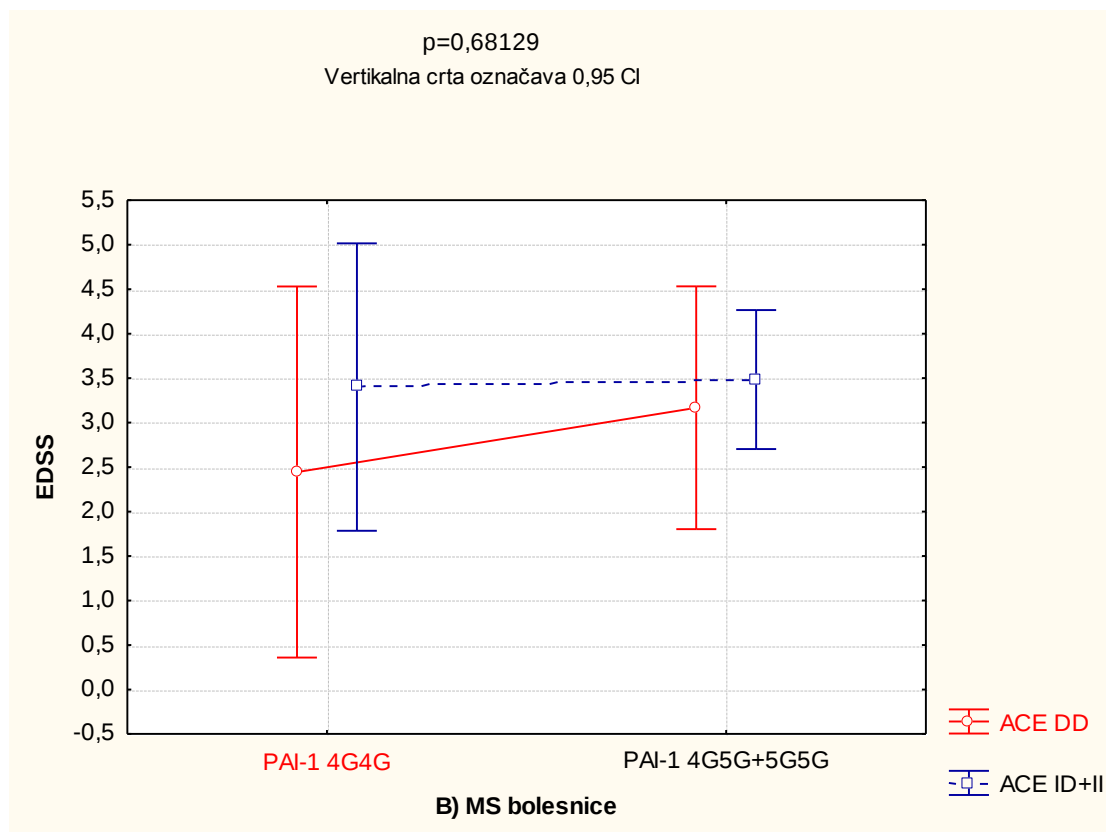
U MS bolesnika i bolesnica nije nađena statistički značajna razlika u visini EDSS-a ovisno o prisutnoj kombinaciji ACE i PAI genotipova ($p=0,987$ za muškarce i $p=0,681$ za žene) (slika 33).

ACE	PAI-1	MS bolesnici		MS bolesnice	
		N	EDSS ($\bar{x} \pm SD$)	N	EDSS ($\bar{x} \pm SD$)
DD	4G4G	4	3,25 $\pm$ 2,29	9	2,44 $\pm$ 2,13
DD	4G5G+5G5G	9	2,27 $\pm$ 0,71	21	3,17 $\pm$ 2,35
ID+II	4G4G	9	4,11 $\pm$ 2,77	16	3,40 $\pm$ 2,50
ID+II	4G5G+5G5G	26	3,11 $\pm$ 1,74	65	3,48 $\pm$ 3,58

p=0,98658

Vertikalna crta označava 0,95 CI





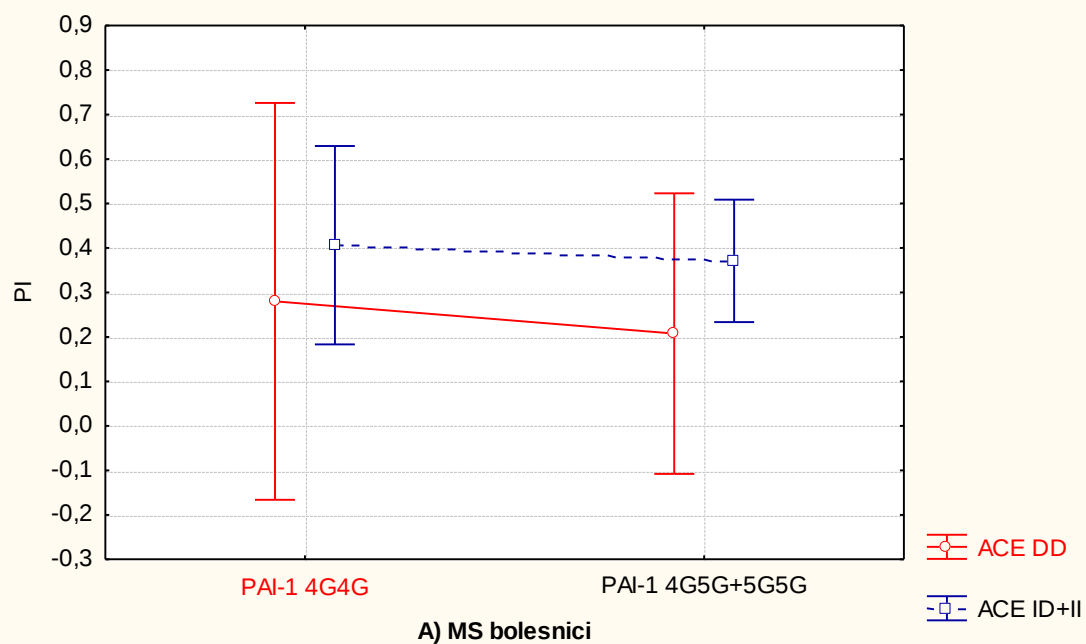
Slika 33. Učinak međudjelovanja PAI-1 i ACE polimorfizama na stupanj invalidnosti (EDSS) kod MS bolesnika (A) i bolesnica (B).

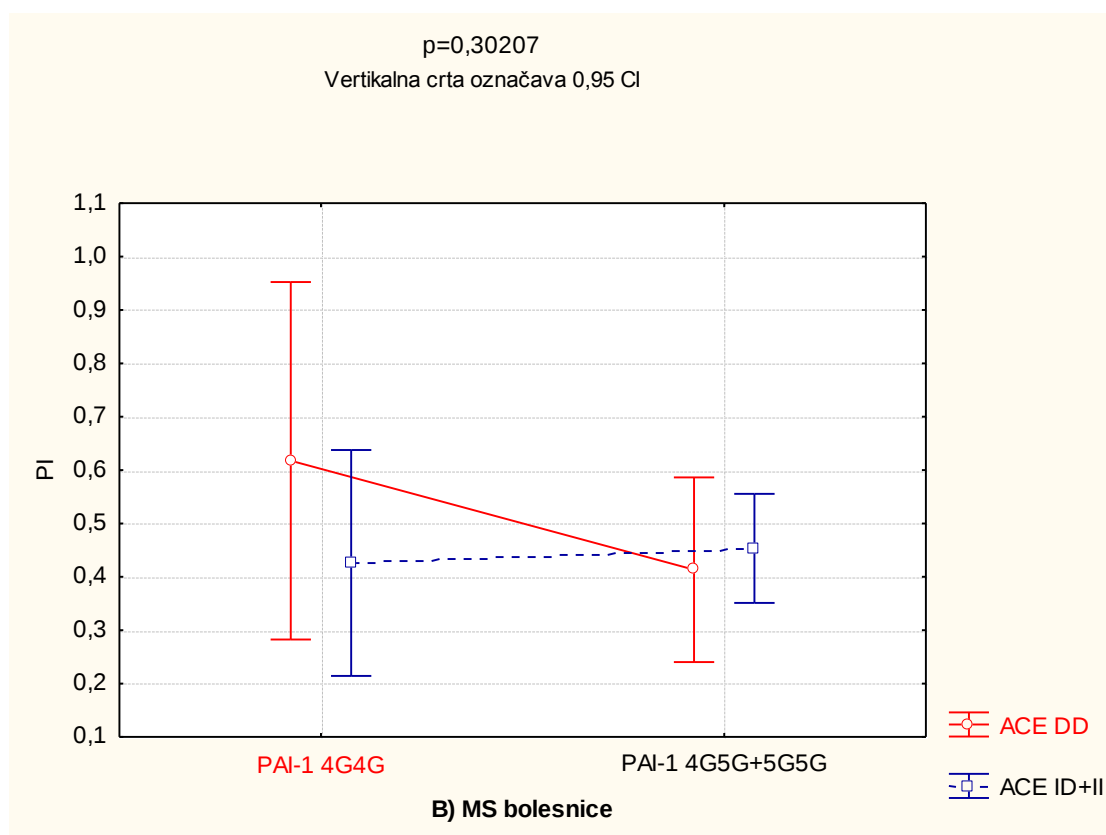
Također, niti PI u bolesnika oba spola nije ovisio o kombinaciji ACE i PAI-1 genotipova ($p=0,901$ u muškaraca, $p=0,302$ u žena) (slika 34).

ACE	PAI-1	MS bolesnici		MS bolesnice	
		N	PI (x±SD)	N	PI (x±SD)
DD	4G4G	2	0,28±0,09	4	0,610,21
DD	4G5G+5G5G	4	0,20±0,13	15	0,41±0,36
ID+II	4G4G	8	0,40±0,27	10	0,43±0,37
ID+II	4G5G+5G5G	21	0,37±0,34	43	0,45±0,33

p=0,90115

Vertikalna crta označava 0,95 CI



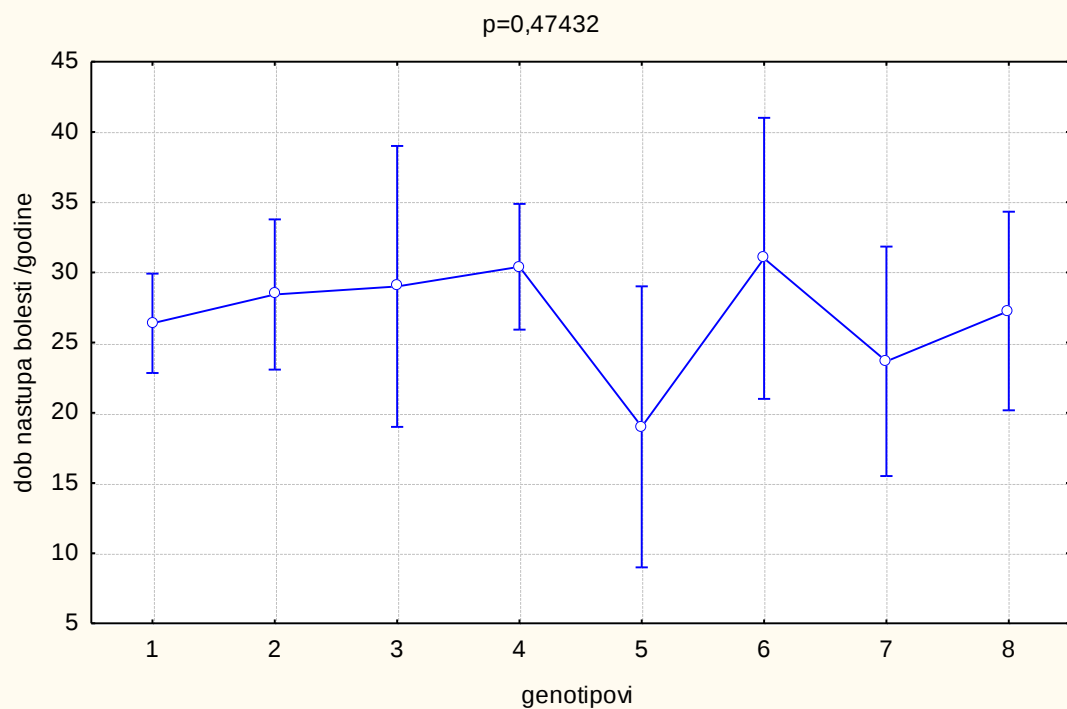


Slika 34. Učinak međudjelovanja PAI-1 i ACE polimorfizama na progresijski indeks (PI) kod MS bolesnika (A) i bolesnica (B).

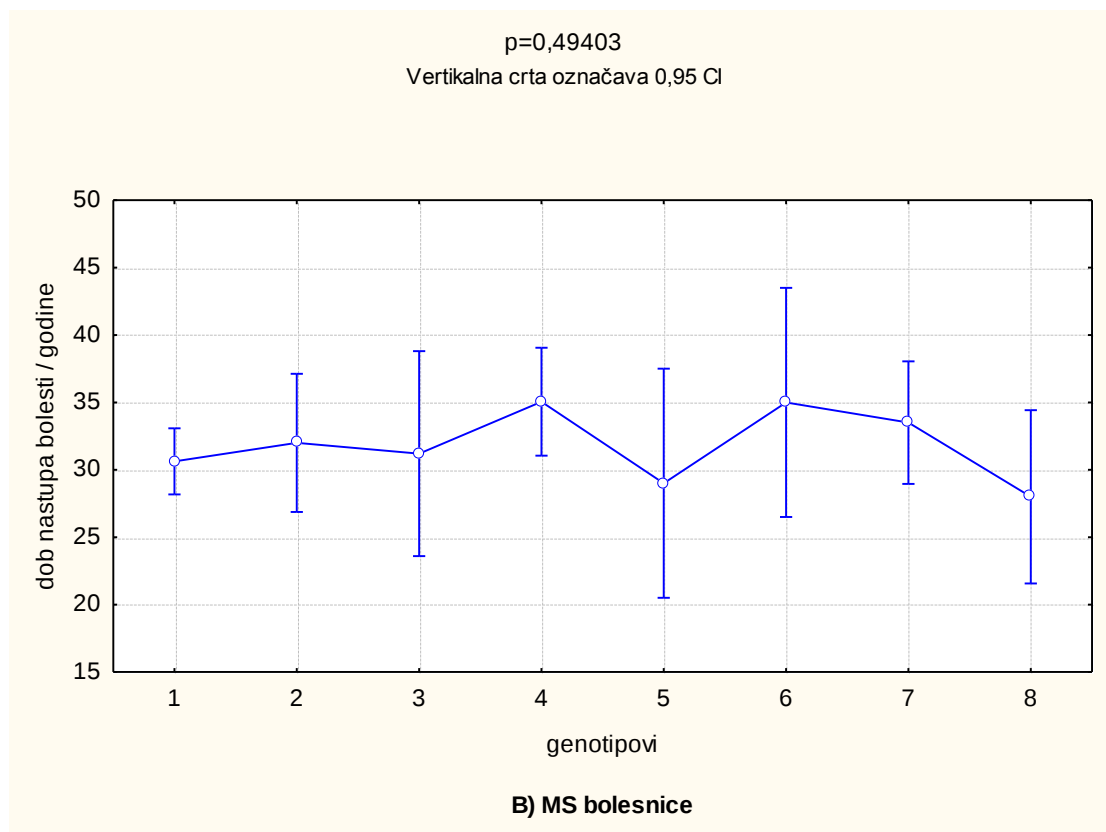
4.3.4.3. Učinak međudjelovanja TPA, PAI-1 i ACE gena na kliničku ekspresiju MS

Međudjelovanje TPA, PAI-1 i ACE polimorfizama ne utječe značajno na dob nastupa bolesti niti u muških ($p=0,474$) niti u ženskih bolesnika ($p=0,494$).

Genotip	MS bolesnici		MS bolesnice	
	N	Dob nastupa (x±SD)	N	Dob nastupa (x±SD)
1-TPA ID+DD/PAI-14G5G+5G5G/ACE ID+DD	16	26,37±7,74	48	30,62±7,21
2-TPA ID+DD/PAI-1 4G4G/ACE ID+DD	7	28,43±6,82	11	32,00±11,22
3-TPA ID+DD/PAI-1 4G4G/ACE DD	2	29,00±1,41	5	31,20±9,04
4-TPA II/PAI-14G5G+5G5G/ACE ID+DD	10	30,40±8,06	18	35,05±11,01
5-TPA II/PAI-1 4G4G/ACE ID+DD	2	19,00±5,66	4	29,00±8,60
6-TPA II/PAI-1 4G4G/ACE DD	2	31,00	4	35,00±8,12
7-TPA ID+DD/PAI-14G5G+5G5G/ACE DD	5	23,67±5,03	14	33,50±7,92
8-TPA II/PAI-14G5G+5G5G/ACE DD	4	27,25±1,89	7	28,00±6,30



A) MS bolesnici



1-TPA ID+DD/PAI-14G5G+5G5G/ACE ID+DD
 2-TPA ID+DD/PAI-1 4G4G/ACE ID+DD
 3-TPA ID+DD/PAI-1 4G4G/ACE DD
 4-TPA II/PAI-14G5G+5G5G/ACE ID+DD

5-TPA II/PAI-1 4G4G/ACE ID+DD
 6-TPA II/PAI-1 4G4G/ACE DD
 7-TPA ID+DD/PAI-14G5G+5G5G/ACE DD
 8-TPA II/PAI-14G5G+5G5G/ACE DD

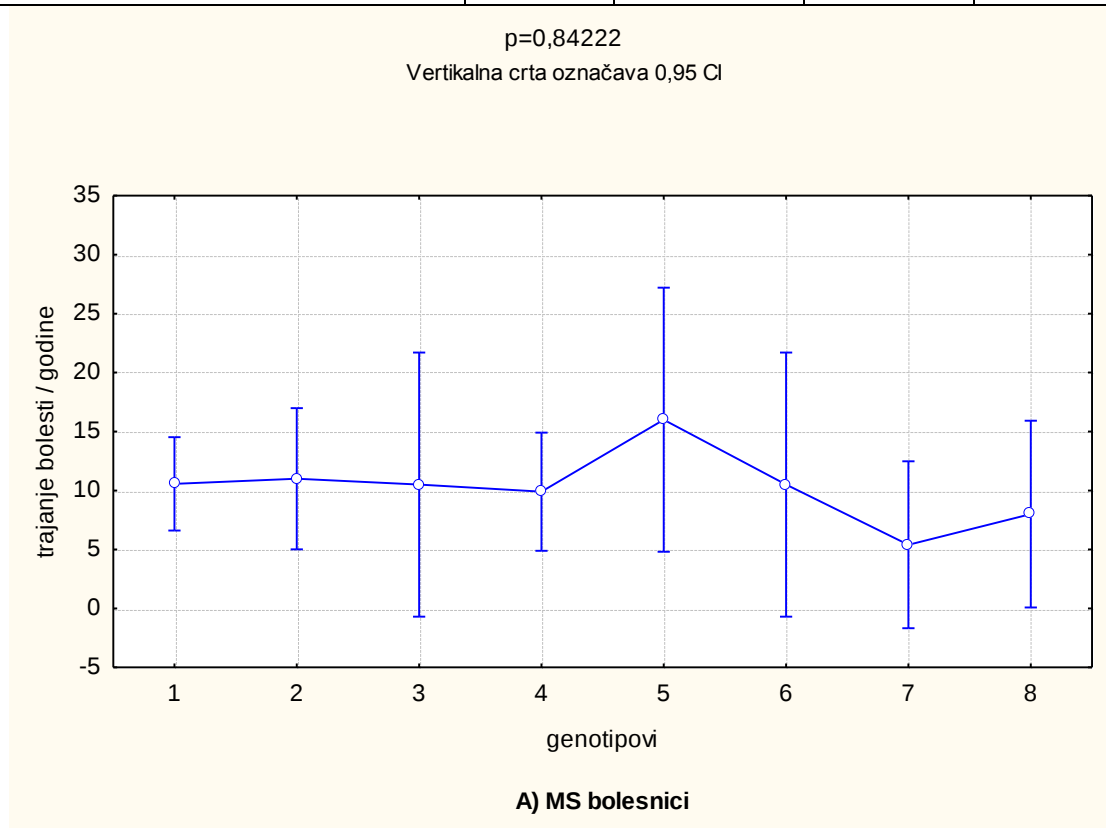
Slika 35. Međudjelovanje TPA, PAI-1 i ACE gena na dob nastupa bolesti u RR+SP bolesnika (A) i bolesnica (B).

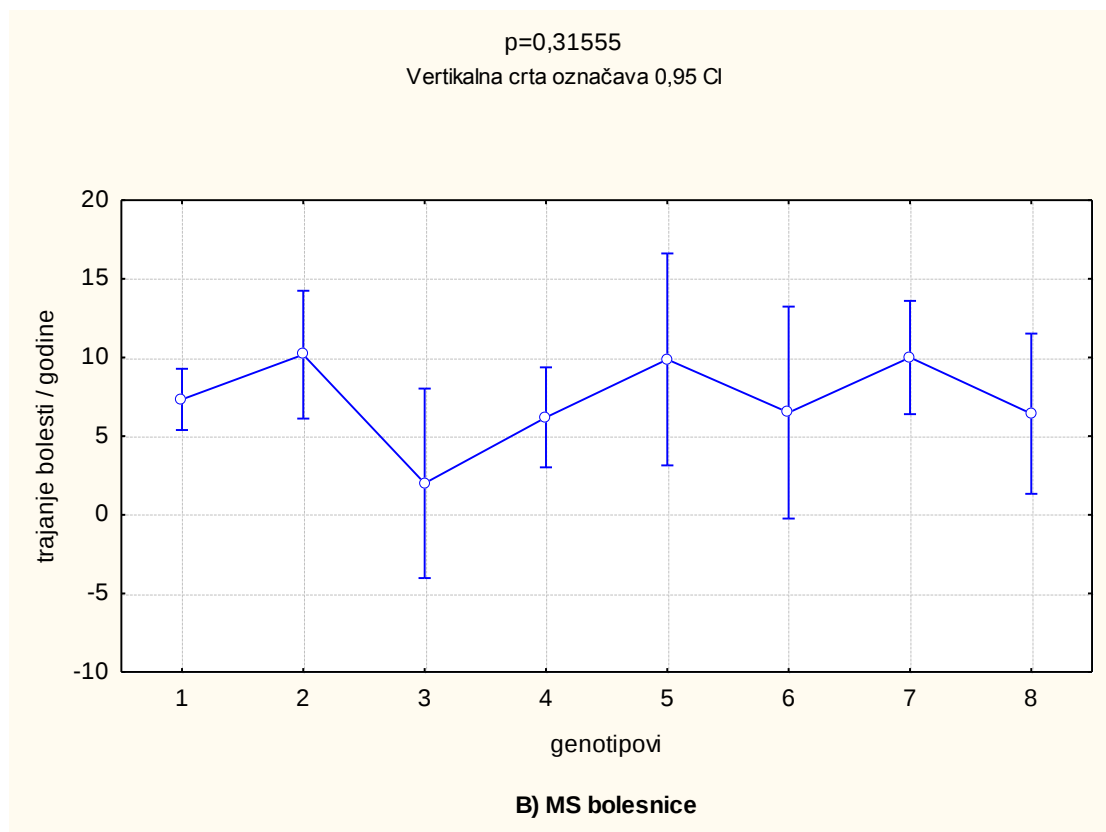
Najniža dob početka bolesti je zabilježena u bolesnika (19 godina) i u bolesnica (29 godina) koji su imali kombinaciju genotipova T-PA II/PAI-1 4G4G/ACE ID +DD (slika 35).

U bolesnika najkraće trajanje bolesti (5,4 godine) je u skupini s TPA II/PAI-1 4G5G+5G5G/ACE DD kombinacijom genotipova, ali interakcija navedenih polimorfizama nije značajno utjecala na dob nastupa bolesti ($p = 0,842$) (slika 36).

U bolesnika je trajanje bolesti najkraće u skupini s TPA ID+DD/PAI-1 4G4G/ACE DD kombinacijom genotipova, što je od 4 do 8 godina kraće nego u ostalim skupinama, ali bez statističke značajnosti ($p=0,315$) (slika 36).

Genotip	MS bolesnici		MS bolesnice	
	N	Trajanje bolesti (x±SD)	N	Trajanje bolesti (x±SD)
1-TPA ID+DD/PAI-14G5G+5G5G/ACE ID+DD	16	10,56±7,80	48	7,33±6,05
2-TPA ID+DD/PAI-1 4G4G/ACE ID+DD	7	11,00±6,63	11	10,18±11,24
3-TPA ID+DD/PAI-1 4G4G/ACE DD	2	10,50±12,02	5	2,00±1,54
4-TPA II/PAI-14G5G+5G5G/ACE ID+DD	10	9,90±7,00	18	6,19±5,83
5-TPA II/PAI-1 4G4G/ACE ID+DD	2	16,0	4	9,85±7,55
6-TPA II/PAI-1 4G4G/ACE DD	2	10,50±13,43	4	6,50±3,11
7-TPA ID+DD/PAI-14G5G+5G5G/ACE DD	5	5,40±9,84	14	10,00±7,89
8-TPA II/PAI-14G5G+5G5G/ACE DD	4	8,00±6,48	7	6,43±5,41





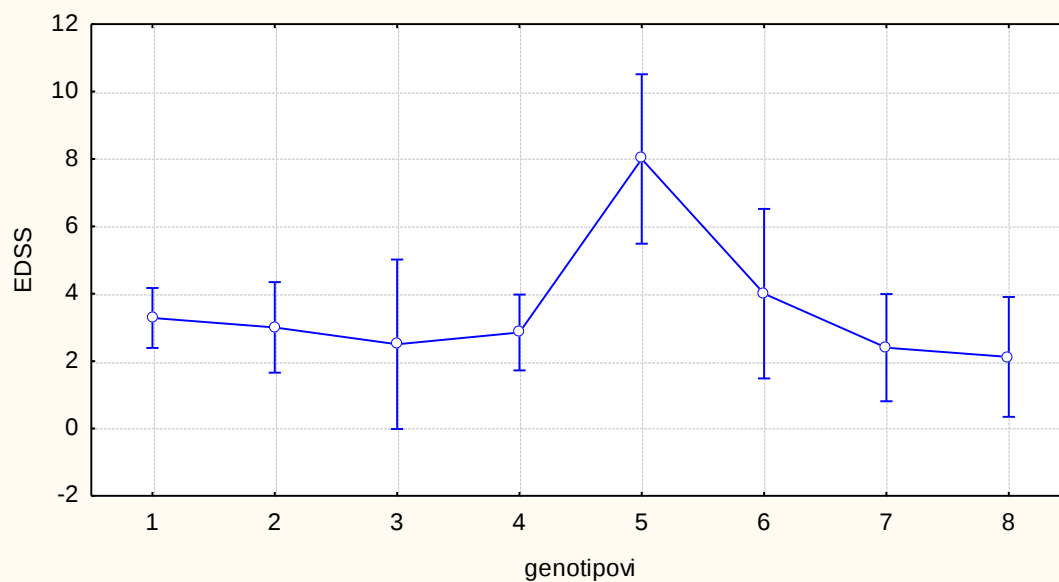
Slika 36. Međudjelovanje TPA, PAI-1 i ACE gena na trajanje bolesti u RR+SP bolesnika (A) i bolesnica (B).

EDSS značajno ovisi o različitim kombinacijama TPA, PAI-1 i ACE genotipova u muških bolesnika ($p=0,0234$), dok u bolesnica taj efekt nije uočen ($p=0,876$) (slika 37).

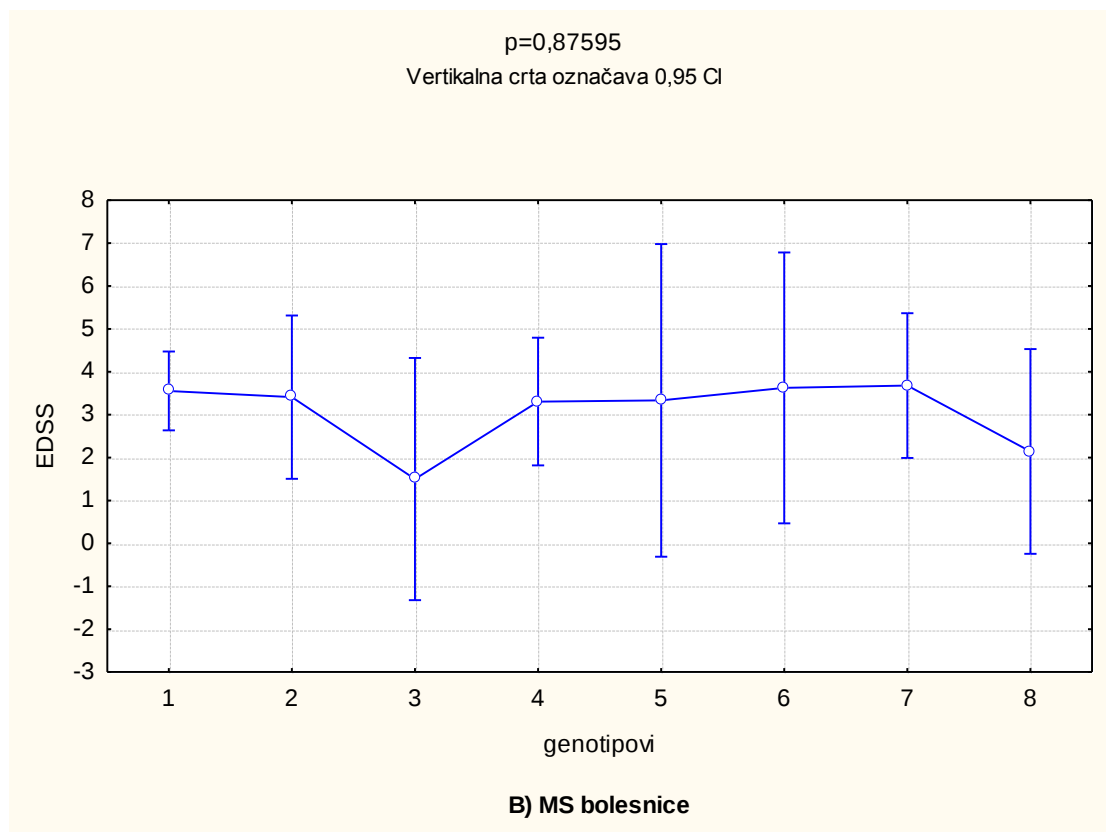
Genotip	MS bolesnici		MS bolesnice	
	N	EDSS ($\bar{x} \pm SD$)	N	EDSS ($\bar{x} \pm SD$)
1-TPA ID+DD/PAI-14G5G+5G5G/ACE ID+D	16	3,28 $\pm$ 2,07	48	3,55 $\pm$ 3,84
2-TPA ID+DD/PAI-1 4G4G/ACE ID+DD	7	3,00 $\pm$ 1,73	11	3,41 $\pm$ 2,79
3-TPA ID+DD/PAI-1 4G4G/ACE DD	2	2,50 $\pm$ 2,12	5	1,50 $\pm$ 0,87
4-TPA II/PAI-14G5G+5G5G/ACE ID+DD	10	2,85 $\pm$ 1,08	18	3,30 $\pm$ 2,77
5-TPA II/PAI-1 4G4G/ACE ID+DD	2	8,00 $\pm$ 2,12	4	3,22 $\pm$ 2,25
6-TPA II/PAI-1 4G4G/ACE DD	2	4,00 $\pm$ 4,24	4	3,62 $\pm$ 2,78
7-TPA ID+DD/PAI-14G5G+5G5G/ACE DD	5	2,40 $\pm$ 0,65	14	3,68 $\pm$ 2,60
8-TPA II/PAI-14G5G+5G5G/ACE DD	4	2,12 $\pm$ 0,85	7	2,14 $\pm$ 1,38

$p=0,02337$

Vertikalna crta označava 0,95 CI



A) MS bolesnici



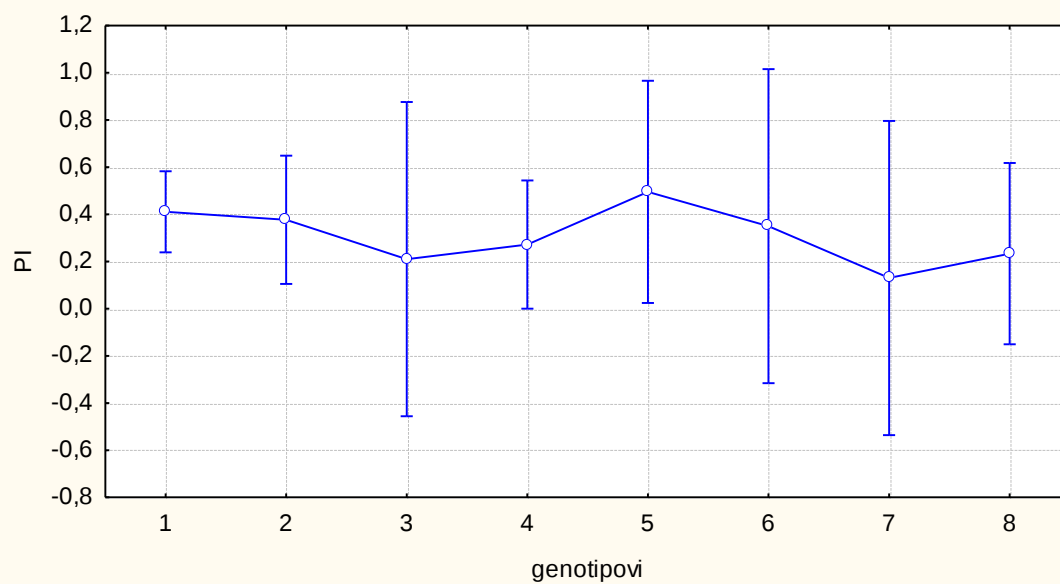
Slika 37. Međudjelovanje TPA, PAI-1 i ACE gena na stupanj invalidnosti (EDSS) u RR+SP bolesnika (A) i bolesnica (B).

U skupinama oba spola interakcija TPA, PAI-1 i ACE polimorfizama nije utjecala na vrijednosti PI ni u muškaraca ($p=0,931$) ni u žena ($p=0,976$) (slika 38).

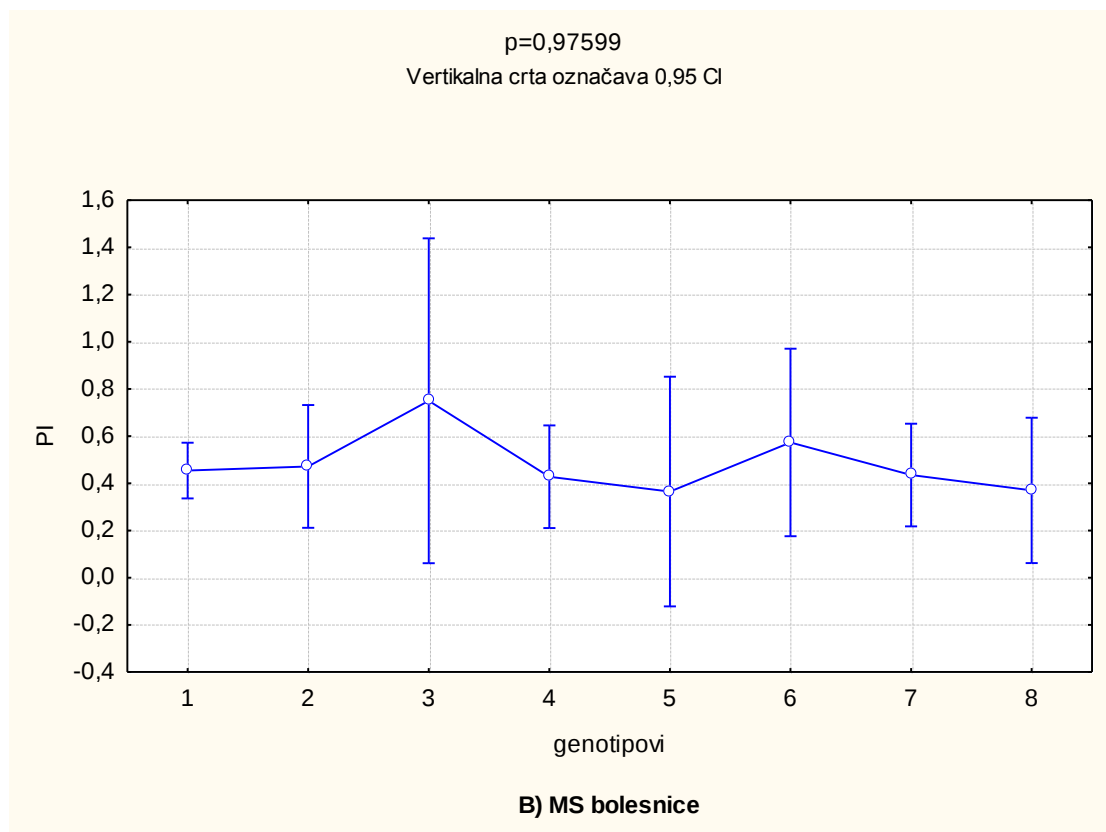
Genotip	MS bolesnici		MS bolesnice	
	N	PI ($\bar{x} \pm SD$)	N	PI ($\bar{x} \pm SD$)
1-TPA ID+DD/PAI-14G5G+5G5G/ACE ID+DD	16	0,41 $\pm$ 0,39	34	0,45 $\pm$ 0,34
2-TPA ID+DD/PAI-1 4G4G/ACE ID+DD	6	0,38 $\pm$ 0,31	7	0,47 $\pm$ 0,42
3-TPA ID+DD/PAI-1 4G4G/ACE DD	1	0,21	1	0,75
4-TPA II/PAI-14G5G+5G5G/ACE ID+DD	6	0,27 $\pm$ 0,17	10	0,43 $\pm$ 0,27
5-TPA II/PAI-1 4G4G/ACE ID+DD	2	0,49 $\pm$ 0,13	2	0,36 $\pm$ 0,26
6-TPA II/PAI-1 4G4G/ACE DD	1	0,35	3	0,57 $\pm$ 0,23
7-TPA ID+DD/PAI-14G5G+5G5G/ACE DD	1	0,13	10	0,43 $\pm$ 0,34
8-TPA II/PAI-14G5G+5G5G/ACE DD	3	0,23 $\pm$ 0,15	5	0,37 $\pm$ 0,43

p=0,93132

Vertikalna crta označava 0,95 CI



A) MS bolesnici



Slika 38. Međudjelovanje TPA, PAI-1 i ACE gena na progresijski indeks (PI) u RR+SP bolesnika (A) i bolesnica (B).

5. RASPRAVA

Multipla skleroza je kronična, upalna bolest SŽS karakterizirana upalnim, demijelinizirajućim promjenama, kao i primarnom ili sekundarnom aksonalnom degeneracijom (95). Prevalencija MS je između 2 i 200 oboljelih na 100000 stanovnika (18) i od nje u svijetu boluje više od dva milijuna ljudi. S obzirom da bolest počinje između puberteta i klimakterija i predstavlja najčešći netraumatski uzrok invaliditeta u mlađih osoba, ne čudi veliko zanimanje za utvrđivanje uzročnosti bolesti. Međutim, unatoč višegodišnjim istraživanjima uzrok MS do danas nije razjašnjen.

Poput mnogih drugih autoimunih oboljenja MS spada u veliku grupu multifaktorijalno uvjetovanih poremećaja, koji nastaju kompleksnom interakcijom genetičkih i okolišnih čimbenika.

Osnovne značajke ovog složenog oboljenja su skromna nasljednost bez klasičnog Mendelovog modela nasljeđivanja i heterogenost same bolesti, što ukazuje na činjenicu da je podložnost za MS determinirana promjenama velikog broja gena, uz značajnu ulogu gen/gen interakcija u njenoj patogenezi (95).

Studije blizanaca su pokazale visoku konkordantnost u monozigotnih (25-30%) u odnosu na dizigotne blizance (5%), što govori u prilog genetičke komponente uzročnosti (96). S druge strane, ta ista konkordantnost od svega 30% kod monozigotnih blizanaca, koji imaju isti genom, ukazuje da osim genetičkih i čimbenici okoliša imaju ulogu u razvoju bolesti.

Više čimbenika vanjske sredine se povezivalo uz oboljevanje od MS, od kojih su naznačajnije virusne infekcije, izlaganje sunčevom zračenju, način prehrane,

izloženost različitim kemijskim spojevima, ali do danas nijedan nije sa sigurnošću potvrđen kao uzročni okolišni faktor (95).

Otkrivanje gena podložnosti za kompleksnu bolest kao što je MS predstavljalo je veliki izazov za znanstvenike u zadnja dva desetljeća. Iako smo još daleko od otkrića seta gena koji sudjeluju u etiopatogenizi MS određeni uspjesi su ipak postignuti, posebno u zadnje vrijeme razvojem genomskih studija udruženosti (*eng. genom-wide-association studies*-GWAS), koje se zasnivaju na tehnologiji mikročipova i objedinjuju prednosti dva eksperimentalna pristupa koja su do sada dominirala: genomske probire vezanosti i studije mapiranja gena kandidata. Takve studije su pokazale značajnu povezanost razvoja MS s glavnim sustavom tkivne podudarnosti HLA, odgovornog za 30-60% genetičke podložnosti za MS (97-99), ali i da postoje drugi geni i lokusi smješteni izvan HLA regije koji bi mogli određivati predispoziciju za MS (58-59). Tako su posljednje studije istakle vezanost MS s dva gena koja kodiraju receptore za interleukin 2 (IL2RA) i interleukin 7 (IL7RA) (60), a također i vitamin D kao značajan okolišni čimbenik u direktnoj funkcionalnoj interakciji s glavnim lokusom podložnosti HLA-DRB1*1501 (61). Međutim, navedeni rezultati još trebaju biti potvrđeni u replikacijskim studijama u populacijama različite etničke podloge s obzirom na genetičku i etiološku heterogenost MS.

Posljednjih godina sve značajnije mjesto među ispitivanim čimbenicima rizika za MS zauzimaju i promjene fibrinolitičkog potencijala registrirane u MS bolesnika i eksperimentalnih modela EAE miševa. Naime, kod njih su na demijeliniziranim aksonima uočeni depoziti fibrinogena, koji se neučinkovito uklanjaju uslijed reducirane fibrinolize (70-71).

Fibrinoliza je regulirana ravnotežom između t-PA i njegovog inhibitora PAI-1. U plazmi, t-PA je prisutan kao kompleks s PAI-1. Pretpostavlja se da ograničena

dostupnost t-PA u MS lezijama zbog formiranja t-PA/PAI-1 kompleksa smanjuje sposobnost t-PA receptora da proizvode plazmin, što dodatno umanjuje fibrinolitički kapacitet u aktivnim lezijama i moguće dovodi do oštećenja aksona (74).

t-PA je ključni fibrinolitički enzim čija je aktivnost značajno povećana u prisustvu fibrina (100-101). Prisutan je u visokoj koncentraciji u neuronima nakon aktivacije, pa se smatra da ima ulogu u neuronalnom razvoju i sinaptičkom remodeliranju (102). U neurodegenerativnim oboljenjima, raskid veza između neuralnih stanica i izvanstaničnog matriksa djelovanjem plazmina predstavlja mehanizam nastanka neuralne stanične smrti (103). U kroničnim upalnim promjenama karakterističnim za MS, prisutnost t-PA na demijeliniziranom aksonu s nefosforiliranim neurofilamentima i fibrin(ogen)om ukazuje na njegovo sudjelovanje pri oštećenju aksona (71). Druga pretpostavka je da je možda u pitanju zaštitni mehanizam uklanjanja fibrinskih depozita koji pogoršavaju aksonalno oštećenje, kao što je prikazano u modelu perifernog živca (76), pri čemu se promovira regeneracija aktivacijom faktora rasta (104).

Dok se produkcija PAI-1 značajno povećava tijekom razvoja lezije, t-PA uvijek ima visoku razinu, što ukazuje da frakcije t-PA moguće ostaju bez inhibicije i na taj način on ostaje slobodan za degradaciju fibrina (71).

Fibrinolitički potencijal u demijelinizirajućim lezijama kod MS je izrazito smanjen uslijed smanjenja t-PA i povećanja PAI aktivnosti (71). Značajna korelacija između t-PA, vremena razlaganja tromba, plazminogena i D-dimera u MS uzorcima tkiva sugerira da fibrinoliza ovisi od plazmolitičke aktivnosti t-PA. U skladu sa značajnim porastom aktivnosti PAI-1, analize enzim-inhibitor kompleksa ukazuju da PAI-1 inhibira t-PA aktivnost i naknadno fibrinolitički potencijal u kroničnim neuroinflamatornim oboljenjima. Istraživanja razlaganja tromba su pokazala gubitak

funkcionalnog fibrinolitičkog potencijala u demijelinizacijskim lezijama što je značajka svih inflamatornih patoloških promjena s oštećenjem integriteta krvnih žila u kojima postoji disbalans u odnosu tPA:PAI-1 koji smanjuje udio aktivnog t-PA enzima (105). Pretragom MRI mozga uočeni su fibrinski depoziti prije pojave kliničkih znakova MS (106) i imunohistokemijski, što predhodi cerebralnoj parenhimalnoj reakciji i demijelinizaciji (107).

U eksperimentalnom modelu oštećenja perifernog živca, miševi deficitarni za t-PA pokazuju pojačanu aksonalnu degeneraciju i usporenu funkcionalnu regeneraciju (76).

Fibrin je lokaliziran na ogoljenom aksonu u MS zajedno s t-PA i tu su akumulirane fibrinske peptidaze velike molekularne težine, produkti t-PA proteolize. One moguće predstavljaju paket rezidualne aktivnosti t-PA koje PAI inhibitorna aktivnost nije detektirala na tim lokalitetima. U kroničnim inflamatornim stanjima, takva pojava se može smatrati kao nastojanje da se smanje naslage fibrina na demijeliniziranim aksonima i posreduje u aksonalnoj funkciji.

Zaključno, smanjenje fibrinolitičkog potencijala u MS nije rezultat smanjenja t-PA, već stvaranja njegovog kompleksa s inhibitorima, najvjerovatnije PAI.

Ima nekoliko mehanizama koji mogu utjecati na balans proteaznih inhibitora i reducirati fibrinolizu u inflamatornim MS lezijama. Porast serumskih albumina i niska gustoća lipoproteina (LDL), a i širok spektar proteaznih inhibitora kao što su $\alpha 2$ makroglobulin i $\alpha 1$ antitripsin kroz oštećenu krvno-moždanu barijeru direktno ometaju fibrinolizu (108).

Suprotno tomu, PAI-1 je prezetiran u plazmi samo u tragu. Biosinteza PAI-1 je stimulirana od proinflamatornih citokina IL-1 β i TNF (109). Interakcija t-PA s fibrinom i PAI-1 uzrokuje disocijaciju PAI-1 i formacije kompleksa koji makrofagi brzo "zarobe".

Manjak mjerljive PAI-1 aktivnosti i povećanje fragmenata niske molekularne težine potvrđuje stav o nakupljanju t-PA-PAI-1 kompleksa i intracelularnu degradaciju PAI-1. Dakle, ako tkivna razina t-PA ostaje nepromijenjena, a razina PAI-1 povećana u MS, kompleksna aktivnost mora biti balansirana produkcijom enzima i inhibitora od lokalnih inflamatornih makrofaga.

Porastom dokaza o aksonalnom oštećenju u ranim stadijima demijelinizacijske upalne reakcije u MS govori u prilog mogućoj ulozi depozita fibrina i disbalansa u odnosu t-PA-PAI-1 i u prividno normalnom tkivu koji bi stvorili situaciju u kojoj je integritet aksona kompromitiran. Jasna ovisnost periferne živčane regeneracije o PAI-1 sustavu ima značajne implikacije za neuroprotekciju u SŽS i specijalno za terapijski pristup u MS u smislu smanjenja fibrinskih depozita u najranijoj fazi stvaranja lezija (71).

Također je poznato da su plazmatski t-PA i PAI-1 djelomično regulirani RAS sustavom. Naime, angiotenzin II koji nastaje hidrolizom od angiotenzina I pomoću ACE, nakon vezivanja za endotelne stanice promovira proizvodnju PAI-1 i na taj način inhibira fibrinolizu (83-84). Osim posrednog učinka na fibrinolizu ACE ima učinak i na upalni proces, participira u stimulaciji T stanica i utiče na propusnost krvno-moždane barijere (84). Pojačana aktivnost ACE je dokazana u serumu (110) i cerebrospinalnom likvoru (111,86) MS bolesnika. Nadalje, nedavno je otkriven ACE2 homolog koji razgrađuje angiotenzin II i smatra se drugim važnim regulatorom u RAS (112). Snižene razine ACE2, kao i angiotenzina II, u cerebrospinalnom likvoru potvrđuju da je RAS izmjenjen intratekalno u MS bolesnika (111,113). Također, činjenica da se bolest može suprimirati u EAE blokiranjem ACE dodatno govori o mogućoj patogenetskoj ulozi ovog enzima u MS (85).

S obzirom na poremećenu funkciju fibrinolize u MS bolesnika, nedavno su se počeli istraživati geni koji reguliraju taj proces. Razlog za ispitivanje tih gena je i činjenica da se lokalizacija PAI-1 (7q21.3-22) i ACE (17q23) gena nalazi unutar utvrđenih regija podložnosti za MS prema rezultatima asocijacijskih studija.

Do sada su provedena svega tri istraživanja o ulozi navedenih polimorfizama u MS bolesnika. Ispitivanjem 4G/5G polimorfizma u PAI-1 genu u finskoj populaciji je utvrđena združenost 5G5G genotipa (OR 2,34; $p=0,037$) i 5G alela ($p=0,010$) u bolesnika, pri čemu se pretpostavilo da smanjena proizvodnja proteaznih inhibitora utječe na patogenezu MS u žena (82). Istraživanjem utjecaja TPA i PAI-1 polimorfizama u hrvatskih i slovenskih ispitanika pokazano je da kombinacija genotipa TPA DD/PAI-1 4G4G ima graničnu značajnost u reduciranom riziku za MS, sugerirajući gen-gen interakciju (83). U istom uzorku bolesnika rezultati su ukazali na statistički značajnu razliku u distribuciji ACE I/D alela ($p<0,01$) i genotipova ($p<0,04$) u muških pacijenata, što ujedno znači da bi se DD genotip mogao smatrati rizičnim čimbenikom u MS kod muških bolesnika (88). Navedene studije, međutim, nisu ispitivale interakciju fibrinoliznog i RAS sustava i posljedični utjecaj na predispoziciju i kliničku ekspresiju MS.

Stoga je cilj naše studije bio istraživanje specifičnih polimorfizama gena za tkivni plazminogen aktivator (TPA), inhibitor plazminogen aktivatora-1 (PAI-1) i angiotenzin-konvertirajući enzim I (ACE) u MS bolesnika, te utvrđivanje njihovog pojedinačnog i međusobnog utjecaja na predispoziciju i kliničku ekspresiju bolesti.

Studija je zamišljena kao replikacijska u odnosu na dosadašnja istraživanja u slovenskih i hrvatskih bolesnika. Istraživanje u etnički bliskoj populaciji Bosne i Hercegovine, koja s navedenima dijeli isto slavensko podrijetlo, je od nesumnjivog značaja s obzirom na genetičku i etiološku heterogenost MS.

Bosna i Hercegovina je država u kojoj dominiraju tri etničke skupine (Bošnjaci, Srbi i Hrvati), koje se smatraju relativno homogenim uz respekt prema etničkoj i jezičkoj pripadnosti. Da bi se izbjegao dodatni utjecaj genetičke izolacije uslijed religijske segregacije, posebnu pozornost smo uputili na odabir kontrolnih ispitanika, pri čemu smo za svakog bolesnika odabrali kontrolnog ispitanika iz iste etničke skupine. Takvo usklađivanje nam je omogućilo da prevaziđemo remetilački utjecaj etniciteta, koji predstavlja veći problem u istraživanju predispozicije negoli tijeka i težine bolesti. Također treba istaknuti da je tijekom pomnog odabira kontrolne skupine svaki bolesnik bio usklađen s kontrolnim ispitanikom, ne samo prema etničkoj pripadnosti, već i prema mjestu rođenja i življenja, dobi i spolu.

Skupinu bolesnika činilo je 120 žena i 50 muškaraca, što znači da je odnos spolova 2,4:1 bio u korist žena. U svim dosadašnjim reprezentativnim epidemiološkim studijama utvrđena je predominacija žena. Najčešći odnos žene/muškarci u dosadašnjim studijama je 2:1, najviši 5:1, a najniži 1,04:1 (18,114-115).

Pored veće predisponiranosti ka oboljevanju koja je općenito uočena u žena, poznato je da muškarci imaju kasniji nastup, ali i bržu progresiju bolesti (2). Također, dokazano je da postoje razlike i u samom procesu fibrinolize među spolovima, pri čemu su razine t-PA i PAI-1 determinirane od strane genetičkih lokusa fibrinolitičkog i RAS sustava, koji različito djeluju ovisno o spolu (116).

Nadalje, dosadašnja saznanja ukazuju da postoje značajne razlike u kliničkoj ekspresiji između pojedinih subtipova bolesti, posebice PP i RR+SP tijekom MS. U našem uzorku MS bolesnika RR+SP oblik je zastupljen s 94%, a PPMS s 6%. Podaci o zastupljenosti kliničkih subtipova MS se u literaturi razlikuju i procentualna vrijednost za PPMS se kreće od 5% do 37% (najčešće 15%). PP oblik se češće javlja

u muškaraca, i to u slučajevima kasnijeg početka bolesti i pojave motornih simptoma kao početnog znaka bolesti (2).

Na temelju svega navedenog inicijalno smo bili zainteresirani da utvrdimo postoje li razlike u kliničkim karakteristikama bolesti ovisno o spolu i tijeku MS u našem uzorku bolesnika, pa smo ih analizirali prema spolnim skupinama i pripadajućem tijeku bolesti (PP, SP, RR, te RR+SP) (tablica 11).

Prosječna dob bolesnika u našem uzorku iznosila je 39,4 godina (SD 9.4), što je sukladno rezultatima dvije epidemiološke studije MS rađene na teritoriji BiH (117-118), ali niže vrijednosti u odnosu na studije u zapadnoeuropskim zemljama (2,119). Također, epidemiološka studija provedena u Istri 1981. godine bilježi značajno višu prosječnu dob bolesnika u odnosu na našu studiju (46,8 godina), a manju zastupljenost starijih bolesnika u našem uzorku možemo objasniti nižim životnim standardom i nižim stupnjem zdravstvene skrbi na području BiH u zadnjih dvadeset godina, a posebno u ratnom i poslijeratnom periodu (120).

U ukupnom uzorku BiH bolesnika uočena je i značajna razlika u dobi nastupa bolesti ($p=0,023$), koja je za tri godine bila niža u muškaraca ($27,5\pm7,0$) negoli žena ($30,5\pm8,3$), što je suprotno rezultatima većine svjetskih studija. Nižu dob početka bolesti kod muškaraca u odnosu na žene ($29.4 / 32.6$) pokazala je i studija učinjena u Lyonu, Francuska (2), te značajno veću incidencijom oboljevanja kod žena starijih od četrdeset godina ($p<0,01$). Dob nastupa bolesti je, u našoj studiji, također bio značajno niži kod muških bolesnika u skupinama RR ($p=0,012$) i RR+SP ($p=0,023$), dok su PP bolesnici imali kasniji početak bolesti (34 godine) i jednak u oba spola.

Prosječna dužina trajanja bolesti u našem uzorku iznosila je 8,2 godine (SD 4,7). Značajno kraće trajanje bolesti ($p=0,004$) je opaženo u žena ($5,9\pm5,1$) negoli u

muškaraca ($9,1 \pm 7,0$) s RR tipom MS, dok u SP i PP bolesnika nije bilo razlike među spolovima.

Prosječna dužina trajanja bolesti se u svjetskoj literaturi kreće od 6,6 do više od 25 godina (38). Uočeno je da duže trajanje bolesti imaju osobe koje žive u visokorazvijenim zemljama s boljom zdravstvenom skrbi (121-123), pa se vrijednost prosječnog trajanja u našem uzorku od svega 8 godina može objasniti nedostatkom takvih uvjeta u BiH.

Srednja vrijedost EDSS u ukupnom uzorku bolesnika iznosila je 3,4 (SD 2,8), bez značajne razlike među spolovima. Značajna razlika u skali invalidnosti ($p=0,031$) opažena je samo kod SP bolesnika u kojih je EDSS bio viši u žena ($8,3 \pm 4,3$) negoli muškaraca ($5,1 \pm 2,0$).

Prema podacima dosadašnjih epidemioloških studija potrebno vrijeme da bolesnici dosegnu EDSS 4 iznosi 8 godina od početka bolesti i tada bolesnici imaju u prosjeku 42 godine. Također, progresija bolesti je općenito brža u muškaraca, kojima je potrebno kraće vrijeme u odnosu na žene da dosegnu jednak EDSS (2). Podaci o navedenim parametrima u našem uzorku bolesnika se uklapaju u svjetske prosjeke, osim nižeg EDSS-a u muškaraca koji je moguće posljedica relativno malog uzorka bolesnika (2).

S obzirom na utvrđene značajne razlike u pojedinim kliničkim karakteristikama ovisno o spolu i tijeku bolesti u našem uzorku bolesnika, daljnje ispitivanje utjecaja gena uključenih u proces fibrinolize (TPA, PAI-1 i ACE) na podložnost i ekspresiju MS je analizirano odvojeno u bolesnika i bolesnica, uzimajući u obzir i pojedine subtipove bolesti.

Budući da proces fibrinolize ovisi o ravnoteži dva ključna enzima, t-PA i njegovog inhibitora PAI-1, od *A/u* I/D TPA i 4G/5G PAI-1 polimorfizama ovise razlike

u koncentracijama t-PA i PAI-1 između genotipova. Uočeno je da je razina t-PA značajno viša u osoba homozigotnih za I alel, dok one koje su homozigotne za 4G alel imaju 25% višu koncentraciju PAI-1 u plazmi od 5G5G homozigota.

Ispitivanje *Alu* I/D TPA polimorfizma u našim skupinama ispitanika nije pokazalo njegov utjecaj na genetičku podložnost za MS. Naime, učestalost TPA I/D alela i genotipova između bolesnika i zdravih ispitanika nije se značajno razlikovala (tablica 12), a distribucija alela i genotipova ne pokazuje značajnu razliku ni s obzirom na tijek bolesti niti na spol bolesnika (tablice 13-15). Međutim, uočeno je da MS bolesnici imaju veću učestalost II genotipa (31,8%) i I alela (53,5%) u odnosu na kontrolne ispitanike (II=24,7%; I=50,3%), kao i da je isti trend zamijećen kod oba spola (tablice 17-18). U PP bolesnika je zamijećen suprotan trend, jer je kod njih frekvencija I alela (40,0%) bila niža od one u kontrolnoj skupini (50,3%) (tablica 13).

Što se tiče 4G/5G PAI-1 polimorfizma niti on nije pokazao značajan utjecaj na predispoziciju za MS u našem uzorku bolesnika. Distribucija PAI-1 genotipova i alela je bila jednako raspoređena u skupinama bolesnika i kontrolnih ispitanika (tablica 16), kao i podskupinama formiranim prema spolu (tablice 18-19) i tijeku bolesti (tablica 17). Ono što je zanimljivo je da su PP bolesnici imali veću učestalost rizičnog 4G4G genotipa (30,0%) i 4G alela (60,0%) u odnosu na kontrolne ispitanike (4G4G=25,9%; 4G=51,5%), ali razlike ipak nisu dosegle razinu statističke značajnosti ($p>0,05$).

Utjecaj TPA I/D i PAI-1 4G/5G polimorfizama na MS je do sada istraživao jedino u hrvatskih i slovenskih bolesnika (83). Rezultati naše studije su pokazali da se navedene vrijednosti TPA I/D i PAI-1 4G/5G genotipova i alela u bolesnika i kontrolnih ispitanika sukladne onim u hrvatskim i slovenskim populacijama (83), što znači da smo u ovoj replikacijskoj studiji provedenoj na etnički bliskoj populaciji

potvrdili da pojedinačni utjecaj ova dva polimorfizma značajno ne doprinosi predispoziciji za MS. Međutim, u hrvatskih i slovenskih bolesnika je uočen trend za protektivni učinak DD genotipa (OR 0,75, $p=0,111$), što nije potvrđeno u našem uzorku gdje je frekvencija tog genotipa bila ista u bolesnika i kontrolnih ispitanika (24%).

Nadalje, nije pokazan niti trend za rizični učinak 5G5G genotipa (OR=1,39, $p=0,109$), posebice u bolesnika (OR=1,48, $p=0,08$), koji je zamijećen u hrvatskih i slovenskih bolesnika. Učestalost 5G5G genotipa (30,7%) i 5G alela (55,8%) u finskih ispitanika je također bila viša negoli u zdravih ispitanika (5G5G=19,8%, 5G=46,8%), ali su značajne razlike tek pokazane u bolesnika od MS u kojih se 5G5G genotip (OR, 2,34; $p=0,037$) i 5G alel ($p=0,010$) pokazao značajnim rizičnim faktorom za MS. Frekvencija PAI-1 4G/5G alela i genotipova u naših MS bolesnika je bila različita od vrijednosti nađenih kod finskih bolesnika, dok u zdravih ispitanika nije bilo uočenih razlika u distribuciji (82).

Poznato je da postoje značajne regionalne razlike u prevalenciji MS i stoga je moguće da jedan gen ima utjecaja na predispoziciju u našoj populaciji, a drugi u udaljenim populacijama. S obzirom da se isti PAI-1 genotip pojavio kao mogući rizični faktor u finskih, a i u hrvatskih i slovenskih bolesnika, govori o eventualnom globalnom utjecaju PAI-1 gena, kao i procesa fibrinolize, na razvoj MS. Činjenicu da ista pojava nije uočena i u bolesnika iz BiH, a pritom je dizajn studije, selekcija bolesnika, definicija uzorka i kontrole, kao i analiza podataka bila ista kao i u istraživanju u hrvatskoj i slovenskoj populaciji, mogli bismo prije objasniti manjim brojem ispitanika u našem uzorku negoli populacijskom specifičnosti glede učinka PAI-1 polimorfizma na razvoj bolesti.

Utjecaj TPA I/D i PAI-1 4G/5G polimorfizama je do sada rijetko istraživani u MS, ali jeste u drugim oboljenjima upalne i/ili autoimune prirode u kojih su također zamijećene promjene u procesu fibrinolize.

Tako je ispitivan učinak PAI-1 4G/5G polimorfizma na komponente inzulinske rezistencije i adipoznosti, pri čemu je utvrđena pozitivna korelacija između 4G alela i koncentracije PAI-1 u plazmi, koja je pak bila udružena s povišenom inzulinskom rezistencijom ($p \leq 0,002$) i centralnom adipoznošću ($p \leq 0,01$) (124).

S obzirom na pretpostavku o reduciranoj fibrinolizi kod antifosfolipidnog sindroma ispitivan je utjecaj navedenih polimorfizama na kliničke simptome bolesti, ali je pokazano da oni nisu imali značajnog učinka na povećan rizik za arterijsku i vensku trombozu, kao i poremećaje trudnoće u bolesnika s ovim sindromom (125).

U švedskih bolesnika sa srčanim infarktom 4G alel se pokazao kao rizični faktor kod žena ($OR=1,4$), ali ne i u muškaraca (126). Također, 4G4G genotip je bio udružen s povećanim rizikom za srčani infarkt kod kineskih bolesnika, a plazmatska aktivnost PAI-1 se smanjivala s brojem 4G alela (127). U bolesnika s moždanim infarktom učestalost 5G5G genotipa je bila značajno viša negoli u kontrolnoj skupini ($p \leq 0,001$), a utvrđena je i pozitivna korelacija između triglicerida, razine glukoze u krvi i PAI-1 aktivnosti u sve tri skupine (133). I drugi radovi su ukazali da PAI-1 polimorfizam predstavlja značajan rizični faktor za srčani udar, te da razina triglicerida i glukoze u krvi imaju utjecaj na razinu PAI-1 aktivnosti (128-130).

PAI-1 4G/5G polimorfizam se pokazao značajnim čimbenikom i u patogenezi astme. Naime, razina PAI-1 i IgE je bila značajno viša u američkih bolesnika s 4G4G negoli s 5G5G genotipom (131), a 4G alel je bio učestaliji i kod čeških bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike ($p=0,015$), pri čemu je utvrđena i značajna povezanost između PAI-1 polimorfizma i IgE posredovanih oboljenja ($p=0,003$) (132). Također su

i drugi autori utvrdili da 4G alel može biti povezan s većim rizikom za IgE posredovanu astmu i druga alergijska oboljenja (133-135).

Iako nije nađena razlika u učestalost PAI-1 genotipova i alela u bolesnika s dubokom venskom trombozom, ipak je značajno viša razina PAI-1 u plazmi utvrđena kod oboljelih s 4G4G genotipom u odnosu na ostale genotipove (136).

Konačno, TPA D alel je bio značajno učestaliji u bolesnika s agresivnim generaliziranim periodontitisom ($p=0,044$) negoli u kontrolnih ispitanika, dok je distribucija PAI-1 alela i genotipova bila ravnomjerna u obje skupine(137).

S obzirom da su neke studije MS pokazale da promjene u komponentama RAS sustava mogu imati ulogu u razvoju bolesti, to je bio razlog za istraživanje ACE I/D polimorfizma u njenoj etiopatogenezi. Također, dodatni razlog predstavljala je i činjenica da ACE indirektno utječe na proces fibrinolize tako što viša ekspresija ACE vodi do više razine PAI-1. Razina ACE u serumu ovisna je o I/D polimorfizmu u ACE genu tako da je srednja vrijednost aktivnosti plazmatskog ACE najviša u osoba s DD genotipom, najniža u osoba s II genotipom, dok ID osobe imaju intermedijarne vrijednosti.

Istraživanje povezanosti ACE I/D polimorfizma i MS učinjeno je do sada samo na uzorku slovenskih i hrvatskih bolesnika. Rezultati su ukazali na značajnu razliku u distribuciji D alela ($p=0,01$) i DD genotipova ($p=0,02$) u muških bolesnika u odnosu na kontrolne ispitanike (88). Ovaj rezultat se činio posebno zanimljiv uzevši u obzir da muškarci imaju bržu progresiju bolest u odnosu na žene, te da je općenito utjecaj ACE I/D polimorfizma izraženiji kod muškaraca. Stoga smo u našoj replikacijskoj studiji ispitivali ACE I/D polimorfizam u uzorku BiH bolesnika, međutim nismo utvrdili značajan učinak navedenog polimorfizma u podložnosti za MS. Naime, nije bilo razlike u učestalosti ACE I/D genotipova i alela u ukupnom uzorku bolesnika i kontroli

($p > 0,05$) (tablica 20), kao i u prethodno provedenoj studiji u hrvatskoj i slovenskoj populaciji. Također, frekvencije alela i genotipova u BiH bolesnika i kontrolnih ispitanika su bile sukladne onima u hrvatskoj i slovenskoj populaciji (88), kao što se ni učestalosti u zdravih ispitanika nisu razlikovale od vrijednosti koje su nađene u općim populacijama BiH (138) i Hrvatske (139). Međutim, kad smo MS bolesnike i zdrave ispitanike podjelili po spolu, za razliku od rezultata u hrvatskih i slovenskih bolesnika (88), u našem uzorku je distribucija ACE I/D genotipova i alela bila ravnomjerno raspoređena u obje skupine (tablice 22-23). Razlog da nismo povrdili utjecaj DD genotipa i D alela kao rizičnih faktora u muškaraca bi se također mogao objasniti manjim brojem analiziranih muškaraca u odnosu na prethodnu studiju, a ne eventualnoj populacijskoj specifičnosti koja postoji u BiH u svezi učinka ACE I/D polimorfizma na patogenezu bolesti.

Također u našoj studiji nismo utvrdili značajnu povezanost navedenog polimorfizma i tijeka MS, premda je u PP bolesnika zabilježena veća učestalost DD genotipa (50,0%) i D alela (60,0%) u odnosu na kontrolne ispitanike (DD= 29,4%; D=55,6%) (tablica 21).

S obzirom da ACE ima značajnu ulogu u različitim patofiziološkim stanjima, ACE I/D polimorfizam je ispitivan kao rizični faktor u velikom broju bolesti s različitim rezultatima.

Ispitivanje ACE I/D polimorfizma kao mogućeg rizičnog faktora u neurodegenerativnim bolestima, kao što je Alzheimerova bolest (AD) ima velikog smisla s obzirom na učinak ACE u degradaciji β -amiloida što je glavni patološki znak kod AD i činjenicu da na razinu ACE aktivnosti utječe prisutni genotip. Međutim, dok je u nekim populacijama utvrđena povezanost II genotipa s povećanim rizikom za AD (140), u drugim se kao rizičan faktor javio DD genotip (141). Ipak, kako je pokazano

da upotreba ACE inhibitora može usporiti propadanje kognitivnih funkcija u AD to ukazuje na potrebu za daljnjm istraživanjem povezanosti ACE I/D polimorfizma i AD (142).

Istraživanja mogućih rizičnih faktora u etiologiji Parkinsonove bolesti (PD) nisu pokazala povezanost ACE I/D polimorfizma u predispoziciji za PD, kao niti povezanost istog s neželjenim učincima kronične terapije L-dopom (143-145).

Brojni razlozi čine ACE kandidatom za ulogu u nastanku psihijatrijskih poremećaja, uključujući njegovu ulogu u funkciji neurotransmitera, a posebno dopamina. Dosadašnje studije ACE I/D polimorfizma u shizofrenih bolesnika dale su oprečne rezultate. Naime, dok je u nekim populacijama D alel imao preotektivni učinak u razvoju bolesti, u drugim je pak I alel identificiran kao protektivni čimbenik, što nameće potrebu daljnjeg istraživanja u populacijama različite etničke podloge (146-148).

Također, ACE I/D polimorfizam je istraživani i u svezi predispozicije za različite autoimune bolesti. Tako je utvrđena veća učestalost DD genotipa u bolesnika sa sarkoidozom i njegova povezanost s autoimunim pojavama i granulomima, koje su moguće uvjetovanje povišenim razinama ACE u serumu (149-152).

Iako je u polovice bolesnika utvrđena povišena ACE aktivnost u serumu, rijetka su istraživanja utjecaja ACE I/D polimorfizma na oboljevanje od psorijaze i psorijatičnog artritisa, heterogene kronične bolesti s autoimunom patofiziologijom (153-156). ACE djeluje tako što inaktivira bradikinin, a preko njega izaziva promjene i u kinin-kalikrein sustavu, pri čemu dolazi do povećane koncentracije kinina i sličnih upalnih metabolita u koži koji mogu doprinjeti upalnim kožnim lezijama karakterističnim za psorijazu. Dosadašnji rezultati su ukazali da je II genotip bio češći

u bolesnika s psorijazom (155), a i da je bio učestaliji u oboljelih od psorijatičnog artritisa s kasnim nastupom bolesti u odnosu na bolesnike s ranijim početkom (153).

S obzirom da RAS sudjeluje u patogenezi akutnog i kroničnog pankreatitisa i da je ACE ključni enzim u aktivaciji tog sustava (157), ispitana je povezanost ACE aktivnosti u serumu, odnosno ACE I/D polimorfizma s oboljevanjem i ekspresijom bolesti. Utvrđeno je da ACE I/D polimorfizam nema uticaja na rizik za oboljevanje od akutnog pankreatitisa, niti na tijek bolesti i moguće komplikacije (158-160).

Također, nije pokazano da navedeni polimorfizam ima značajnu ulogu u patogenezi primarne bilijarne ciroze, autoimune bolesti jetre (161-164).

Iako su posljednja istraživanja ukazala na epistatske utjecaje navedenih polimorfizama na razinu t-PA i PAI-1 u plazmi (165-167), do sada je njihovo međudjelovanje bilo rijetko istraživano kod humanih bolesti, pa tako i u MS. MS je složena i multifaktorijalna bolest u čijoj patogenezi sudjeluje veliki broj molekula. To znači da utjecaj svakog pojedinačnog genetičkog faktora na podložnost za MS je blag, ali može biti značajan u prisustvu drugih genetičkih rizičnih faktora. Ove gen-gen interakcije mogu se javiti između različitih gena čiji produkti su dio puteva koji u konačnici dovode do MS.

Dok je kod hrvatskih i slovenskih bolesnika utvrđeno da osobe s TPA DD/ PAI-1 4G4G kombinacijom genotipova imaju značajno manji rizik za oboljevanje od MS ($p=0,04$) (83), u našem uzorku iz BiH taj rezultat nije potvrđen. Također, nije utvrđeno da bilo koja kombinacija triju polimorfizama značajno utječe na predispoziciju za MS (tablice 24-29). Ipak, uzevši u obzir manji broj ispitanika u našoj studiji smatramo da su potrebne daljnja istraživanja na velikom uzorku bolesnika i u drugim populacijama s različitom etničkom podlogom radi razjašnjenja uloge navedenih polimorfizama u etiopatogenezi MS.

Osim na podložnost za MS, ispitali smo i utjecaj polimorfizama TPA, PAI-1 i ACE gena, kao i njihovog međudjelovanja, na kliničke parametre bolesti (dob nastupa, trajanje bolesti, stupanj invaliditeta i progresijski indeks). Rezultati su u većoj mjeri bili sukladni onima u hrvatskih i slovenskih bolesnika, gdje nije pronađen značajan pojedinačni ni međusobni učinak na kliničku ekspresiju bolesti (83,88). Međutim, u naših PP bolesnika opažen je trend kasnijeg nastupa bolesti od 10 godina ($p=0,095$) (slika 11), kao i kraćeg trajanja za 6 godina ($p=0,057$) (slika 12) kod bolesnika s 4G4G genotipom u odnosu na ostale PAI-1 genotipove. Ipak je broj PP bolesnika u našem uzorku bio nedostatan za donošenje važnijih zaključaka glede utjecaja navedenih polimorfizama na spomenute parametre bolesti, pa bi zabilježene trendove valjalo testirati na većem broju bolesnika s PPMS zbog specifičnosti tog progresivnog oblika bolesti.

S druge pak strane, kod RR+SP bolesnika uočeni su određeni značajni utjecaji ispitivanih polimorfizama na pojedine kliničke karakteristike bolesti. EDSS je značajno ovisio o interakciji TPA I/D i PAI-1 polimorfizma u muških bolesnika ($p=0,007$) (slika 29), u kojih su najvišu vrijednost imali oni s TPA II i PAI-1 4G5G genotipovima, a također se pokazao ovisnim o međudjelovanju sva tri polimorfizma, premda s manjom značajnošću ($p=0,023$) (slika 37), što govori da na vrijednost skale invaliditeta u muških bolesnika pretežno utječu TPA i PAI-1 polimorfizmi. Kod bolesnica je zamijećeno da je na trajanje bolesti značajno utjecala interakcija PAI-1 i ACE I/D polimorfizama ($p=0,012$) (slika 32), pri čemu su one s 4G4G i DD genotipovima ispoljavale kraće trajanje bolesti od 2-6 godina u odnosu na ostale kombinacije genotipova.

S obzirom na kliničku sliku MS koja je izrazito varijabilna, navedeni rezultati doista upućuju na činjenicu da bi se u različitim subtipova bolesti mogli razlikovati

geni i lokusi uključeni u početni nastup bolesti, odnosno oni koji su odgovorni za njen daljnji razvoj i progresiju. Također se može uočiti da postoje i određene spolne razlike glede utjecaja pojedinih polimorfizama na neku od komponenti ekspresije bolesti, što se može objasniti činjenicom da se i sam proces fibrinolize razlikuje među spolovima (166). Naime, poznato je da razina estrogena u žena može djelovati na promjenu koncentracije PAI-1 i samim tim utjecati na fibrinolitički potencijal (82). Jer pokazano je da osobe s nižom razinom estrogena imaju niži fibrinolitički potencijal i više razine PAI-1 inhibitora (167). Ovaj odnos između estrogena i fibrinolize je povezan s kapacitetom estrogena da regulira RAS sistem (168-169-175). Dodatno, terapija ACE inhibitorima uzrokuje povećano otpuštanja bazalnog t-PA u žena, ali ne i u muškaraca (170).

Naša studija ima određena ograničenja koja se moraju naglasiti. Kao prvo to je relativno mali uzorak ispitanika koji onemogućava donošenje kvalitetnijih zaključaka o učinku navedenih gena u predispoziciji i kliničkoj ekspresiji bolesti. Naime, kako se radi o izrazito heterogenoj bolesti vrlo je važno klasificirati pojedine subkategorije bolesnika uzimajući u obzir tijek bolesti i spol, jer je vrlo vjerojatno da su različiti učinci određenih gena i lokusa značajni u određenim oblicima bolesti. S druge pak strane, s obzirom da je MS poligenska bolest kod koje se ne očekuje da će pojedinačni utjecaj nekog gena biti veći od OR 1,4 potrebno je veliki broj bolesnika da bi se taj blagi utjecaj i utvrdio.

Nadalje, podaci o vrijednostima t-PA, PAI-1 i ACE u serumu bi svakako obogatilo naše istraživanje jer bismo mogli korelirati genotipove s fenotipskim obilježjima u naših bolesnika, ali nažalost nismo bili u mogućnosti te podatke i pribaviti za sve ispitanike.

Konačno, utvrđeno je kako je fibrinoliza vrlo kompleksan proces u kojemu značajnu ulogu imaju interakcije između komponenti fibrinolitičkog, RAS i bradikinin sustava (166). Epistatsko djelovanje između gena ova tri sustava utječe na plazmatske razine t-PA i PAI-1 i samim tim na fibrinolitički kapacitet. S tim u svezi bilo bi neophodno pratiti i okolišnu pozadinu genetičkih utjecaja navedenih gena u smislu gen-okoliš interakcija, koje se također smatraju značajnim čimbenikom u reguliranju fibrinolitičkog potencijala (171). Od okolišnih čimbenika kao najznačajniji su se pokazali ishrana, pušenje i konzumacija alkohola. Mi nažalost nismo bili u mogućnosti dobiti vjerodostojne podatke o tim rizičnim faktorima kod naših bolesnika i kontrolnih ispitanika kako bi ih uključili u genetičku studiju i preciznije analizirali utjecaj složenog procesa kao što je fibrinoliza na etiopatogenezu MS.

S druge pak strane ova studija ima niz prednosti. Ne samo da predstavlja prvo genetičko istraživanje MS u BiH, već donosi i značajne podatke o učestalostima ispitivanih polimorfizama u stanovništvu Bosne i Hercegovine što doprinosi poznavanju genetičke strukture navedene populacije, te istraživanju drugih složenih poligenskih bolesti u ovoj regiji. Također se odlikuje originalnom pretpostavkom glede uloge gena uključenih u proces fibrinolize kao mogućnih rizičnih faktora u MS, obuhvata pomni odabir kontrolnih ispitanika, te selekcionirane homogene subkategorije bolesnika u odnosu na tipove bolesti i spol, dakle sve preduvjete koje dovode do točnijih procjena značajnosti pojedinih gena u etiologiji ove bolesti.

Zaključno, u našoj studiji su se po prvi puta kao mogući rizični faktori u MS analizirali pojedinačni i međusobni utjecaj specifičnih polimorfizama u genima koji direktno (TPA i PAI-1) ili indirektno (ACE) reguliraju proces fibrinolize u MS bolesnika. S obzirom na genetičku i etiološku heterogenost MS značajno je što je istraživanje provedeno u etnički bliskoj populaciji s dosadašnjim studijama u

slovenskih i hrvatskih bolesnika. Smatramo da je s obzirom na različito etničko mješanje koje postoji u udaljenim kavkaskim populacijama prvo važno naći potvrdu rezultata u susjednim populacijama.

Naše istraživanje nije pokazalo utjecaj polimorfizama TPA, PAI-1 i ACE gena, niti njihovog međudjelovanja, na predispoziciju za MS u BiH bolesnika, dok su uočeni određeni trendovi u povezanosti pojedinih genotipova i njihovih kombinacija s elementima ekspresije bolesti od kojih su neke dosegle razinu statističke značajnosti. Razlog što nismo potvrdili rezultate istraživanja provedenih u etnički bliskim populacijama Hrvatske i Slovenije nalazimo u nedostatnoj veličini uzorka u našem istraživanju. S tim u svezi će planirani nastavak istraživanja biti temeljen na većem broju ispitanika, pri čemu će se ispitivati i ostali geni fibrinolitičkog, RAS i bradikinin sustava koji direktno ili indirektno utječu na znatno reducirani fibrinolitički potencijal u MS bolesnika. Takve planirane studije se svojim sveobuhvatnim i originalnom pristupom uklapaju u aktualne trendove u istraživanju MS, te zasigurno mogu doprinijeti boljem razumijevanju patogeneze MS, pomoći u razjašnjavanju podložnosti za MS, kao i u posljedičnoj modifikaciji tijeka bolesti.

6. ZAKLJUČCI

1. U MS bolesnika utvrđene su značajne razlike u pojedinim kliničkim karakteristikama ovisno o spolu i tijeku bolesti, pri čemu je raniji početak uočen u muškaraca u skupinama RR ($p=0,012$) i RR+SP ($p=0,023$), dok je kraće trajanje bolesti zabilježeno u žena s RRMS ($p=0,004$), te viši EDSS u žena sa SPMS ($p=0,031$).

2. Iako su MS bolesnici imali veću učestalost II genotipa (31,8%) i I alela (53,5%) u odnosu na kontrolne ispitanike (II=24,7%; I=50,3%), pri čemu je isti trend zamijećen u oba spola, distribucija TPA I/D alela i genotipova ne pokazuje značajnu razliku s obzirom na tijek bolesti ili spol bolesnika ($p>0,05$), što ukazuje da TPA I/D polimorfizam nema utjecaja na podložnost za MS u uzorku BiH bolesnika.

3. Distribucija PAI-1 4G/5G genotipova i alela je bila podjednako raspoređena u skupinama bolesnika i kontrolnih ispitanika, kao i u podskupinama formiranim prema spolu i tijeku bolesti ($p>0,05$), što govori da PAI-1 4G/5G polimorfizam nema značajan utjecaj na predispoziciju za MS.

4. ACE I/D polimorfizam također ne pridonosi podložnosti za MS, jer se učestalost genotipova i alela u ukupnom uzorku MS bolesnika nije značajno razlikovala od frekvencije u zdravih ispitanika, kao ni kad su ispitanici stratificirani prema spolu ili subtipovima bolesti ($p>0,05$).

5. Bolesnici s PPMS imali su veću učestalost rizičnih PAI-1 4G4G genotipa (30,0%) i 4G alela (60,0%) u odnosu na kontrolne ispitanike (4G4G=25,9%; 4G=51,5%), kao i veću učestalost ACE DD genotipa (50,0%) i D alela (60,0%) u odnosu na kontrolu (DD= 29,4%; D=55,6%), ali razlike ipak nisu dosegle razinu statističke značajnosti ($p>0,05$).

6. U PPMS opaženi su trendovi kasnijeg nastupa bolesti od 10 godina ($p=0,095$), kao i kraćeg trajanja za 6 godina ($p=0,057$) u bolesnika s 4G4G genotipom u odnosu na ostale PAI-1 genotipove.

7. U RR+SP bolesnika EDSS je značajno ovisio o interakciji TPA I/D i PAI-1 polimorfizma u muških bolesnika ($p=0,007$), od kojih su najvišu vrijednost imali oni s TPA II i PAI-1 4G5G genotipovima, a također se pokazao ovisnim o međudjelovanju sva tri polimorfizma, premda s manjom značajnošću ($p=0,023$), što ukazuje da na vrijednost skale invaliditeta u muških bolesnika pretežno utječu TPA I/D i PAI-1 4G/5G polimorfizmi.

8. U RR+SP bolesnica je na trajanje bolesti značajno utjecala interakcija PAI-1 4G/5G i ACE I/D polimorfizama ($p=0,012$), pri čemu su one s 4G4G i DD genotipovima imale kraće trajanje bolesti od 2-6 godina u odnosu na ostale kombinacije genotipova.

9. Ravnomjerna distribucija genotipova i alela u MS bolesnika i kontrolnih ispitanika ukazuje da ne postoji značajan utjecaj polimorfizama TPA, PAI-1 i ACE gena, niti njihovog međudjelovanja, na predispoziciju za MS u BiH bolesnika.

10. Uočeni trendovi u povezanosti pojedinih genotipova i njihovih kombinacija s pojedinim kliničkim karakteristikama, od kojih su neki dosegli razinu statističke značajnosti, govore o mogućem učinku zajedničkog djelovanja TPA, PAI-1 i ACE gena na kliničku ekspresiju bolesti u BiH.

7. LITERATURA

1. Poeck K. Neurologija. Zagreb: Školska knjiga, 1994; str. 413-15.
2. Compston A. Confavreux C. The natural history of multiple sclerosis. U: Compston A, ur. McAlpine's multiple sclerosis, (4th ed.), London: Churchill Livingstone, 2006; str. 197-269.
3. Timothy J Fowler, John W Skedding. Clinical Neurology, London: Hodder Arnold, 2003; str. 287-346.
4. Davenport C. Multiple sclerosis from the stand point of geographical distribution and race. Arch Neurol Psychiatry 1922;8:51-8.
5. Lindberg CC. The geographical distribution of multiple sclerosis and its estimated prevalence in the United States. Proceedings of the Association reaserch on nervous and mental disease, 1950;18:355-64.
6. Warren S, Warwn KG. Multiple sclerosis. Geneva: WHO; 2001; str.16-66.
7. Compston A, Confavreux C. The distribution of multiple sclerosis U: Compston A, ur. McAlpine's Multiple Sclerosis, (4th ed.), London: Churchill Livingstone, 2006; str. 76-94.

8. Sadovnick AD. Genetic epidemiology of multiple sclerosis: a survey. *Ann Neurol* 1994;36(suppl 2):194-203.
9. Riise T. Cluster studies in multiple sclerosis. *Neurology* 1997;49(Suppl 2):27-32.
10. Kurtzke JF. Multiple sclerosis in time and space-geographic clues to cause. *Journal of Neurovirology* 2000;6(Suppl 2):134-40.
11. Sepčić J. et al. Multiple sclerosis cluster in Gorski Kotar, Croatia, Yugoslavia. U: Battaglia M, ed. *Multiple sclerosis research*. Amsterdam: Elsevier, 1979; str. 165-9.
12. Peterlin B, Ristić S, Sepčić J et al. Region with persistent high frequency of multiple sclerosis in Croatia and Slovenia. *J Neurol Sci* 2006;247:169-72.
13. Kurtzke JF, Helteberg A. Multiple sclerosis in Faroe islands. An epitome. *J Clin Epidemiol* 2001;54:1-22.
14. Poser CM, Hibberd PL, Benedikt J, Gudmundsson G. Analysis of the „epidemic“ of multiple sclerosis in the Faroe Islands I. Clinical and epidemiological aspects. *Neuroepidemiol* 1998;7:168-180.

15. Poser CM, Hibberd PL. Analysis of the „epidemic“ of multiple sclerosis in the Faroe Islands II. Biostatistical Aspects Neuroepidemiol 1988;7:181-9.
16. Kurtzke JF, Hyllested K. Multiple sclerosis in the Faroe Island I. Clinical and epidemiological features. Ann Neurol 1979;5:6-21.
17. Kurtzke JF, Hyllested K. Multiple sclerosis in the faroe islands III. An alternative assessment of the three epidemics. Acta Neurol Scand 1987;76:317-39.
18. Pugliatti M, Sotgiu S, Rosati G. The worldwide prevalence of multiple sclerosis. Clin Neurol Neurosurg 2002;104:182-91.
19. Tienari P, Bonetti A, Pihlaja H, Saastamoinen KP, Rantamaki T. Multiple sclerosis in G: genes and geografy. Clin Neurol Neurosurg 2006;108:223-6.
20. Kahana E. Epidemiologic studies of multiple sclerosis: a review. Biomed Pharmacother 2000;54:100-2.
21. Poser CM. The dissemination of multiple sclerosis: a Viking saga? A historical essay Ann Neurol 1994;36 (Suppl 2):321-43.

22. Cabre P, Signate S, Olindo S et al. Role of return migration in the emergence of multiple sclerosis in the French West Indies, *Brain* 2005;128:2899-910.
23. Dean G. Annual incidence, prevalence and mortality of multiple sclerosis in white South-African-born and in white immigrants to South Africa. *BMJ* 1967;2:724-30.
24. Elian M, Nightingale S, Dean G. Multiple sclerosis among United Kingdom born children of immigrants from the Indian subcontinent, Africa and West Indies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1990;53:906-11.
25. Alter M, Leibowitz U, Speer J. Risk of multiple sclerosis related to age at immigration to Israel. *Arch Neurol* 1966;15:234-7.
26. Compston A. The epidemiology of multiple sclerosis: principles, achievements and recommendations. *Ann Neurol* 1994;36(suppl):211-17.
27. Kurtzke J. Epidemiology of multiple sclerosis. U: Hallpike JF, Adams CWM, Tourtellotte WW, eds. *Multiple sclerosis*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1983; str. 49-53.
28. Kantarci O, Wingerchuk D. Epidemiology and natural history of multiple sclerosis: new insights. *Curr Opin Neurol* 2006;19:248-54.

29. Fowler TJ and Skadding JW. Clinical Neurology, London: Hodder Arnold, 2003; str. 413-20.
30. Polman CH, Reingold SC, Edan G, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the „Mc Donald Criteria“. Ann Neurol 2005;58:840-6.
31. Hynson JL, Kornberg AJ, Coleman LT, et al. Clinical and neuroradiological features of acute disseminated encephalomyelitis in children. Neurology 2001;1308-12.
32. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. Lancet 2008;372:1502.
33. Lawrence S, Zamvil S. Transcriptional analysis of targets in multiple sclerosis. Nature Reviews Immunology 2003;3: 483-92.
34. Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP. New concept in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. Nature Reviews Neuroscience 2002;3:291-301.
35. Weiner HL. Multiple sclerosis is an inflammatory T-cell-mediated autoimmune disease. Arch Neurol 2004;61:1613.
36. Brinar V, Petelin Ž. Multipla skleroza - Klinička slika, dijagnostika i liječenje. Medix 2003;9:66-70.

37. Poser CM. The epidemiology of multiple sclerosis: A general overview, *Ann Neurol* 1994;36(Suppl.2):180-93.
38. Ulet G. Geographic distribution of multiple sclerosis. *Diseases of the Nervous System* 1946;9:342-6.
39. Lauer K: Environmental association with the risk of multiple sclerosis. The contribution of ecological studies. *Acta Neurol Scand* 1995;61(Suppl.2):77-88.
40. Poskanzer DC, et al. The etiology of multiple sclerosis: temporal-spatial clustering indicating two environmental exposures before onset. *Neurology* 1981;6:708-13.
41. Alizedah M, et al. Genetic analysis of multiple sclerosis in Europeans: French data. *J Neuroimmunol* 2003;143:76-8.
42. Ebers GC. Genetic epidemiology of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 1996;9:155-8.
43. Sadovnick AD. Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. *Lancet* 1996;347:1728-30.
44. Sadovnick AD. A population-based study of multiple sclerosis in twins update. *Ann Neurol* 1993;33:281-5.

45. Hawkes CH, MacGregor AJ. Twin studies and the heritability of MS: a conclusion. *Mult Scler* 2009;15(6):661-67.
46. Lauer K. Ecological studies of multiple sclerosis. *Neurology* 1997;49 (Suppl 2):518-26.
47. Ruth AM. Environmental risk factor in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2004;3:709-18.
48. Compston A, Wekerle H. The genetics of multiple sclerosis. U: Compston A, ur. *McAlpine's Multiple Sclerosis*, (4th ed.) London: Churchill Livingstone, 2006; str. 123-63.
49. Kenealy SJ, Pericak-Vance MA, Haines JL. The genetic epidemiology of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2003;143:7-12.
50. Kinnunen E, Juntunen J, Ketonen L, et al. Genetic susceptibility to multiple sclerosis: a co-twin study of a nation wide series. *Arch Neurol* 1988;45:1108-11.
51. Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2004;3:104-10.

52. Robertson NP, O’Riordan JI, Chataway JI et al. Offspring recurrence rates and clinical characteristics of conjugal multiple sclerosis. *Lancet* 1997; 349:1567-90.
53. Ebers GC, Yee IML, Sadovnick AD, Duquette P. Conjugal multiple sclerosis: population based prevalence and recurrence risks in offspring. *Ann Neurol* 2000;48:927-31.
54. Sadovnick DA, Yee IML, Ebers GC. Recurrence risks to sibs of MS index cases: impact of consanguineous matings. *Neurology* 2001;56:784-85.
55. Ebers GC. Environmental factors and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2008;7:268-77.
56. Comabella M, Martin R. Genomics in multiple sclerosis-current state and future directions. *J Neuroimmunol* 2007;187:1-8.
57. Oksenberg JR, Baranzini SE, Barcellos LF, Hauser SL. Multiple sclerosis: Genomic rewards. *J Neuroimmunol* 2001;113:171-84.
58. Ramagopalan SV, Ebers GC. Genes for multiple sclerosis. *Lancet* 2008;371:283-5.
59. Hafler DA, Compston A, Sawcer S et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genome wide study. *N Engl J Med* 2007;357(9):851-62.

60. Weber F, Fontaine B, Cournu-Rebeix I et al. IL2RA and IL7RA genes confer susceptibility for multiple sclerosis in two independent European populations *Genes Immun* 2008;9(3):259-63.
61. Ramagopalan SV, Maugeri NJ, Handunnetthi L et al. Expression of the multiple Sclerosis-Associated MHC Class II Allele HLA-DRB1*1501 is regulated by Vitamin D. *PloS Genet* 2009;5 (2):1000369.
62. Compston A, Wekerle H. The genetics of multiple sclerosis. U: McAlpine's Multiple Sclerosis, (4th ed.) London: Churchill Livingstone, 2006; str. 113-82.
63. Nino M, Fukazawa T, Kikuchi S, Sasaki H. Recent advances in genetic analysis of multiple sclerosis: genetic associations and therapeutic implications. *Expert Rev Neurother* 2007;7:1175-88.
64. Teuscher C, Doerge RW, Fillmore RD et al. EAE 36, a locus on mouse chromosome 4, controls susceptibility to experimental allergic encephalomyellitis in older mice immunized in the winter. *Genetics* 2006;172:1147-53.
65. Kjellen P, Issazedah S, Olsson T et al. Genetic influence of disease course and cytokine response in relapsing experimental allergic encephalomyellitis. *Int immunol* 1998;10:333-40.

66. Rubio JP, Speed T, Bahlo M, Kilpatrick TJ, Foote SJ. The current state of multiple sclerosis genetic research. *Ann Acad Med Singapore* 2000;29:322-30.
67. Crnić-Martinović M, Grahovac B, Jeras BV, Ristić S, Sepčić J, Brajenović-Milić B, Peterlin B, Kapović M. HLA class II polymorphism in autochthonous population of Gorski kotar, Croatia. *Coll Antropol* 2007;31:853-8.
68. Premužić Lampić M. Hematologija, klinička i laboratorijska. Zagreb: Medicinska naklada, 2000; str.18-21.
69. Jakšić B, Labar B, Grgičević D. Hematologija i transfuziologija. Zagreb: Medicinska naklada, 1989; str. 470-543.
70. East E, Baker D, Pryce G, Lijnen HR, Cuzner ML, Gverić D. A role for the plasminogen activator system in inflammation and neurodegeneration in the central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. *Am J Pathol* 2005;167(2):545-54.
71. Gverić D, Hanemaaijer R, Newcombe J, van Lent NA, Sier CF, Cuzner ML. Plasminogen activators in multiple sclerosis lesions: implications for the inflammatory response and axonal damage. *Brain* 2001;124:1978-88.

72. Lo EH, Wang X, Cuzner ML. Extracellular proteolysis in brain injury and inflammation: role for plasminogen activators and matrix metalloproteinases. *J Neurosci Res* 2002;69:1-9.
73. Teesalu T, Hinkkanen AE, Vaehri A. Coordinated induction of extracellular proteolysis systems during experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Am J Pathol* 2001;159:227-37.
74. Gverić D, Herrera BM, Cuzner ML. Impaired fibrinolysis in multiple sclerosis: a role for tissue plasminogen activator inhibitors. *Brain* 2003; 126:1590–8.
75. Akenami FO, Koskiniemi M, Farkkila M, Vaehri A. Cerebrospinal fluid plasminogen activator inhibitor-1 in patients with neurological disease. *J Clin Pathol* 1997;50:157-60.
76. Akassoglou K, Kombrinck KW, Degen JL, Strickland S. Tissue plasminogen activator-mediated fibrinolysis protects against axonal degeneration and demyelination after sciatic nerve injury. *J Cell Biol* 2000; 149:1157-66.
77. Paterson PY. Experimental allergic encephalomyelitis: a role of fibrin deposition in immunopathogenesis of inflammation in rats. *Fed Proc* 1976;35:2428-30.

78. Steeds R, Adams M, Smith P, Channer K, Samani NJ. Distribution of tissue plasminogen activator insertion/deletion polymorphism in myocardial infarction and control subjects. *Thromb Haemost* 1998;79:980-4.
79. Jern C, Ladenvall P, Wall U, Jern S. Gene polymorphism of t-PA is associated with forearm vascular release rate of t-PA. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19(2):454-9.
80. Margaglione M, Grandone E, Cappucci G i sur. An alternative method for PAI promoter polymorphism (4G/5G) typing. *Thromb Haemost* 1997;77(3):605-6.
81. Eriksson P, Kllin B, Van't Hooft FM, Bvenholm P, Hmsten A. Allele-specific increase in basal transcritpion of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92(6):1851-5.
82. Luomala M, Elovaara I, Ukkonen M, Koivula T, Lehtimaki T. Plasminogen activator inhibitor 1 gene and risk of MS in women. *Neurology* 2000;54:1862-4.
83. Lovrečić L, Ristić S, Starčević-Čizmarević N. et al. PAI and TPA gene polymorphism in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2008;14:243-7.

84. Constantinescu CS, Goodman DB, Hillard B, Wysocka M, Cohen JA. Murine macrophages stimulated with central and peripheral nervous system myelin or purified myelin proteins release inflammatory products. *Neurosci Lett* 2000;30:171-4.
85. Constantinescu CS, Ventura E, Hilliard B, Rostami A. Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor captopril on experimental autoimmune encephalomyellitis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1995; 17(3):471-91.
86. Schweisfurth H, Schioeberg-Schiegnitz S, Kuhn W, Parusel B. Angiotensin I converting enzyme in cerebrospinal fluid of patients with neurological diseases. *Klin Wochenschr* 1987; 65:955–8.
87. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990;86(4):1343-6.
88. Lovrečić L, Ristić S, Starčević-Čizmarević N et al. Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism and risk of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2006;114:374-7.
89. Confavreux C, Compston DAS, Hommes OR, McDonald WI, Thompson AJ. EDMUS, a European database for multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 1992;55:671-6.

90. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33:1444-52.
91. Karadeniz M, Erdogan M, Berdeli A, Saygili F, Yilmaz C. 4G/5G polymorphism of PAI-1 gene and Alu-repeat I/D polymorphism of TPA gene in Turkish patients with polycystic ovary syndrome. *J Assist Reprod Genet* 2007;24(9):412-8.
92. users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html
93. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86(4):1343-6.
94. Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene. *Nucl Acid Res* 1992; 20:1433.
95. Oksenberg R, Baranzini SE, Sawcer S, Hauser SL. The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. *Nat Rev Genet* 2008;9:516-26.
96. Hawkes CH, Macgregor AJ. Twin studies and the heritability of MS: a conclusion. *Mult Scler* 2009;15:661-7.

97. Fernald GH, Yeh RF, Hauser SL, Oksenberg JR, Baranzini SE. Mapping gene activity in complex disorders: integration of expression and genomics scans for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2005;167:157-69.
98. Haines JL, Terwedow HA, Buress K, Pericak-Vance MA, Rimmner JB, Martin ER, et al. Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. The multiple sclerosis genetics group. *Hum Mol Genet* 1998;7:1229-34.
99. Hoffjan S, Nicolae D, Ober C. Association studies for asthma and topic diseases: a comprehensive review of the literature. *Respir Res* 2003;4:14.
100. Gverić D, Herrera BM, Cuzner ML. tPA receptors and the fibrinolytic response in multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol* 2005;166 (4):1143-51.
101. Chandler WL, Alessi MC, Aillaud MF, Vague P, Juhan-Vague I, Formation, inhibition and clearance of plasmin in vivo. *Haemostasis* 2000;30:204-18.
102. Calabrese P, Napolitano M, Centonze D, Marfia GA, Gubellini P, Teule MA et al. Tissue plasminogen activator controls multiple forms of synaptic plasticity and memory. *Eur J Neurosci* 2000;12:1002-12.

103. Strickland S. Tissue plasminogen activator in nervous system function and dysfunction. *Thromb Haemost* 2001;86:138-43.
104. Siconolfi LB, Seeds NW. Mice lacking tPA, uPA or plasminogen genes showed delayed functional recovery after sciatic nerve crush. *J Neurosci* 2001;21:4348-55.
105. Kopeikina LT, Kamper EF, Koutskoukos V, Bassiakos Y, Stavridis I. Imbalance of tissue type plasminogen activator (tPA) and its specific inhibitor (PAI-1) in patients with rheumatoid arthritis associated with disease activity. *Clin Rheumatol* 1997;16:254-60.
106. Kermode AG, Thompson AJ, Tofts P, MacManus DG, Kendall BE, Kingsley DP, et al. Breakdown of the blood brain barrier precedes symptoms and other MRI signs of new lesions in multiple sclerosis. Pathogenetic and clinical implications. *Brain* 1990;113:1477-89.
107. Wakefield AJ, More LJ, Difford J, McLaughlin JE. Immunohistochemical study of vascular injury in acute multiple sclerosis. *J Clin Pathol* 1994; 47:129-33.
108. De Sain-van der velden M, Smolders HC, van Rijn HJM, Voorbii HAM. Does albumin play role in fibrinolysis by its inhibition activation? *Fibrinol Proteol* 2000;14:242-6.

109. Deng G, Curriden SA, Wang S, Rosenberg S, Loskutoff DJ. Is plasminogen activator inhibitor-1 the molecular switch that governs urokinase receptor-mediated cell adhesion and release? *J Cell Biol* 1996;134:1563-71.
110. Constantinescu CS, Goodman DB, Hilliard B, et al. Murine macrophages stimulated with central and peripheral nervous system myelin or purified myelin proteins release inflammatory products. *Neurosci Lett* 2000; 30:287:171-4.
111. Kawajiri M, Mogi M, Higaki N, et al. Angiotensin-converting enzyme (ACE) and ACE2 levels in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2009;15:262-5.
112. Ferrario CM. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-1-7: an evolving story in cardiovascular regulation. *Hypertension* 2006;47:515-21.
113. Kawajiri M, Mogi M, Osoegawa M, et al. Reduction of angiotensin II in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2008;14:557-60.
114. Pugliati M, Rosati G, Carton H, Riise T, Drulović J, Vecsei L, Milanov I. The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *Eur J Neurol* 2006;13:700-22.

115. Leibowitz U, Kahana E, Alta M. The changing frequency of multiple sclerosis in Israel. Arch Neurol 1973;29(2):107-10.
116. Schoenhard JA et al. Male-female differences in the genetic regulation of t-PA and PAI-1 levels in a Ghanaian population. Hum Genet 2008;124:479-488.
117. Klupka-Sarić I, Ristić S, Sepčić J, Kapović M, Peterlin B, Materljan E et al. Epidemiology of multiple sclerosis in Western Herzegovina. Clin Neurol Neurosurg 2007;109:779-83.
118. Klupka-Sarić I, Galić M. Epidemiology of multiple sclerosis in western Herzegovina and Herzegovina-neretva Canton, Bosnia and Herzegovina. Coll Antropol 2010;34 (Suppl 1):189-93.
119. Solaro C, Allemani C, Messmer Ucelli M, Canevari E, Dagnino N. et al. The prevalence of multiple sclerosis in the north-west Italian province of Genoa. J Neurol 2005;252:436-44.
120. Materljan E. Epidemiologija multiple skleroze u Istri. (Magistarski rad), Rijeka, Hrvatska: Sveučilište u Rijeci, 1984; str.104.
121. Broman T, Andersen O, Bergman L. Clinical studies on multiple sclerosis. Presentation of an incidence material from Gothebourg. Acta Neurol Scand, 1981;63(1):6-33.

122. Runmarker B, Andersen O. Prognostic factors in a multiple sclerosis incidence cohort with twenty-five years of follow up. *Brain* 1993;116:117-34.
123. Eriksson M, Andersen O, Runmarker B. Long-term follow up of patients with clinically isolated syndroms, relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 2003;9(3):260-74.
124. Bensen JT, Hsu FC, Borwn WM, Sutton BS, Norris JM, Tracy RP, et al. Association analysis of the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism in Hispanics and African Americans: the IRAS family study. *Hum Hered* 2004;57(3):128-37.
125. Yasuda S, Tsutsumu A, Atsumi T, Bertolaccini ML, Ichikawa K, Khamashta MA, et al. Gene polymorphism of tissue plasminogen activator and plasminogen activators inhibitor-1 in patients with antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol* 2002;29(6):1192-7.
126. Leander K, Wiman B, Hallquist J, Sten-Linder M, de Faire. PAI-1 level and the PAI-1 4G/5G polymorphism in relation to risk of non-fatal myocardial infarction: results from the Stocholm heart epidemiology program (SHEEP). *Thromb Haemost* 2003;89(6):1064-71.

127. Zhan M, Zhou Y, Han Z. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G gene polymorphism in patients with myocardial or cerebrovasculars infarction in Tianjin, China. *Chin Med J (Engl.)* 2003;116(11):1707-10.
128. Wiman B. Plasminogen activator inhibitor-1 in thrombotic disease. *Curr Opin in Hematol* 1996;3:372-378.
129. Farb A, Burke AP, Kolodgie FD, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 is a determinant of coronary thrombosis in sudden cardiac death. *JACC* 1996;27:108.
130. Dawson SJ, Wilman B, Hamsten A, et al. The two allele sequences of common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in hepG2 cells. *J Biol Chem* 1993;268:10739-10745.
131. Ma Z, Paek D, Oh CK. Plasminogen activator inhibitor-1 asthma: role in the pathogenesis and molecular regulation. *Clin Exp Allergy* 2009;39(8):1136-44.
132. Buckova D, Izakovicova Holla L, Vacha J. Polymorphism 4G/5G in the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene is associated with igE-mediated allergic diseases and asthma in the Czech population. *Allergy* 2002;57(5):446-8.

133. Cho SH, Tam SW, Demissie-Sanders S, Filler SA, Oh CK. Production of plasminogen activator inhibitor-1 by human mast cells and its possible role in asthma. *J Immunol* 2000;165:3154-3161.
134. Cho SH, Hall IP, Wheatley A, Dewar J, Abraha D, Del mundo J, Lee H, Oh CK. Possible role of the 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor 1 gene in the development of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;106:212-14.
135. Holgate ST. Genetic and environmental interaction in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:1139-46.
136. Chen YL, Zhang JX, Wang PX, Cui RZ, Zhao FM, mao YM, Li JY, Bi YY, Li H. Association of 4G/5G polymorphism in PAI-1 promoter with PAI-1 level in deep vein thrombosis. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2005;22:624-7.
137. Emingil G, Berdeli A, Gürkan A, han Saygan B, Köse T, Atilla G. Gene polymorphisms of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in Turkish patients with generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2007;34(4):278-84.
138. Terzić R, Letonja M, Terzić I, et al. Insertion/deletion polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene risk factor for coronary artery disease in the Tuzla region population (Bosnia and Herzegovina). *Coll Antropol* 2003;27:537-40.

139. Barbalić M, Perić M, Skarić-Jurić T, et al. Ace Alu insertion polymorphism in Croatia and its isolates. *Coll Antropol* 2004;28:603-10.
140. Yuan-Han Yang, Ching-Kuan. Angiotensin Converting Enzyme gene in Alzheimer disease. *Tohoku S Exp Med* 2008;215:295-8.
141. Oba R, Igaraska A, Kamato M, Nagato K, Takona S, Nakagawa H. The N-terminal active centre of human angiotensin converting enzyme degrades Alzheimer amyloid β -peptide. *Eur J Neurosci* 2005;21:733-4.
142. Ohnishi T, Tamiko N, Sato-Nakagawa T. Effects of brain-penetrating ACE inhibitors on Alzheimer disease progression. *Neurology* 2004;63:1324-5.
143. Pascale E, Purcaro C, Passarelli E, Guglielmi R, Vestri AR, Passarelli F, Meco G. Genetic polymorphism of angiotensin-converting enzyme is not with the development of Parkinson disease and of L-dopa induced adverse effects. *J Neurol Sci* 2009;276:18-21.
144. Lin JJ, Yueh KC, Lin SZ, Harn HJ, Liu JT. Genetic polymorphism of the angiotensin converting enzyme and L-dopa-induced adverse affects in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 2007;252:130-4.
145. Konings CH, Kuiper MA, Bergmans PL, Grijpma AM, Van Kamp GJ, Wolters EC. Increased angiotensin-converting enzyme activity in

cerebrospinal fluid of treated patients with Parkinson's disease. Clin Chim Acta 1994;231:101-6.

146. Crescenti A, Gasso P, Mas S, Abellana R, Deulofeu R, Parellada E, Bernardo M, Lafuente A. Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene is associated with schizophrenia in Spanish population. Psychiat Res 2009;165:175-80.
147. Choi YH, Kim JH, Kim DK, Kim JW, Lee MS, Kim CH, Park SC. Distributions of ACE and APOE polymorphism and their relations with dementia status in Korean centenarians. The J Gerontol. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences 2003;58:227-31.
148. Illi A, Kampman O, Anttila S, Roivas M, Mattila KM, Lehtimäki T, Leinonen E. Interaction between angiotensin-converting enzyme and catechol-O-methyltransferase genotypes in schizophrenics with poor response to conventional neuroleptics. Neuropsychopharmacol 2003;13: 47-51.
149. Papadopoulos KI, Melander O, Orho-Melander L, Groop C, Carlsson M, Hallengren B. Angiotensin converting enzyme (ACE) gene polymorphism in sarcoidosis in relation to associated autoimmune diseases. J Intern Med 2000;247:71-7.

150. Pertschuk LP, Silevrfstein E, Friedland J. Immunohistologic diagnosis of sarcoidosis: detection of angiotensin converting enzyme in sarcoid granulomas. *Am J Clin Pathol* 1981;75:350-4.
151. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin-1 converting enzyme levels. *J Clin Invest* 1990;86:1343-6.
152. Furuya K, Yamaguchi E, Itoh A et al. Deletion polymorphism in the angiotensin I converting enzyme (ACE) gene as a genetic risk factor for sarcoidosis. *Thorax* 1996;51:777-80.
153. Adel M, Al-Awadhi-Eman A, Hasan-Prem N, Sharma M, Zafaryab Haider Khaled al-Saeid. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in patients with psoriatic arthritis. *Rheumatol Int* 2007;27:1119-23.
154. Petrov V, Fagard R, Lijnen P. Effect of protease inhibitors on Angiotensin converting enzyme activity in human T-lymphocytes. *Am J Hypertens* 2000;13:535-9.
155. Ozkur M, Erbagci Z, Nacak M, Tuncel AA, Alasehirli B, Aynacioglu AS. Association of insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene with psoriasis. *Br J Dermatol* 2004;151:792-5.

156. Rahman P, Elder JT. Genetic epidemiology of psoriasis and psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64(suppl 2):137-9.
157. Oruc N, Papachristou GI, Avula H, Slivka A, Lamb J, Whitcomb DC. Angiotensin-converting enzyme gene DD genotype neither increases susceptibility to acute pancreatitis nor influences disease severity. *HPB (Oxford)* 2009;11(1):45-9.
158. Leung PS, Chappell MC. A local pancreatic renin-angiotensin system endocrine and exocrine roles *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:838-46.
159. Oruc N, Lamb J, Kutlu OC, Barmada MM, Money ME, Slivka A et al. The functional angiotensin –converting enzyme gene I/D polymorphism does not alter susceptibility to chronic pancreatitis. *JOP* 2004;10:457-83.
160. Oruc N, Lamb J, Witcomb D, Sass A. The ACE gene I/D polymorphism does not affect the susceptibility to or prognosis of PBC. 2008;19(4): 50-3.
161. Lleo A, Invernizzi P, Mackay IR, et al. Etiopathogenesis of primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2008;14:3328-37.
162. Ebrahimian TG, Tamarat R, Clergue M, et al. Dual effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on angiogenesis in type 1 diabetic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:65-70.

163. Juran BD, Lazardis KN. Genetics and genomics of primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis* 2008;12:349-65.
164. Warner FJ, Lubel JS, McCaughan GW, et al. Liver fibrosis: a balance of ACEs? *Clin Sci* 2007;113:109-18.
165. Moore JH, Smolkin ME, Lamb JM, Brown NJ, Vaughan DE. The relationship between plasma t-PA and PAI-1 levels is dependent on epistatic effects of the ACE I/D and PAI-1 4G/5G polymorphisms. *Clin Genet* 2002;62:53-9.
166. Asselbergs FW, Williams SM, Hebert PR, Coffey CS, Hillege HL, et al. Epistatic effect of polymorphisms in genes from the renin-angiotensin, bradykinin and fibrinolytic systems on plasma t-PA and PAI-1 levels. *Genomics* 2007;89:362-9.
167. Gebara OC, Mittleman MA, Sutherland P, Lipinska I, Matheney T, Xu P et al. Association between increased estrogen status and increased fibrinolytic potential in the Framingham Offspring Study. *Circulation* 1995;91:1952–8.
168. Zhao YY, Zhou J, Narayanan CS, Cui Y, Kumar A. Role of C/A polymorphism at -20 on the expression of human angiotensinogen gene. *Hypertension* 1999;33:108–15.

169. Velez DR, Guraju D, Vinukonda G, Prater A, Kumar A, Williams SM. Angiotensinogen promoter sequence variants in essential hypertension. *Am J Hypertens* 2006;19:1278–85.
170. Pretorius M, Luther JM, Murphey LJ, Vaughan DE, Brown NJ. Angiotensin-converting enzyme inhibition increases basal vascular tissue plasminogen activator release in women but not in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2435–40.
171. Asselbergs FW, Williams SM, Hebert PR, Coffey CS, Hillege HL, Snieder H, Navis G, Vaughan DE, van Gilst WH, Moore JH. The effects of polymorphisms in genes from the renin-angiotensin, bradykinin, and fibrinolytic systems on plasma t-PA and PAI-1 levels are dependent on environmental context. *Hum Genet* 2007;122(3-4):275-81.

ŽIVOTOPIS

OSOBNİ PODACI

Ime i Prezime: Inge Klupka-Sarić

Datum i mjesto rođenja: 19.5.1962. Mostar, Bosna i Hercegovina

Kućna adresa: Hrvatske mladeži 20, Mostar. Tel. +(387 36) 321 962

Mob.tel.: +(387) 63 311 156

e-mail: ingeks@tel.net.ba

Službena adresa: SKB Mostar, Klinika za neurologiju, Bijeli Brijeg b.b.

Tel: +387/36336029

Izobrazba i zvanja:

1986. diplomirala na Medicinskom fakultetu u Sarajevu

1998. položila specijalistički ispit iz Neurologije

2006. stekla zvanje magistra medicinskih nauka na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Sarajevu; poslijediplomski studij, smjer kliničke discipline.

Profesionalno iskustvo:

Od 1987. do 1993. - ambulanta opće medicine i školski dispanzer.

Od 1994. do 1998. - specijalizant neurologije, a od 1998. specijalist neurolog na Klinici za Neurologiju SKB Mostar.

Od 2002. godine angažirana kao mlađi asistent, a od 2007. kao asistent na Medicinskom fakultetu u Mostaru na predmetu Neurologija

Usavršavanja:

1999. Tečaj iz epileptologije i neurofiziologije (EEG) u trajanju od šest mjeseci na Klinici za neurologiju KUMC Koševo u Sarajevu.

Članstva:

European Neurological Society, European Federation of Neurological Societies

Publikacije

1. Kvalifikacijski rad

Klupka-Sarić I. Deskriptivne i analitičke metode u ispitivanju multiple skleroze. Medicinski fakultet Univerziteta u Sarajevu; 2006. (Magistarski rad).

2. Znanstveni radovi objavljeni u časopisima koje registrira *SCI Expanded* / *CC*

Klupka-Sarić I, Ristić S, Sepčić J, Kapović M, Peterlin B, Materljan E, Jurišić T, Mamić Martinović D, Burina A, Šulentić V. Epidemiology of multiple sclerosis in western Herzegovina. Clin Neurol Neurosurg 2007;109(9):779-83.

Klupka-Sarić I, Galić M. Epidemiology of multiple sclerosis in western Herzegovina and Herzegovina-Neretva Canton, Bosnia and Herzegovina. Coll Antropol 2010; 34 Suppl 1:189-93.

2. Sažeci sa domaćih i inozemnih znanstvenih skupova:

Klupka-Sarić I, Alajbegović A. Deskriptivne epidemiološke karakteristike multiple skleroze u Hercegovini. Drugi kongres neurologa Bosne i Hercegovine s međunarodnim sudjelovanjem. Mostar: 9-12.11. 2006. Zbornik Radova:183.

Jurić S, Šulentić V, Škobić H, Klupka-Sarić I. Atipični Uhthoffov fenomen kod bolesnice oboljele od multiple skleroze. Drugi kongres neurologa Bosne i Hercegovine s međunarodnim sudjelovanjem. Mostar: 9-12.11.2006.

Klupka-Sarić I, Jović M, Jurić S, Jurišić T, Martinović Mamić D, Burina A. The presence of single initial symptoms in multiple sclerosis patients.,4th Dubrovnik International Conference on Multiple Sclerosis, Abstract, Neurologia Croatica 2007; 56 (Suppl.3):33.

Klupka-Sarić I, Galić M. Epidemiology of multiple sclerosis in Herzegovina. Meeting Abstract P 577, Journal of Neurology 2008;255(Suppl 2):143.