Učestalost polimorfizama gena AGT, ACE, AGTR1, ADRB1, UMOD i ADIPOQ u osoba s predhipertenzijom

Šimičević, Livija

Doctoral thesis / Disertacija

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:034289

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Livija Šimičević

Učestalost polimorfizama gena *AGT*, *ACE*, *AGTR1*, *ADRB1*, *UMOD* i *ADIPOQ* u osoba s predhipertenzijom

DISERTACIJA

Zagreb, 2020.

Disertacija je izrađena u Zavodu za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju Klinike za unutarnje bolesti i u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u sklopu znanstveno-istraživačkoga projekta “ENDEMSKA NEFROPATIJA U HRVATSKOJ: epidemiologija, dijagnostika i etiopatogeneza”, broj 108-0000000-0329, voditelj prof. dr. sc. Bojan Jelaković

Voditelj i su-voditeljica rada:
prof. dr. sc. Bojan Jelaković i prof. dr. sc. Jasna Lovrić

Zahvaljujem se mentorima prof. dr. sc. Bojanu Jelakoviću i prof. dr. sc. Jasni Lovrić što su me bezuvjetno podržali, svojim znanjem i savjetima pomogli i omogućili ovo opsežno istraživanje kao i na predanosti, pomoći i uloženom vremenu za vrijeme izrade ove disertacije.

Od srca hvala prof. dr. sc. Nadi Božina i prof. dr. sc. Jadranki Sertić na podršci, susretljivosti, savjetima i motivaciji da ustrajem u izradi ovog istraživanja.

Posebna zahvalnost Maji Mezak Herceg, bacc.med.lab.diagn, Zrinki Mirković, kem.teh. i Karolini Petrović, zdrav.lab.teh. na svoj podršci i pomoći tijekom istraživanja i oko molekularno laboratorijske obrade uzoraka.

Hvala na pomoći svim suradnicima projekta “ENDEMSKA NEFROPATIJA U HRVATSKOJ: epidemiologija, dijagnostika i etiopatogeneza“ i kolegama koji su na bilo koji način doprinjeli izradi ove disertacije.

Hvala dr. sc. Andrei Gelemanović na pomoći oko statističke obrade podataka.

Hvala mojim roditeljima i bratu što su mi cijeli život bili uvijek bezuvjetna podrška, hvala i prijateljima na potpori i razumijevanju tijekom istraživanja, a posebno tijekom pisanja ove disertacije.

I na kraju, hvala mom Velimiru na svoj ljubavi, strpljenju i podršci u ostvarivanju mojih znanstvenih težnji.

SADRŽAJ

Popis oznaka i kratica i

1. UVOD I SVRHA RADA 1

1.1. Predhipertenzija 1

1.1.1. Povijest i definicija predhipertenzije 1

1.1.2. Epidemiologija predhipertenzije 2

1.1.3. Rizični čimbenici predhipertenzije i predhipertenzija kao rizični čimbenik kardiovaskularne bolesti 3

1.1.4. Progresija predhipertenzije u arterijsku hipertenziju 5

1.2. Istraživanja gena u etiologiji hipertenzije i predhipertenzije 6

1.2.1. Geni kandidati odabrani za ovo istraživanje 7

1.3. Svrha rada 18

2. HIPOTEZA 19

3. CILJEVI RADA 20

3.1. Opći cilj 20

3.2. Specifični ciljevi 20

4. MATERIJALI I METODE 21

4.1. Ispitanici 21

4.2. Metode 22

4.2.1. Antropometrijski i klinički podaci 22

4.2.2. Biološki uzorci 23

4.2.3. Biokemijske analize 23

4.2.4. Analiza DNA 26

4.2.4.1. Izdvajanje DNA 26

4.2.4.2. Genotipizacija 27

4.3. Statistička obrada podataka 41

5. REZULTATI 43

5.1. Obilježja ispitanika 43

5.2. Raspodjela genotipova i učestalost pojedinih alela 52

5.3. Ostali određivani parametri 60

5.4. Interakcija genskih varijanti s ostalim određivanim parametrima 79

5.5. Interakcije gen – gen 89

5.6. Interakcije gen – gen – ostali određivani parametri 93

6. RASPRAVA 100

6.1. Povezanost genskih varijanti i predhipertenzije 101

6.2. Povezanost genskih varijanti i kardiovaskularnoga i renalnoga rizika 102

6.3. Povezanost genskih varijanti s određivanim parametrima 103
6.4. Povezanost ostalih čimbenika s predhipertenzijom, kardiovaskularnim i renalnim rizikom . 104
6.5. Povezanost interakcija gen – ostali čimbenici s predhipertenzijom 104
6.6. Povezanost interakcija gen – ostali čimbenici s kardiovaskularnim i renalnim rizikom..... 105
6.7. Povezanost interakcija gen – gen s predhipertenzijom..... 105
6.8. Povezanost interakcija gen – gen – ostali čimbenici s predhipertenzijom, kardiovaskularnim i renalnim rizikom 106
6.9. Znanstveni i klinički doprinos provedenoga istraživanja 107
6.10. Ograničenja istraživanja..... 108
7. ZAKLJUČCI 109
8. SAŽETAK..... 112
9. SUMMARY 114
10. POPIS LITERATURE..... 116
11. ŽIVOTOPIS..... 136

Popis oznaka i kratica

A1MCR	omjer alfa-1-mikroglobulina i kreatinina u mokraći, engl. *alpha-1-microglobulin-to-creatinine ratio*
ACC/AHA	Američki kardiološki zbor i Američka udruga za srce, engl. *American College of Cardiology i American Heart Association*
ACE	angiotenzin konvertaza, engl. *angiotensin-converting enzyme*
ACR	omjer albumina i kreatinina u mokraći, engl. *albumin-to-creatinine ratio*
ADIPOQ	gen za adiponektin
ADPN	adiponektin
ADRB1	beta-1-adrenergički receptor
AGT	angiotenzinogen
AGTR1	angiotensin II receptor 1
AH	arterijska hipertenzija
AMPK	5-adenozin monofosfat-aktivirane protein kinaze, engl. *5' adenosine monophosphate-activated protein kinase*
AT	arterijski tlak
cAMP	ciklički adenozin monofosfat
CI	interval pouzdanosti, engl. *confidence interval*
CDC	engl. *Centers for Disease Control*
CKD-EPI	engl. *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*
CRP	C-reaktivni protein
CRM 470	engl. *Certified Reference Material 470*
DAT	dijastolički arterijski tlak
db SNP	engl. *SNP Database - National Center for Biotechnology Information*
DNA	deoksiribonukleinska kiselina, engl. *deoxyribonucleic acid*
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina, engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*
eGFR	procjenjena glomerularna filtracija, engl. *estimated glomerular filtration ratio*
EMSE	N-etil-N-(3-metilfenil)-N'-sukcinil-etilendiamin
ESH-ESC	Europsko društvo za hipertenziju i Europsko društvo za kardiologiju, engl. *European Society of Hypertension – European Society of Cardiology*
FJHN	obiteljska juvenilna hiperuricemična nefropatija
FRET	fluorescentni rezonantni prijenos energije, engl. *fluorescence resonance energy transfer*
GDP	gvanozin difosfat

GPCR	obitelj receptora vezanih na G-protein, engl. *G protein-coupled receptors*
GTP	gvanozin trifosfat
GUK	glukoza u krvi
GWAS	cjelogenomska studija povezanosti, engl. *genome wide association study*
HDL	lipoprotein velike gustoće, engl. *high density lipoprotein*
HTIB	3-hidroksi-2,4,6-trijod -benzojeva kiselina, engl. *3-Hydroxy-2,4,6-triiodobenzoic acid*
HWE	Hardy Weinbergova ravnoteža
IKV	interkvartilni raspon
IDMS	izotopna dilucijska masena spektrometrija, engl. *isotope dilution mass spectrometry*
ITM	indeks tjelesne mase
IQR	interkvartalni raspon, engl. *interquartile range*
JNC 7	7. izvještaj Američkoga nacionalnog odbora za prevenciju, otkrivanje, evaluaciju i liječenje arterijske hipertenzije, engl. *Joint National Comitee for Prevention, Detection Evaluation and Treatment of High Blood Pressure*
KBB	kronična bubrežna bolest
KV	kardiovaskularni
LDL	lipoprotein male gustoće, engl. *low density lipoprotein*
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*
NHANES	engl. *The National Health and Nutrition Examination Survey*
NHBP	Nacionalni program edukacije o visokom arterijskom tlaku, engl. *National High Blood Pressure Education Program*
NKCC2	Na^+-K^+-$2Cl^-$ ko-transporter
NT	normotenzija
MCKD2	medularna cistična bubrežna bolest tip 2, engl. *medullary cystic kidney disease-2*
OR	omjer izgleda (šansi), engl. *odds ratio*
PCR	lančana reakcija polimeraze, engl. *polimerase chain reaction*
RAAS	renin-angiotenzin-aldosteronski sustav
RAS	renin-angiotenzinski sustav
RR	relativni rizik
SAT	sistolički arterijski tlak
SD	standardna devijacija
SDS	natrijev dodecil-sulfat, engl. *sodium dodecyl sulphate*

SE	standardna greška, engl. *standard error*
SF	srčana frekvencija
SNP	polimorfizam jednog nukleotida, engl. *single nucleotide polymorphism*
SŽS	središnji živčani sustav
TE	izvedenica od: Tris, EDTA, Mg^{2+}.
TM	tjelesna masa
TNF	čimbenik tumorske nekroze, engl. *tumor necrosis factor*
UMOD	gen za uromodulin
VLDL	lipoproteini vrlo male gustoće, engl. *very low density lipoproteins*
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija, engl. *World Health Organization*

1. UVOD I SVRHA RADA

Arterijska hipertenzija (AH) je glavni globalni nezavisni čimbenik rizika za smrtnost i razvoj kardiovaskularnih (KV), cerebrovaskularnih i bubrežnih bolesti. Osim AH kao mogući čimbenik rizika za razvoj navedenih bolesti prepoznato je i stanje visoko normalnoga arterijskog tlaka (AT). Za razliku od nekih drugih kompleksnih bolesti (šećerna bolest tipa 1 i 2) kod kojih su identificirani geni povezani s pojavnošću bolesti, etiopatogeneza primarne AH upućuje na poligenski karakter bolesti i uključenost brojnih čimbenika okoliša. Dosadašnja istraživanja genske podloge predhipertenzije su nedostatno provedena. Upravo je nedostatak genetičkih saznanja bio poticaj ovom istraživanju budući da je primjena genetike u dijagnostici i terapiji znatno unaprijedila klinički pristup te omogućila procjenu individualnoga rizika za razvoj pojedinih bolesti i time utjecala na smanjenje morbiditeta i mortaliteta.

1.1. Predhipertenzija

1.1.1. Povijest i definicija predhipertenzije

Robinson i Brucer su 1939. godine objavili rezultate istraživanja koji su ukazali na povezanost povećanoga rizika od pojave AH, KV bolesti i smrtnosti sa sistoličkim AT između 120 i 140 mmHg te se smatra da je tada prvi puta spomenut pojam predhipertenzije tj. visoko normalnoga AT (1). Tijekom 20-og stoljeća je objavljeno nekoliko znanstvenih radova koji su istraživali tu specifičnu populaciju, ali na manjim skupinama ispitanika te su podaci bili ograničeni (2-4). Tek je 2001. godine istraživanje *Framingham Heart Study*, provedeno na populaciji od 6859 ispitanika, dokazalo da je rizik za razvoj KV događaja 2,5 puta veći u žena s visoko normalnim AT (sistolički arterijski tlak (SAT) 130 – 139 mmHg ili dijastolički arterijski tlak (DAT) 85 – 89 mmHg, ili oboje), a 1,6 puta veći u muškaraca s istim vrijednostima AT u usporedbi s osobama koje imaju optimalan AT (< 120/80 mmHg) (5). Rezultati meta-analize, koja je obuhvatila podatke iz 61-oga prospektivnog istraživanja na ukupno oko milijun ispitanika, su pokazali linearni porast rizika mortaliteta zbog ishemijske bolesti srca i moždanoga udara u osoba starosti 40 – 89 godina koji je povezan s višim vrijednostima AT (6). Za svakih povišenih 20 mmHg SAT i 10 mmHg DAT iznad 115/75 mmHg dokazana je dvostruko veća smrtnost od ove dvije bolesti (6). Službena stručna definicija i koncept predhipertenzije je prvi puta donesena 2003. godine u 7. izvještaju Američkoga nacionalnog odbora za prevenciju, otkrivanje, evaluaciju i liječenje arterijske hipertenzije (engl. *Joint National Comitee for Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure*, JNC-7) za vrijednosti SAT 120 – 139 mmHg / DAT 80 – 89 mmHg. Izvještaj naglašava da predhipertenzija nije bolest već stanje te će takvo definiranje vrijednosti AT omogućiti bolju identifikaciju visokorizičnih osoba za razvoj AH.

Definicija ima ulogu osvještavanja i bolesnika i kliničara te potiče na intervenciju tj. promjenu životnih navika koja će spriječiti ili odgoditi razvoj predhipertenzije u AH (7). Smjernice Europskoga društva za hipertenziju i Europskoga društva za kardiologiju (engl. *European Society of Hypertension, European Society of Cardiology*, ESH/ESC) objavljene 2007. godine klasificiraju normalni AT na optimalni (< 120/80 mmHg), normalni AT (120/80–129/84 mmHg) i visoko normalni AT (130/85–139/89 mmHg) te ne uvode zaseban pojam predhipertenzije (8). Šest godina kasnije objavljena je meta-analiza rezultata 13 istraživanja na ukupno 870678 ispitanika koja je analizirala povezanost predhipertenzije s rizikom od KV morbiditeta i mortaliteta. Rezultati su pokazali povećan rizik od KV morbiditeta, ali ne i sveukupnoga mortaliteta jedino u skupini ispitanika s višim vrijednostima visoko normalnoga AT (130/85–139/89 mmHg) te su autori izrazili potrebu za budućim istraživanjima sa složenijom raspodjelom vrijednosti AT (9). Godinu nakon ove analize objavljeni su rezultati opservacijskoga istraživanja na više od milijun odraslih ispitanika koji su ukazali na povezanost povišenih vrijednosti AT s povećanim rizikom od pojave KV bolesti i moždanoga udara. U svakoj dobnoj skupini najmanji rizik za pojavu KV bolesti primijećen je u ispitanika s vrijednostima SAT 90–114 mm Hg i DAT 60–74 mm Hg (10). Nove smjernice Američkoga kardiološkog zbora i Američke udruge za srce (engl. *American College of Cardiology* i *American Heart Association*, ACC/AHA) objavljene 2017. godine donose promjenu definicije AH u Americi. Predhipertenzija kao pojam nestaje, ali se s njom povezane vrijednosti AT dijele u dvije kategorije: vrijednosti 120–129/< 80 mmHg su kategorizirane kao povišen AT, a vrijednosti AT 130/80–139/89 mmHg su prvi stupanj AH. Normalan AT predstavljaju vrijednosti AT < 120/80 mmHg (11). Smjernice ESH/ESC iz 2013. i 2018. godine ne mijenjaju klasifikaciju AT te je i dalje optimalan AT < 120/80 mmHg, normalan 120/80–129/84 mmHg, visoko normalan 130/85–139/89 mmHg, a AH > 140/90 mmHg (12,13).

Zaključno, vrijednosti AT veće od 140/90 mmHg su i dalje važeće za postavljanje dijagnoze AH u Europi i ostatku svijeta, izuzev Amerike. Međutim, vrijednosti AT koje odgovaraju predhipertenziji tj. visoko normalnim vrijednostima zbog dokazanih zdravstvenih rizika, sam pojam predhipertenzija je uobičajen i primjenjuje se u opisivanju problematike povezane s vrijednostima AT 120/80–139/89 mmHg pa se u skladu s time koristi i u ovome radu.

1.1.2. Epidemiologija predhipertenzije

Prema podacima istraživanja, prevalencija predhipertenzije u općoj populaciji je procijenjena na 22 – 38 % te je uočena u svim dobnim i spolnim skupinama bez obzira na stupanj razvijenosti zemlje (14). U većini istraživanja provedenih u različitim državama i kontinentima zapažena je veća prevalencija u muškaraca, ali u pojedinim zemljama uočena je veća prevalencija

u žena što vjerojatno upućuje na moguću interakciju zemljopisnih, socijalnih, bioloških i nekih drugih mehanizama (14). Osim moguće razlike prevalencije ovisno o spolu, dokazana je i veća prevalencija u starijoj dobi (14). Prevalencija predhipertenzije bila je veća od 30 % u svim istraživanjima koja su uključila ispitanike s indeksom tjelesne mase (ITM) iznad 25 kg/m^2 (14). Procjenjena prevalencija predhipertenzije u dječjoj i adolescentskoj dobi ima širok raspon, ovisno o broju i metodi mjerenja AT, dobi i spolu, te se kreće u rasponu 9,5 – 15,7 %, a dostiže i 27,9 % u populaciji s prekomjernim ITM (15). Prevalencija predhipertenzije je također istraživana u Hrvatskoj, te su dobiveni podaci u skladu sa svjetskim podacima. U istraživanju iz 2012. godine koje je analiziralo povezanost prevalencije predhipertenzije s predijabetesom i hiperuricemijom u priobalnoj Hrvatskoj, prevalencija predhipertenzije je bila 26,6 %; s nešto većom pojavnošću u muškaraca (16). Prema rezultatima nacionalnoga *EH-UH 1* istraživanja provedenog na reprezentativnome uzorku opće populacije Hrvatske, prevalencija predhipertenzije je 38,0 % (47,5 % muškaraca i 37,0 % žena) (17). Unutar podkategorije predhipertenzije prvoga stupnja (120/80–129/84 mmHg) bilo je 22,1 % muškaraca i 16,8 % žena, a u predhipertenziji drugoga stupnja (130/85–139/89 mmHg) 25,4 % muškaraca i 20,2 % žena (17). U istraživanju *CRO-KOP* provedenom na adolescentskoj populaciji koj je obuhvatilo 756 adolescenata starosti 15 – 18 godina, prevalencija predhipertenzije je bila 8,4 % (9,9 % u mladića i 6,8 % u djevojaka). Nadalje, pojavnost visoko normalnoga AT je bila povećana u ispitanika s povećanim ITM; 15,8 % u skupini s prekomjernom tjelesnom masom, a 24 % u skupini s pretilošću (18).

1.1.3. Rizični čimbenici predhipertenzije i predhipertenzija kao rizični čimbenik kardiovaskularne bolesti

Svi KV rizični čimbenici AH (pretilost, šećerna bolest i dislipidemija – sastavnice metaboličkog sindroma) su povezani s etiologijom predhipertenzije. Istraživanje provedeno na 36424 ispitanika, od kojih 51 % muškaraca i 36 % žena s predhipertenzijom, je pokazalo veće koncentracije glukoze u krvi (GUK), ukupnoga i LDL – kolesterola, triglicerida, povećan ITM i smanjenu koncentraciju HDL – kolesterola u predhipertoničara u usporedbi s normotenzivnim ispitanicima imaju. Od navedenih čimbenika, ITM je bio najsnažnije povezan s predhipertenzijom (19). Rezultati istraživanja *NHANES* (engl. *The National Health and Nutrition Examination Survey)* su pokazali da 64 % predhipertoničara ima prisutan barem još jedan KV rizični čimbenik, a u subpopulaciji koja je obuhvatila ispitanike starije od 60 godina taj je postotak bio čak 94 % (20). U istraživanju *Women's Health Initiative* koje je provedeno na 60785 ispitanica opaženo je proporcionalno povećavanje prisutnih KV rizičnih čimbenika (dob, ITM, prevalencija šećerne bolesti i hiperkolesterolemije) s višim vrijednostima AT (21). Osim čimbenika KV rizika otkriveni su i neki drugi rizični čimbenici povezani s predhipertenzijom. Presječno istraživanje

provedeno na 3042 ispitanika bez prisutne KV bolesti, pokazalo je značajno veće koncentracije C-reaktivnog proteina (CRP), čimbenika tumorske nekroze (TNF), alfa-amiloida, homocisteina, te veći broj leukocita u predhipertoničara u usporedbi s normotoničarima (22). Sličan je rezultat dobiven i u istraživanju *NHANES III*, predhipertoničari su i nakon korekcije rezultata prema dobi, spolu, rasi, pušenju, ITM, tjelesnoj aktivnosti, šećernoj bolesti i uzimanju lijekova imali veću prevalenciju povišenoga CRP nego normotenzivni ispitanici (23). Veći broj istraživanja je pokazao veću prevalenciju mikroalbuminurije i hiperuricemije u predhipertoničara, naročito u ispitanika mlađih od 60 godina (16,24-27).

Predhipertenzija je sama za sebe rizični čimbenik pojave KV događaja što je dokazano velikim prospektivnim istraživanjima s višegodišnjim praćenjima ispitanika. Smatra se da se oko trećine svih KV događaja u općoj populaciji odnosi na predhipertoničare bez prisutnih drugih KV rizičnih čimbenika (5,28-31). Longitudinalno istraživanje s periodom praćenja od 12 godina je uključilo 6859 ispitanika koji inicijalno nisu imali ni AH niti KV bolest (5). Cilj je bio odrediti kumulativnu incidenciju KV događaja (infarkt miokarda, kongestivno zatajenje srca i moždani udar). U skupini muškaraca svih dobnih skupina, nakon 12 godina praćenja, kumulativna incidencija KV događaja je u predhipertoničara bila veća od 12 %, u usporedbi s 5% koliko je evidentirano u ispitanika s optimalnim AT. U skupini žena s predhipertenzijom kumulativna incidencija KV događaja je bila oko 9 %, a u podskupini s optimalnim AT samo 1 % (5). Drugo longitudinalno istraživanje je pratilo ispitanike tijekom 18 godina (32). U skupini ispitanika s AT 130/85–139/89 mmHg uočen je veći KV morbiditet, ali i KV mortalitet (32). Još od 2002. godine je poznato kako snižavanje SAT za 20 mmHg i DAT za 10 mmHg u ispitanika bez KV bolesti može smanjiti KV smrtnost za 50 % (6). U periodu 2013. – 2014. godine objavljeno je šest meta-analiza koje su analizirale rezultate istraživanja povezanosti predhipertenzije i pojavnosti KV bolesti, kao i učestalosti samih KV događaja (33-37). Bitno je naglasiti da uključeni ispitanici prilikom uključenja većinom nisu imali postavljenu dijagnozu KV bolesti. Navedene meta-analize su potvrdile prethodna saznanja o predhipertenziji kao rizičnom čimbeniku koji povećava relativni rizik za pojavu koronarne bolesti, moždanoga udara i ukupnoga KV morbiditeta, te su potvrdili da predhipertenzija drugoga stupnja ima veći rizik od predhipertenzije prvoga stupnja. Nadalje, njihovi rezultati su dokazali naglašeniju povezanost prehipertenzije s kombiniranim ishodom (nesmrtonosni i smrtonosni KV događaji) nego povezanost predhipertenzije samo sa smrtonosnim KV događajem. Nedavno je, 2019. godine, objavljena meta-analiza koja je uključila 47 studija s 491666 ispitanika s ciljem procijene povezanosti predhipertenzije (SAT 120–139 mmHg i/ili DAT 80–89 mmHg) i ukupnog KV morbiditeta, koronarne bolesti, infarkta miokarda i moždanog udara (38). Rezultati su pokazali značajnu povezanost predhipertenzije s ukupnim KV morbiditetom (RR 1,40; 95 % CI 1,34-1,46), koronarnom bolesti (RR 1,40; 95 % CI 1,28-1,52),

infarktom miokarda (RR 1,86; 95 % CI 1,50-2,32) i moždanim udarom (RR 1,66; 95 % CI 1,56-1,76). Rizik od ukupnoga KV morbiditeta, infarkta miokarda i moždanoga udara povećan je kod predhipertenzije prvoga stupnja (SAT 120–129 mmHg i/ili DAT 80–84 mmHg) u usporedbi s normalnim AT, a iznosi RR 1,42 (95 % CI 1,29-1,55); 1,43 (1,10-1,86) i 1,52 (1,27-1,81), dok je rizik od ukupnoga KV morbiditeta, koronarne bolesti, infarkta miokarda i moždanoga udara kod prehipertenzije drugoga stupnja (SAT 130–139 mmHg i/ili DAT 85–89 mmHg) iznosi RR 1,81 (95 % CI 1,56-2,10); 1,65 (1,13-2,39); 1,99 (1,59-2,50) i 1,99 (1,68-2,36) za pojedini ishod (38). Izračunat populacijski rizik predhipertenzije povezan s ukupnim KV morbiditetom je 12,09 %, s koronarnom bolesti 13,26 %, s infarktom miokarda 24,60 % i s moždanim udarom 19,15 %. Autori meta-analize su zaključili kako bi učinkovita kontrola predhipertenzije mogla spriječiti više od 10 % slučajeva KV bolesti (38).

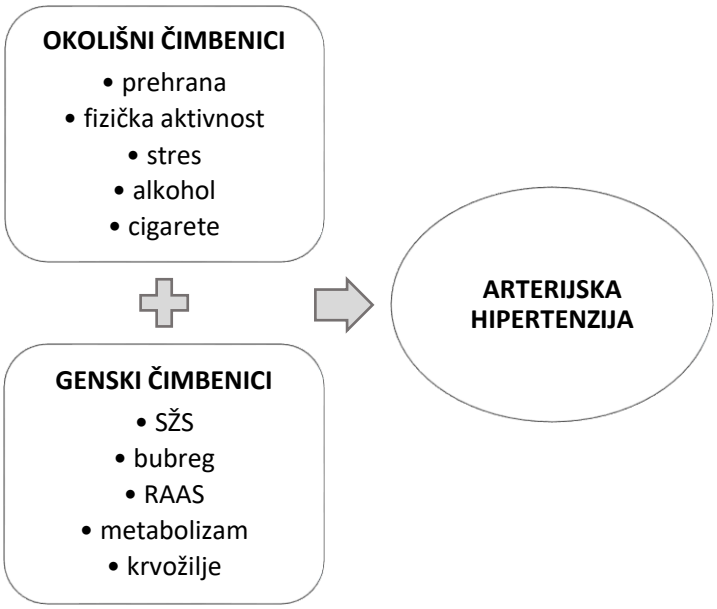
1.1.4. Progresija predhipertenzije u arterijsku hipertenziju

Rezultati nekoliko prospektivnih longitudinalnih istraživanja su pokazali da predhipertoničari imaju 2 – 3 puta veći rizik za progresiju vrijednosti AT u AH nego osobe s optimalnim vrijednostima AT (29,39-46). U navedenim istraživanjima, koja su se razlikovala po trajanju praćenja (2,3 – 8,1 godina), progresija predhipertenzije u AH je opažena u rasponu 30 – 63 %. Primjećena je i veća heterogenost populacije predhipertoničara s obzirom na progresiju vrijednosti AT u AH, te je bitno razlikovati subpopulaciju visokorizičnih predhipertoničara koji imaju veću sklonost za progresiju vrijednosti AT u AH. Otkriveno je nekoliko čimbenika koji mogu pomoći u otkrivanju takve visokorizične subpopulacije, kao npr. više vrijednosti AT, starija dob, veći ITM, veća masa lijeve klijetke, prisutnost šećerne ili kronične bubrežne bolesti (KBB), ali i životne navike kao npr. slaba fizička aktivnost (42-44). Zbog visokogA KV opterećenja navedene visokorizične subpopulacije predhipertoničara postoji potreba za daljnjim istraživanjem biomarkera koji bi omogućili što ranije otkrivanje moguće progresije AT te tako omogućili što raniju promjenu životnih navika te odgovarajuću kliničku intervenciju.

1.2. Istraživanja gena u etiologiji hipertenzije i predhipertenzije

Već je zadnjih 60 godina poznato da je AH etiološki multifaktorijalna bolest (47). S napretkom tehnika molekularne biologije napredovala su i istraživanja gena koja potvrđuju interakciju genskih i okolišnih čimbenika u složenoj etiologiji AH (48). Također, rezultati istraživanja su dokazali prisutnost značajno većega rizika za razvoj povišenoga AT u ispitanika koji imaju jednog ili oba roditelja s dijagnozom AH (49-50). Rezultati epidemioloških istraživanja upućuju da su genski čimbenici (tj. varijabilnost ljudskoga genoma) odgovorni za oko 30 % varijabilnost AT (51). Velik dio varijabilnosti ljudskoga genoma je uzrokovan polimorfizmima jednoga nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP), gdje dolazi do zamjene jedne nukleotidne baze (alela) drugom bazom. Osim SNP-ova postoje i drugi uzroci varijabilnosti genoma npr. insercije i delecije, strukturne promjene kao i epigenetičke modifikacije (52,53).

Većina istraživanja gena u etiologiji AH i predhipertenzije je ukazala na povezanost brojnih gena s etiopatogenezom ove bolesti (54-64). Genetička istraživanja su donijela nova saznanja o pleiotropnoj ulozi gena uključenih u etiologiju AH, inzulinske rezistencije, poremećaja metabolizma lipida, upale kao i drugih sastavnica metaboličkoga sindroma implicirajući povezanost bioloških puteva i etiologiju/patofiziologiju navedenih stanja (65-69). Za traženje povezanosti između AT i brojnih SNP-ova u ljudskome genomu primjenjuju se cjelogenomske studije povezanosti (engl. *genome wide association study*, GWAS), koje statistički izračunavaju povezanost između svakoga SNP-a i fenotipa, obično linearnom regresijom za kontinuirane fenotipove ili logističkom regresijom za dihotomne fenotipove. Prvi opsežan GWAS koji je imao za cilj otkrivanje varijanti gena povezanih s AH, proveden 2007. godine, nije identificirao značajne varijante genoma (70). Od tada pa do 2017. godine, nekoliko konzorcija i pojedinačnih istraživanja su objavili više od 60 genskih polimorfizama povezanih s vrijednostima SAT, DAT ili AH (71). Unatoč otkrivanju velikoga broja SNP-ova povezanih s AH, svaka varijanta ima samo mali ukupni učinak na AT (oko 1 mmHg za SAT ili 0,5 mmHg za DAT), ali ipak za neke je rijetke varijante opažen nešto veći učinak na AT (> 1,5 mmHg) (72,73). Ovakvi rezultati sugeriraju postojanje većega broja čimbenika tj. istovremeno djelovanje nekoliko genskih lokusa na regulaciju AT, ali i prisutnih interakcija gen – gen i gen – okolina koje pridonose varijabilnosti AT što sve govori u prilog multifaktorijalnoj etiologiji AH (slika 1.1).

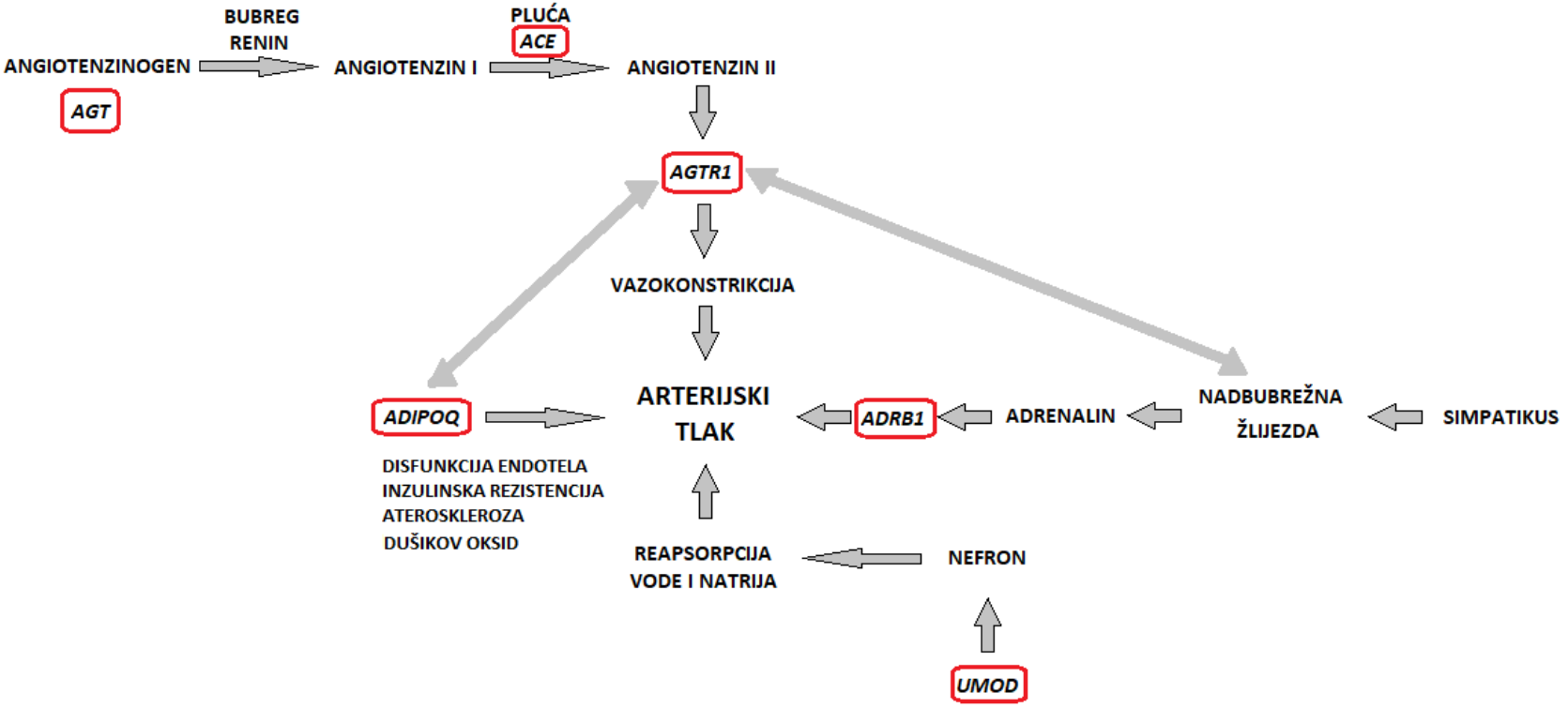


Slika 1.1. Interakcija genskih i okolišnih čimbenika u etiologiji arterijske hipertenzije
SŽS; središnji živčani sustav; RAAS; renin-angiotenzin-aldosteronski sustav

1.2.1. Geni kandidati odabrani za ovo istraživanje

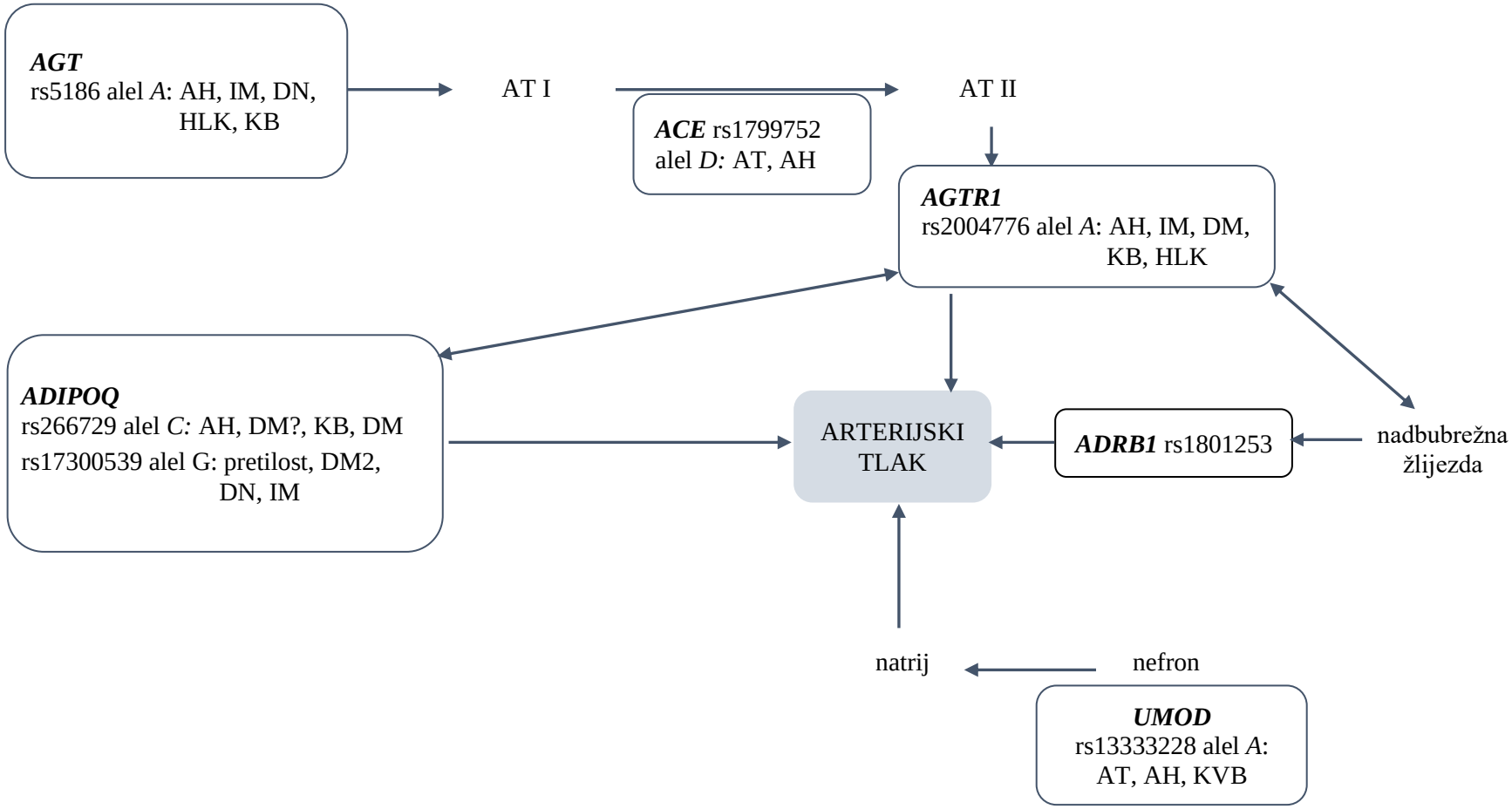
Sustav koji ima vodeću ulogu u regulaciji AT i perfuzije tkiva te homeostazi elektrolita i tjelesnih tekućina jest renin-angiotenzinski sustav (RAS) koji ima bitnu ulogu u etiopatogenezi AH. Kao geni kandidati povezani s AH među prvima su proučavani polimorfizmi gena čiji su proteinski produkti (angiotenzinogen, enzim angiotenzin-konvertaza i angiotenzin II receptor tipa 1) dio RAS. Rezultati GWAS-a su dokazali jasnu povezanost polimorfizma rs2004776 gena za angiotenzinogen s vrijednostima AT (58). Insercijsko-delecijski polimorfizam gena *ACE*, rs1799752 je povezan s enzimatskom aktivnošću enzima angiotenzin-konvertaze (ACE); najveća aktivnost ACE je kod osoba s genotipom *D/D*, dok je najmanja kod osoba s genotipom *I/I* (74). Međutim, brojna istraživanja su dala nekonzistentne rezultate o povezanosti ovoga SNP s AH (62). Nadalje, analizirana je povezanost polimorfizma rs5186 gena za angiotenzin II receptora tipa 1 (*AGTR1*) s AH i s metaboličkim sindromom (63,64). Utvrđena je i značajna povezanost rs1801253 polimorfizma gena za beta-1-adrenergički receptor (*ADRB1*) kao i gena za angiotenzinogen (*AGT*) s vrijednostima AT (61). Protein uromodulin koji ima važnu ulogu u homeostazi natrija i vode kodiran je genom za uromodulin (*UMOD*). Njegov SNP rs13333226 je povezan s manjim rizikom nastanka AH, smanjenom ekskrecijom uromodulina u mokraći te boljom bubrežnom funkcijom (60). Pozornost istraživača privlače i ponekad proturječni rezultati vezani uz adiponektin i vrijednosti AT, i AH, te će u ovom istraživanju biti analizirana i dva polimorfizma gena za adiponektin (rs266729, rs17300539). Shema međusobne povezanosti gena kandidata i njihove povezanosti s AT je prikazana na slici 1.2.A.

Za ovo istraživanje odabrali smo šest gena važnih u homeostazi AT, ali i etiopatogenezi AH i pridruženog pobola, te drugih metaboličkih poremećaja. Odabrani geni uključeni su u ove procese na raznim mjestima hipertenzivnog kardiorenalnog kontinuuma kako bismo mogli analizirati pojedinačne učinke, tj. povezanosti, ali i povezanosti pojedinih haplotipova. Odabrali smo one polimorfizme za koje postoje rezultati o povezanosti sa SAT, AH, pobolom i/ili metaboličkim poremećajima (slika 1.2.B).



Slika 1.2.A. Shema međusobne povezanosti gena kandidata i njihove povezanosti s arterijskim tlakom

Legenda: geni kandidati su crveno obrubljeni, strelice pokazuju smjer djelovanja istoimenih proteina, *ACE*, rs1799752*; AGT*, rs2004776, *AGTR1*, rs5186*; ADIPOQ*, rs266729 i rs17300539; *UMOD*, rs 13333226.



Slika 1.2.B. Polimorfizmi gena *ACE,* rs1799752*; AGT*, rs2004776, *AGTR1*, rs5186*; ADIPOQ*, rs266729 i rs17300539; *UMOD,* rs 13333226 odabranih za ovo istraživanje s pridruženim povezanim stanjima

Kratice: AH, arterijska hipertenzija; AT, arterijski tlak; DM, šećerna bolest; DN, dijabetička nefropatija; HLK, hipertrofija lijeve klijetke; IM, infarkt miokarda; IR, inzulinska rezistencija; KB, koronarna bolest; KVB, kardiovaskularne bolesti

A. Gen za angiotenzinogen (AGT), polimorfizam rs2004776

Angiotenzinogen protein sintetiziran većinom u jetri, koji renin prevodi u angiotenzin I je prekursor jednog od najpotentnijih vazokonstriktora angiotezina II.

Gen za angiotenzinogen (*AGT*) se nalazi na 1. kromosomu (1q42.2). Njegove varijante su povezane s AH, aterosklerozom, srčanom hipertrofijom i moždanim udarom povezanim s mikroangiopatijom (75-82). Na samom početku istraživanja gena *AGT* otkrivena je povezanost polimorfizma M235T (rs699; 235*C>T*) s AH u bjelačkoj populaciji i povećanom koncentracijom proteina angiotenzinogena (AGT) u plazmi, za 10 – 20 %, u osoba koje su homozigotni nositelji alela manje učestalosti (lat. *minor*) *T* (76). Od tada do danas su objavljeni rezultati 10 GWAS-ova provedenih na velikim uzorcima različitih populacija koji upućuju na moguću povezanost različitih varijanti ovoga gena sa SAT, DAT, KV bolesti, koronarnom bolesti, konzumacijom cigareta te odgovorom na lijek tj. učinkovitošću (83-92). Otkriveno je više od 20 polimorfizama gena *AGT* povezanih s AH (rs699, rs148446907, rs2004776, rs2493132, rs3789678, rs4762, rs5049, rs5050, rs7539020, rs762079672, itd..). Nekoliko istraživanja je identificiralo i potvrdilo povezanost polimorfizma *+1164A>G* (rs2004776) u intronu I gena *AGT* s vrijednostima AT (61,93-96). Osim povezanosti s AT rs2004776 je povezan i s inzulinskom rezistencijom (97). Učestalost referentnog (lat. *major*) i *minor* alela se razlikuje prema populacijama ispitanika, te je u tablici 1.a prikazana učestalost alela rs2004776 (98).

Tablica 1.a. Učestalost alela rs2004776 u različitim populacijama (98)

Projekt	**Populacija**	**Broj ispitanika**	**Referentni alel *C***	***Minor* alel *T***
1000Genomes	Globalna	5008	0,590	0,410
1000Genomes	Afrika	1322	0,513	0,487
1000Genomes	Istočna Azija	1008	0,424	0,576
1000Genomes	Europa	1006	0,774	0,226
1000Genomes	Južna Azija	978	0,620	0,380
1000Genomes	Amerika	694	0,670	0,330

B. Gen za angiotenzin konvertirajući enzim (ACE), polimorfizam rs1799752

Angiotenzin konvertaza (engl. *angiotensin I converting enzyme*, ACE), katalizira hidrolizu angiotenzina I u angiotenzin II, a također inaktivira 90 % vazodilatatora bradikinina. Angiotenzin II ima višestruku ulogu, snažan je vazokonstriktor kao i stimulator sekrecije aldosterona što posljedično uzrokuje resorpciju natrija i vode bubregom i tako sveukupno djeluje na povišenje vrijednosti AT. Bradikinin je konačni produkt kalikrein-kininskoga sustava, a njegovom

inaktivacijom onemogućena je aktivacija bradikininskoga receptora B2 što uzrokuje povećanje vaskularne propusnosti i vazodilataciju (99-102).

Gen za ACE (*ACE*) se nalazi na 17. kromosomu (17q23.3). Provedena su mnogobrojna istraživanja povezanosti varijanti *ACE* i različitih bolesti i stanja uključujući KV, metaboličke, imunološke, maligne, neurodegenerativne i psihijatrijske bolesti, ali su rezultati često proturječni (103). Najčešće istraživani polimorfizam je prisutnost tj. insercija (*I*) ili odsutnost tj. delecija (*D*) sekvence od 287 parova baza tj. *Alu* elementa koji se nalazi u intronu 16 gena *ACE* (rs1799752). Već rana istraživanja su dokazala povezanost genotipa i fenotipa te se alel *D* povezuje s većom enzimatskom aktivnosti ACE i u serumu i u tkivima (74, 104-106). Upravo ova genska varijanta je prva povezana s ljudskom fizičkom spremom, te je alel *I* povezan s boljom izdržljivosti (107). Rezultati nekoliko epidemioloških istraživanja su ukazali na povezanost ovoga polimorfizma s AH, naročito genotipa *D/D*, što je u skladu s većom aktivnošću enzima ACE i posljedičnom vazokonstrikcijom (104,108-114). Osim povezanosti ovoga polimorfizma s patološkim stanjima, rezultati istraživanja su ukazali i na njegov utjecaj na učinak kaptoprila (ACE inhibitor). Pacijenti sa zatajenjem srca, kroničnom opstruktivnom bolesti pluća i šećernom bolesti tipa 2, koji su nositelji genotipa *I/I* mogu imati bolji odgovor na terapiju kaptoprilom u usporedbi s pacijentima nositeljima genotipa *D/D* (115). Pregled učestalosti alela *I* i *D* u različitim populacijama je prikazan u tablici 1.b (116).

Tablica 1.b. Učestalost alela *I* i *D* u različitim populacijama (116)

Populacija	**Učestalost alela**		**Broj ispitanika**
	I	***D***	
Arapska	0,34	0,66	159
Emirati	0,39	0,61	111
Sudan	0,36	0,64	121
Oman	0,29	0,71	124
Afrička			
Nigerija	0,41	0,59	80
Afroamerikanci	0,30	0,70	40
Bijela	0,42 – 0,54	0,46 – 0,58	1212
Azijska			
Japan	0,65 – 0,67	0,33 – 0,35	354
Kina	0,71	0,29	189

C. Gen za angiotenzin II receptor tip 1 (AGTR1), polimorfizam rs5186

Angiotenzin II svoje glavne učinke na bubrežnu i KV fiziologiju ostvaruje vezanjem za receptor tip 1 (AGTR1) (117). Stalna induciranost aktivnosti AGTR1 može uzrokovati AH, srčanu aritmiju, moždani udar, dijabetičku nefropatiju i metaboličke poremećaje (118,119).

Gen za angiotenzin II receptor tip 1 (*AGTR1*) se nalazi na 3. kromosomu (3q24) (120). Kao i za druge gene RAS-a i za ovaj gen su provedena brojna istraživanja povezanosti genotipa i fenotipa te je otkriveno više polimorfizama povezanih s bolestima. Najviše istraživanja je provedeno na temu polimorfizma *1166A>C* (rs5186) koji je povezan s brojnim stanjima od AH (121-125), infarkta miokarda (126), dijabetičke nefropatije (127), koronarne bolesti (128) te hipertrofije lijevog ventrikula (129,130). Osim u bolestima, ovaj polimorfizam se istraživao i u učinkovitosti liječenja zatajenja srca s kandesartanom (antagonist angiotenzina II) gdje bi nositelji *minor* alela *1166C* mogli imati veću stopu dugotrajnije kompenzacije RAS-a (131). Pregled učestalosti alela rs5186 u različitim populacijama je prikazan u tablici 1.c (132).

Tablica 1.c. Učestalost alela rs5186 u različitim populacijama (132)

Projekt	**Populacija**	**Broj ispitanika**	**Referentni alel *A***	***Minor* alel *C***
1000Genomes	Global	5008	0,882	0,118
1000Genomes	Afrika	1322	0,980	0,020
1000Genomes	Istočna Azija	1008	0,940	0,060
1000Genomes	Europa	1006	0,728	0,272
1000Genomes	Južna Azija	978	0,930	0,070
1000Genomes	Amerika	694	0,770	0,230

D. Gen za beta-1-adrenergički receptor (ADRB1), polimorfizam rs1801253

Beta-adrenergički receptori (ADRB) izraženo su prisutni u srcu, bubrezima i masnim stanicama. Pripadaju obitelji receptora vezanih na G-protein (engl. *G protein-coupled receptors*, GPCR), a razlikujemo tri podtipa beta-1, beta-2 i beta-3 receptore. G-protein je neophodna molekula signalnih puteva u stanicama. Po strukturi je heterotrimerni protein koji se sastoji od alfa, beta i gama podjedinice, a po funkciji je enzim GTPaza. Kada je G-protein u aktivnome stanju podjedinica alfa veže gvanozin trifosfat (GTP) (po kojem je i dobio ime), a u slučaju kada nema izvanstaničnoga signala tj. signalne molekule tada je G-protein u neaktivnome stanju i tada je vezan gvanozin difosfat (GDP). Vezanje signalne molekule za receptor uzrokuje zamjenu GDP s GTP (aktivacija) te disocijaciju kompleksa na GTP-alfa i GTP-beta-gama podjedinice (133). Podjedinica GTP-alfa aktivira adenilat ciklazu i tako potiče stvaranje cAMP (drugi glasnik) i daljnju aktivaciju cAMP ovisnoga signalnog puta. Fiziološki supstrati ADRB su adrenalin i

noradrenalin koji tako posredstvom G-proteina aktiviraju cAMP signalni put. Dolazi do odvajanja podjedinice GTP-alfa koja je u interakciji s adenilat ciklazom i stimulira unutar stanice povećanu proizvodnju cAMP. Povećana koncentracija cAMP aktivira protein kinazu A koja fosforilira brojne proteine (transkripcijske faktore, regulatorne proteine, ionske kanale npr. Ca^{++} kanale regulirane naponom i dr.). Konačan učinak je povećani ulaz i veća koncentracija kalcija u miocitu tijekom akcijskoga potencijala te se povećava kontraktilnost srčanog mišića, a fosforilacija miozina također povećava kontraktilnost u stanicama glatkih mišića (133-136).

Gen za beta-1-adrenergički receptor (*ADRB1*) se nalazi na 10. kromosomu (10q25.3). U ovom tisućljeću postignut je značajan napredak u razumijevanju funkcije ADRB1, kako na biokemijskoj tako i na genskoj razini. Najpoznatija dva polimorfizma gena *ADRB1* su rs1801253 (c.1165G>C, p.Gly389Arg) i rs1801252 (c.145A>G, p.Ser49Gly). Do sada su objavljeni rezultati sedam istraživanja koji su dokazali povezanost varijatnog alela *C* rs1801253 s višim vrijednostima SAT i DAT, kako samostalno tako i u kombinaciji s konzumiranjem alkohola i cigareta (73,87-91,137). Osim istraživanja povezanosti s KV bolestima, pretilošću i poremećajem metabolizma, analizirana je je i povezanost s oksigenacijom i fizičkom aktivnosti u bolesnika sa srčanim zatajenjem, povezanost s masom lijeve klijetke u bubrežnih bolesnika, povezanost s inotropnim odgovorom na dobutamin (agonist ADRB1), kao i povezanost varijatnog alela *C* s učinkovitosti metoprolola (137-145). Pregled učestalosti alela rs1801253 u različitim populacijama je prikazana u tablici 1.d (146).

Tablica 1.d. Učestalost alela rs1801253 u različitim populacijama (146)

Projekt	**Populacija**	**Broj ispitanika**	**Referentni alel *G***	**Varijatni alel *C***
1000Genomes	Global	5008	0,298	0,702
1000Genomes	Afrika	1322	0,430	0,570
1000Genomes	Istočna Azija	1008	0,212	0,788
1000Genomes	Europa	1006	0,315	0,685
1000Genomes	Južna Azija	978	0,270	0,730
1000Genomes	Amerika	694	0,190	0,810

E. Gen za uromodulin (UMOD), polimorfizam rs13333226

Uromodulin (Tamm-Horsfallov protein) se sintetizira jedino u bubrezima, u stanicama debeloga uzlaznog kraka Henleove petlje, gdje se i izlučuje u mokraću. Njegova višestruka uloga uključuje regulaciju funkcije vanjskoga K^+ kanala bubrežne srži i Na^+-K^+-$2Cl^-$ kotransportera (NKCC2), dva najvažnija ionska prijenosnika za proces reapsorpcije natrija u debelome uzlaznom

kanaliću Henleove petlje, facilitaciju intracelularnoga prijenosa NKCC2, te je u slučaju smanjene funkcije uromodulina smanjena funkcija tog kotransportera što rezultira smanjenom reapsorpcijom urične kiseline. Uromodulin ima zaštitnu ulogu od mokraćnih infekcija inhibicijom adhezije bakterija na uroepitel i od formiranja bubrežnih kamenaca te zaštitnu ulogu u akutnom bubrežnom oštećenju (147-154).

Gen za uromodulin (*UMOD*) se nalazi na 16. kromosomu (16p12.3). Zbog višestruke uloge proteina kojeg kodira, ovaj gen je uvršten u GWAS studije te je otkrivena povezanost pojedinih polimorfizama s bubrežnom funkcijom (glomerularnom filtracijom) i kroničnom bubrežnom bolesti (KBB), nastankom bubrežnih kamenaca, koncentracijom mokraćne kiseline u serumu, ali i vrijednostima AT (60,151,155-158). U četiri istraživanja je otkrivena povezanost polimorfizma rs13333226 s vrijednostima AT, *minor* alel *G* je povezan s manjim rizikom od pojave AH, manjim mokraćnim izlučivanjem proteina uromodulina i boljom bubrežnom funkcijom. Svaki alel *G* je povezan sa smanjenjem rizika od pojave KV događaja za 7,7 % nakon prilagodbe za spol, dob, ITM i konzumiranje nikotina (60,73,84,156). Osim polimorfizama poznate su i mutacije gena *UMOD* koje uzrokuju rijetke autosomno dominantne bubrežne bolesti, medularnu cističnu bubrežnu bolest tip 2 i obiteljsku juvenilnu hiperuricemičnu nefropatiju (159). Pregled učestalosti alela rs13333226 u različitim populacijama je prikazana u tablici 1.e (160).

Tablica 1.e. Učestalost alela rs13333226 u različitim populacijama (160)

Projekt	**Populacija**	**Broj ispitanika**	**Referentni alel *A***	***Minor* alel *G***
1000Genomes	Global	5008	0,760	0,240
1000Genomes	Afrika	1322	0,662	0,338
1000Genomes	Istočna Azija	1008	0,916	0,084
1000Genomes	Europa	1006	0,798	0,202
1000Genomes	Južna Azija	978	0,700	0,300
1000Genomes	Amerika	694	0,750	0,250

F. Gen za adiponektin (ADIPOQ), polimorfizmi rs266729 i rs17300539

Adiponektin (ADPN) je proteinski hormon sintetiziran većinom u adipocitima, a prema novijim saznanjima i u kardiomiocitima, jetri, koštanoj srži, poprečno-prugastim mišićima te likvoru. Svoj učinak ostvaruje vezanjem na svoje receptore (AdipoR1, 2 i 3) nakon čega slijedi aktivacija signalnih puteva koji reguliraju život stanice, rast i apoptozu. Stimulira fosforilaciju i aktivaciju 5-adenozin monofosfat-aktivirane protein kinaze (engl. *5' adenosine monophosphate-activated protein kinase*, AMPK) u jetri i poprečno-prugastim mišićima, pojačavajući

iskorištavanje glukoze i izgaranje masnih kiselina. Adipociti također sintetiziraju i leptin, adipsin, razne komponente komplementa kao i čimbenik tumorske nekroze što govori u prilog mogućoj vezi s imunim sustavom. Adiponektin ima protuupalni učinak na stanične komponente vaskularne stijenke (161,162). Snižena koncentracija ADPN je zabilježena u pretilih osoba, osoba koje boluju od šećerne bolesti tipa 2, od metaboličkoga sindroma i koronarne bolesti te osoba s povišenim i visoko normalnim AT (163-168). Rezultati istraživanja su pokazali da ADPN u djece, adolescenata i odraslih ima inzulin-senzibilizirajuće, anti-aterogene i protuupalne učinke, a u određenim okolnostima utječe i na smanjenje tjelesne mase (169-172).

Gen za adiponektin (*ADIPOQ*) se nalazi na 3. kromosomu (3q27.3). Rezultati GWAS-a su otkrili jasnu povezanost varijanti gena *ADIPOQ* (deset polimorfizama) s koncentracijom ADPN u cirkulaciji (173-179). Alel *A* (*minor* alel) SNP rs17300539 je najjače povezan prema aditivnom modelu s koncentracijom ADPN. Svaki alel *A* povisuje koncentraciju ADPN za 1,63 µg/mL, a povećanje od 1 µg/mL ADPN smanjuje rizik od AH za 6,0 % (kod koncentracija ADPN do 8 µg/mL) (176,180). Provedena su brojna istraživanja čiji rezultati ukazuju na povezanost pojedinih polimorfizama *ADIPOQ* s KV i metaboličkim bolestima, ali rezultati su često proturječni. Istraživanje objavljeno 2007. godine nije dokazalo povezanost između najučestalijih polimorfizama *ADIPOQ* i KV rizika u europskoj populaciji (181). Meta-analiza koja je obuhvatila 33 istraživanja pokazala je povezanost polimorfizma rs266729 (−11377C>G) koji se nalazi u promotorskoj regiji s rizikom za šećernu bolest tipa 2, dok je rs17300539 (-11391G>A) također u promotorskoj regiji bio povezan sa šećernom bolesti tip 2a, ali u osoba s pozitivnom obiteljskom anamnezom (182). Istraživanje provedeno u Finskoj je imalo potpuno proturječne rezultate te je rs266729 bio povezan s manjim rizikom razvoja šećerne bolesti tipa 2 (183). Meta-analiza četiri polimorfizma *ADIPOQ* je analizirala povezanost s pretilošću (184). Rezultati su ukazali na povezanost pretilosti s rs17300539 u bjelačkoj populaciji, dok je u azijskoj populaciji uočena povezanost pretilosti s rs266729 (184). Druga meta-analiza je ukazala na povezanost rs2241766 i rs17300593 s većim rizikom razvoja dijabetičke nefropatije u bjelačkoj populaciji oboljeloj od šećerne bolesti tipa 2 (185). Rezultati istraživanja polimorfizama povezanih s pretilošću i šećernom bolesti tipa 2 su ukazali na povezanost između ostalih polimorfizama i rs17300539 (186). Meta-analiza rezultata sedam istraživanja, objavljena 2017. godine, je dokazala povezanost polimorfizma rs266729 s povećanim rizikom za razvoj šećerne bolesti tipa 2 (187). Istraživana je i povezanost s AH, te je druga meta-analiza obuhvatila rezultate pet istraživanja polimorfizma rs266729 koji su pokazali povezanost recesivnoga modela s povećanim rizikom za nastanak AH (188). Nadalje, objavljena je meta-analiza koja je pokazala i povezanost rs2241766, rs822395 i rs17300539 s razvojem koronarne bolesti (189). Kanu i suradnici su objavili rezultate meta-analize 29 istraživanja koji su ukazali na povezanost rs266729 sa značajno povećanim rizikom

nastanka KV bolesti (190). Istraživanje na mlađoj populaciji je ukazalo na značajno veći rizik infarkta miokarda u homozigotnih nositelja polimorfizma rs17300539 te moguću ulogu ADPN i varijanti *ADIPOQ* u etiopatogenezi infarkta miokarda u mlađoj dobi (< 50 godina) (191). Rezultati meta-analize koja je istraživala nekoliko polimorfizama *ADIPOQ* su pokazali značajnu povezanost polimorfizma rs266729 s koronarnom bolesti (192). Navedena istraživanja ukazuju kako su promotorske varijante *ADIPOQ* često povezane s koncentracijom ADPN te posljedično sa šećernom bolesti tipa 2, metaboličkim sindromom i KV bolestima, ali su rezultati još uvijek proturječni. Tablice 1.f. i 1.g. prikazuju učestalost alela polimorfizama rs266729 i rs17300539 u različitim populacijama (193,194).

Tablica 1.f. Učestalost alela rs266729 u različitim populacijama (193)

Projekt	**Populacija**	**Broj ispitanika**	**Referentni alel *C***	***Minor* alel *G***
1000Genomes	Global	5,008	0,774	0,226
1000Genomes	Afrika	1,322	0,905	0,095
1000Genomes	Istočna Azija	1,008	0,724	0,276
1000Genomes	Europa	1,006	0,719	0,281
1000Genomes	Južna Azija	978	0,720	0,280
1000Genomes	Amerika	694	0,760	0,240

Tablica 1.g. Učestalost alela rs17300539 u različitim populacijama (194)

Projekt	**Populacija**	**Broj ispitanika**	**Referentni alel *G***	***Minor* alel *A***
1000Genomes	Global	5,008	0,973	0,027
1000Genomes	Afrika	1,322	0,995	0,005
1000Genomes	Istočna Azija	1,008	1,000	0,000
1000Genomes	Europa	1,006	0,926	0,074
1000Genomes	Južna Azija	978	0,990	0,010
1000Genomes	Amerika	694	0,760	0,240

1.3. Svrha rada

Etiopatogeneza primarne arterijske hipertenzije, a time i predhipertenzije, jest poligenska uz snažan utjecaj brojnih čimbenika okoliša. S obzirom na nedostatno provedena dosadašnja istraživanja genske podloge predhipertenzije, svrha ovoga istraživanja je utvrditi kliničke i epidemiološke karakteristike osoba s predhipertenzijom, te analizirati povezanost čimbenika kardiovaskularnog i renalnoga rizika s polimorfizmima odabranih gena čiji su produkti uključeni u bitne dijelove kardiorenalnoga kontinuuma.

2. HIPOTEZA

Polimorfizmi gena *AGT, ACE, AGTR1, ADRB1, UMOD* i *ADIPOQ*, koji su povezani s arterijskom hipertenzijom i metaboličkim sindromom učestalije se nalaze u osoba s visoko normalnim arterijskim tlakom (predhipertenzijom) nego u osoba s optimalnim i normalnim arterijskim tlakom.

3. CILJEVI RADA

3.1. Opći cilj

- analizirati učestalost polimorfizama gena *AGT, ACE, AGTR1, ADRB1, UMOD* i *ADIPOQ* u osoba s visoko normalnim arterijskim tlakom (predhipertenzijom) i u osoba s optimalnim i normalnim arterijskim tlakom
- analizirati povezanost određenih haplotipova s arterijskim tlakom i ukupnim kardiovaskularnim rizikom

3.2. Specifični ciljevi

- odrediti učestalost pojedinih haplotipova *AGT, ACE, AGTR1, ADRB1, UMOD* i *ADIPOQ*, njihovu pojedinačnu ulogu i mogući učinak interakcija gen – gen na nastanak predhipertenzije u oba spola
- analizirati interakcije između navedenih gena i vanjskih čimbenika (pretilost, pušenje, alkohol, socioekonomski status) te procijeniti njihov međusoban utjecaj na nastanak predhipertenzije
- odrediti haplotip koji je najučestalije povezan s kardiovaskularnim i renalnim rizikom u predhipertenziji

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ispitanici

U ovo presječno, opservacijsko istraživanje je uključen 601 ispitanik oba spola u dobi od 20 do 45 godina. Ispitivana skupina je obuhvatila 319 osoba s visoko normalnim AT tj. predhipertenzijom (120/80–139/89 mmHg), a kontrolna skupina 282 osobe s normalnim i optimalnim AT. Ispitanici su izabrani prema uključnim i isključnim kriterijima iz skupine ispitanika reegrutiranih u kliničko-epidemiološku studiju projekta Ministarstva znanosti Republike Hrvatske „ENDEMSKA NEFROPATIJA U HRVATSKOJ: epidemiologija, dijagnostika i etiopatogeneza“ (MB: 108-0000000-0329, voditelj: prof. dr. sc. Bojan Jelaković) te zaposlenika Kliničkoga bolničkog centra Zagreb koji su izabrani na temelju anamnestičkih podataka izmjerenoga normalnog i optimalnog AT.

Isključujući kriteriji su:

- vrijednosti AT i dobi izvan zadanih granica, koje su gore navedene
- šećerna, koronarna i kronična bubrežna bolest (eGFR < 60 mL/min/1,73 m^2)
- akutna upala
- uzimanje antihipertenziva, protuupalnih nesteroidnih lijekova, steroida
- nepotpisana suglasnost o sudjelovanju

Istraživanje su odobrila etička povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kliničkoga bolničkog centra Zagreb, te Hrvatskoga zavoda za javno zdravstvo. Prije uključivanja u istraživanje svi ispitanici bili su upoznati s ciljevima istraživanja i svaki ispitanik je potpisao informirani pristanak za dobrovoljno sudjelovanje u istraživanju. Za identifikaciju ispitanika koristi se individualno dodijeljen broj ispitanika koji osigurava tajnost svih podataka.

Istraživanje je provedeno na terenu Brodsko-posavske županije, te u Zavodu za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju Klinike za unutarnje bolesti Kliničkoga bolničkog centra Zagreb, Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i u Kliničkome zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkoga bolničkog centra Zagreb, Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

4.2. Metode

4.2.1. Antropometrijski i klinički podaci

Izmjereni antropometrijski podaci su tjelesna visina, tjelesna masa (TM) i opseg struka. Indeks tjelesne mase (ITM) izračunat je kao omjer TM u kilogramima i kvadrata tjelesne visine u metrima. Kao mjerilo centralne (visceralne) pretilosti, opseg struka mjeren je mjernom vrpcom u tri navrata pri čemu je za daljnje analize primijenjena aritmetička sredina tih mjerenja. Prema preporukama Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) ispitanici su kategorizirani u tri skupine prikazane u tablici 4.2.1 (195). Ispitanici su kategorizirani i u četiri skupine prema vrijednostima ITM koje su prikazane u tablici 4.2.2 (196,197).

Tablica 4.2.1. Kategorije zdravstvenoga rizika metaboličkih komplikacija debljine prema opsegu struka

Opseg struka (cm)		Zdravstveni rizik
muškarci	žene	metaboličkih komplikacija debljine
> 94	> 80	Povećan rizik
> 102	> 88	Vrlo visok rizik

Tablica 4.2.2. Kategorije zdravstvenoga rizika prema indeksu tjelesne mase (ITM)

ITM	Nutricijski status	Zdravstveni rizik povezan s prekomjernom tjelesnom masom
< 18,5	Nedovoljna tjelesna masa (pothranjenost)	Nizak
18,5 – 24,9	Poželjna tjelesna masa	Prosječan
25,0 – 29,9	Povećana tjelesna masa	Blago povećan
≥ 30	Debljina ili pretilost	Povećan (umjereno do izrazito)

Svim ispitanicima uzeta je iscrpna anamneza (strukturirani upitnik); prikupljeni su podaci o dosadašnjim bolestima, uzimanju lijekova, konzumiranju nikotina i alkohola, fizičkoj aktivnosti i socijalnom statusu.

AT je mjeren prema preporukama Europskoga društva za hipertenziju, tri puta automatskim oscilometrijskim tlakomjerom (Omron M6, Omron Healthcare Co., Kyoto, Japan) u sjedećem položaju nakon pet minuta odmora. Prema srednjoj vrijednosti mjerenja AT ispitanici su podijeljeni u dvije kategorije prema JNC-7 klasifikaciji: u kontrolnu skupinu s normalnim i optimalnim AT te ispitivanu skupinu s visoko normalnim AT tj. predhipertoničare.

Rizik nastanka KBB određen je procjenom glomerularne filtracije (engl. *estimated glomerular filtration rate*, eGFR) korištenjem CKD EPI jednadžbe i određivanjem omjera albumina i kreatinina iz uzorka prve jutarnje mokraće, a bodovni sustav kategorizacije je prema „*KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease*“. Kategorije rizika za razvoj KBB su nizak, umjeren i visok rizik (198).

Desetogodišnji KV rizik procjenjen je prema bodovnom sustavu "*Framingham 10 Year Risk of General Cardiovascular Disease*" koji uključuje sljedeće pokazatelje: dob, spol, ukupni kolesterol, HDL-kolesterol, SAT, primjenu antihipertenzivne terapije, konzumiranje nikotina i šećernu bolest. Kategorije za KV rizik su nizak (< 10 %), umjeren (10 % do < 20 % umjeren) i visok (≥ 20 %) rizik (199).

Jednadžba za procjenu 10-godišnjega rizika kardiovaskularnog pobola za muškarce:

$$Rizični\ faktor = [\ln(Dob) * 3{,}06117] + [\ln(Ukupni\ kolesterol) * 1{,}12370] - [\ln(HDL - kolesterol)] * 0{,}93263] + [\ln(SAT) * Antihipertenzivna\ terapija] + Pušenje\ cigareta + Šećerna\ bolest - 23{,}9802$$

$$Rizik = 100 * (1 - 0{,}88936^{e(Rizični\ faktori)})$$

Jednadžba za procjenu 10-godišnjega rizika kardiovaskularnog pobola za žene:

$$Rizični\ faktor = [\ln(Dob) * 2{,}32888] + [\ln(Ukupni\ kolesterol) * 1{,}20904] - [\ln(HDL\ kolesterol] * 0{,}70833 + [\ln(SAT) * Antihipertenzivna\ terapija] + Pušenje\ cigareta + Šećerna\ bolest - 26{,}1931$$

$$Rizik = 100 * (1 - 0{,}95012^{e(Rizični\ faktori)})$$

4.2.2. Biološki uzorci

Biološki uzorci za laboratorijsku obradu su serum (dobiven uzorkovanjem krvi natašte u 5 mL epruvetu bez aditiva za biokemiju) i mokraća (prva i druga jutarnja porcija mokraće, 50 mL spremnik s poklopcem) za biokemijske analize te puna krv (dobiven uzorkovanjem krvi u 5 mL epruvetu s EDTA) za izolaciju DNA i genotipizaciju. Laboratorijska obrada je učinjena u Kliničkome zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkoga bolničkog centra Zagreb, Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

4.2.3. Biokemijske analize

U serumu su određeni glukoza, CRP, kreatinin, ukupni kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol i trigliceridi. Iz vrijednosti kreatinina u serumu izračunata je procjenjena brzina glomerularne filtracije (eGFR) korištenjem CKD-EPI (engl. *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*) jednadžbe (198):

$$\text{eGFR}\ (\text{ml/min/}1{,}73/\text{m}^2) = 141\ \text{x}\ \min(S_{Cr}/\kappa, 1)^{\propto}\ \text{x}\ \max(S_{Cr}/\kappa, 1)^{-1.209}\ \text{x}\quad 0{,}993^{\text{Dob}}\ \text{x}\ 1{,}018\ [\text{ako je žena}]\ \text{x}\ 1{,}15[\text{ako je pripadnik crnačke rase}]$$

Kratice*: S_{Cr}= serumski kreatinin (µmol/L); za žene: alpha = -0,329; kappa = 0,7; za muškarce: alpha = -0,411; kappa = 0,9;* min znači minimum S_{cr}/κ ili 1; max znači maksimum S_{cr}/κ ili 1.

Koncentracije glukoze, CRP, kreatinina, ukupnog kolesterola, HDL-kolesterola, LDL-kolesterola, triglicerida i albumina su određene na automatskom biokemijskom analizatoru c501 Cobas 6000 (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka) standardiziranim rutinskim biokemijskim metodama.

A. Koncentracija glukoze u serumu je određena fotometrijskom UV metodom s heksokinazom. Načelo mjerenja: glukoza se u prisutnosti ATP djelovanjem heksokinaze fosforilira u glukoza-6-fosfat, a ovaj se djelovanjem glukoza-6-fosfat dehidrogenaze i NADP oksidira u 6-fosfoglukonat. Pri tome nastaje ekvivalentna količina NADPH, koja se mjeri fotometrijski. Metoda je standardizirana prema IDMS (engl. *Isotope Dilution Mass Spectrometry*).

B. Katalitička koncentracija C-reaktivnog proteina u serumu je određena imunoturbidimetrijskom metodom. Načelo mjerenja: anti-CRP antitijela (vezana na lateks mikročestice) reagiraju s antigenom u uzorku i stvaraju kompleks antigen/antitijelo. Aglutinacija koja slijedi mjeri se turbidimetrijski. Metoda je standardizirana prema CRM 470 (engl. *Certified Reference Material 470*).

C. Koncentracije kreatinina u serumu i u mokraći su određene enzimskom metodom fotometrijski s kreatininazom. Načelo mjerenja: kreatinin uz kreatininazu, kreatinazu i sarkozin oksidazu prelazi u glicin, formaldehid i vodikov peroksid. Vodikov peroksid reagira s HTIB i 4-aminofenazonom uz enzim peroksidazu i nastaje kromogen kinon-imin. Intenzitet nastaloga kromogena mjeri se fotometrijski i direktno je proporcionalan koncentraciji kreatinina u uzorku. Metoda je standardizirana prema ID/MS.

D. Koncentracija ukupnoga kolesterola u serumu je određena fotometrijski s kolesterol oksidazom. Načelo mjerenja: esteri kolesterola djelovanjem kolesterol esteraze se hidroliziraju na kolesterol i masne kiseline, te se sav kolesterol nalazi u slobodnome obliku. Kolesterol reagira s kisikom uz katalitičko djelovanje kolesterol oksidaze i nastaje kolest-4-en-3-on i H_2O_2. H_2O_2, uz peroksidazu, oksidira 4-aminoantipirin i nastaje obojeni kinonimin čija je koncentracija proporcionalna koncentracija kolesterola. Mjeri se povećanje apsorbancije. Metoda je standardizirana prema IDMS.

E. Koncentracija HDL-kolesterola u serumu određena je homogenom enzimskom kolorimetrijom. Načelo mjerenja: polianioni i detergenti maskiraju ne-HDL lipoproteine (LDL, VLDL i hilomikroni) i stvara se kompleks topiv u vodi. Nastankom ovoga kompleksa dolazi do blokiranja enzimatske reakcije kolesterol-esteraza i kolesterol-oksidaza sa ne-HDL lipoproteinima. Kolesterol esteraze cijepaju estere HDL-kolesterola do slobodnoga HDL-kolesterola i masnih kiselina. Nastali HDL kolesterol se uz prisutnost kisika, djelovanjem kolesterol oksidaze oksidira u Δ4-kolestenon i H_2O_2. Nastali vodikov peroksid u prisutnosti peroksidaze prevodi 4-amino-antipirin u obojeni spoj. Intenzitet obojenja je proporcionalan

koncentraciji HDL-kolesterola. Metoda je standardizirana prema CDC (engl. *Centers for Disease Control*) referentnoj metodi (metoda ultracentrifugiranja).

F. Koncentracija LDL-kolesterola u serumu određena je enzimskom kolorimetrijskom metodom. Načelo mjerenja: esteri kolesterola i slobodni kolesterol u LDL-u mjere se na temelju kolesterol enzimske metode pri čemu se koriste kolesterol-esteraze i kolesterol-oksidaze u prisutnosti površinski aktivne tvari koja selektivno rastvara samo LDL. Enzimska reakcija s drugim lipoproteinima, osim LDL, inhibirana je s površinski aktivnim tvarima detergenta i šećernim spojem. Kolesterol u HDL, VLDL i hilomikronima se ne određuje. Esteri LDL-kolesterola se u prisutnosti detergenta pod djelovanjem kolesterol esteraze cijepaju do slobodnoga kolesterola i masnih kiselina. U prisutnosti kisika nastali kolesterol se djelovanjem kolesterol oksidaze oksidira u Δ kolestenon i H_2O_2. Nastali H_2O_2 uz peroksidazu reagira s 4-amino-antipirinom i EMSE pri čemu nastaje crveno ljubičasti spoj. Intenzitet obojenja je proporcionalan koncentraciji LDL-kolesterola.

G. Koncentracija LDL-kolesterola u serumu se određivala računski prema Friedewaldu u slučajevima kada je koncentracija triglicerida bila manja od 4,0 mmol/L i ako nisu prisutni hilomikroni. Metoda je standardizirana prema metodi beta kvantifikacije u skladu s LDL protokolom, a formula glasi:

$$c(\text{LDL-C}) = c(\text{TC}) - [c(\text{TG})/2{,}2] - c(\text{HDL-C}).$$

H. Koncentracija triglicerida u serumu je određena fotometrijskom metodom s glicerofosfat-oksidazom. Načelo mjerenja: trigliceridi (triacilgliceroli) se hidroliziraju lipazom i nastali glicerol se uz ATP djelovanjem glicerolkinaze prevodi u glicerol fosfat koji katalitičkim djelovanjem glicerolfosfatoksidaze daje dihidroksiaceton-fosfat i H_2O_2. Nastali H_2O_2 reagira s p-klorfenolom i 4-aminofenazonom uz peroksidazu pa nastaje obojeni 4-(p-benzokinon-monoimino)-fenazon. Intenzitet boje je proporcionalan koncentraciji triglicerida u uzorku. Metoda je standardizirana prema IDMS.

I. Koncentracija albumina u mokraći je određena iz prvoga jutarnjeg uzorka mokraće imunoturbidimetrijskom metodom. Načelo mjerenja: antitijela specifična za albumin iz reagensa reagiraju s antigenom u uzroku tvoreći antigen-antitijelo kompleks. Nastala aglutinacija mjeri se turbidimetrijski. Metoda je standardizirana prema referentnom materijalu BCR470/CRM470.

J. Koncentracija alfa-1-mikroglobulina određena je iz drugoga jutarnjeg uzorka mokraće imunonefelometrijski na nefelometru BN II (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Njemačka) standardiziranom rutinskom biokemijskom metodom. Načelo mjerenja: antitijela specifična za alfa-1-mikroglobulin iz reagensa reagiraju s antigenom u uzroku tvoreći antigen-antitijelo kompleks koji se mjeri nefelometrijski.

4.2.4. Analiza DNA

4.2.4.1. Izdvajanje DNA

Izdvajanje DNA iz uzorka pune krvi s antikoagulantom EDTA provodilo se makro metodom isoljavanja i metodom FlexiGene® (QIAGEN GmbH, Hilden, Njemačka). Sav laboratorijski pribor je sterilan kako bi izbjegli kontaminaciju.

A. Metoda isoljavanja se temelji na uklanjanju staničnih proteina dehidracijom i taloženjem zasićenom otopinom NaCl u svrhu izdvajanja DNA iz stanica s jezgrom (200). Postupak traje dva dana, u prvom danu se provodi postupak lize stanice i homogenizira se talog leukocita, a u drugom danu se izdvaja DNA dodavanjem visoke koncentracije soli.

Postupak započinje miješanjem 5 mL pune krvi s 40 mL pufera za hemolizu u 50 mL epruveti, te inkubacijom (20 minuta) u hladnjaku na temperaturi -20 °C, nakon toga slijedi centrifugiranje (10 minuta na temperaturi 4 °C na 4000 rpm) i uklanjanje supernatanta. Na talog se dodaje 10 mL pufera za hemolizu sa svrhom ispiranja taloga od preostalih eritrocita i homogenizacije taloga leukocita, nakon miješanja slijedi centrifugiranje (10 minuta na temperaturi 4 °C na 4000 rpm) i uklanjanje supernatanta. Na talog leukocita se dodaje 3 mL SE-LIZA pufera i 200 µL pronaze. Na kraju se dodaje 400 µL 10 % SDS, te slijedi inkubacija preko noći na temperaturi 37 °C. Drugi dan se dodaje 1 mL zasićene otopine NaCl i nakon snažnog miješanja se centrifugira (10 minuta na temperaturi 4 °C na 4000 rpm). Nakon centrifugiranja se supernatant (koji sadrži DNA) prenosi u novu epruvetu od 50 mL s već pripremljenim apsolutnim etanolom (10 mL) za taloženje DNA. Epruveta se lagano okreće dok bijeli precipitat DNA ne ispliva na površinu (u obliku „meduze“). Izolirana DNA se prenosi pipetom u mikroepruvetu od 1,5 – 2 mL i suši u otvorenoj mikroepruveti 1 sat u termostatu na 37 °C dok etanol ne ishlapi. Nakon toga se u mikroepruvetu dodaje 500 µL TE pufera i inkubira preko noći na temperaturi 37 °C. Tako izolirana DNA se čuva na temperaturi 2 – 8 °C.

B. Metoda Flexigene za izdvajanje treba samo 500 µL pune krvi i provodi se prema uputi proizvođača QIAGEN GmbH (Hilden, Njemačka). FlexiGene DNA Kit za izdvajanje sadrži pufer za lizu, denaturaciju i hidraciju te proteazu (pufer FG1, pufer FG2, pufer FG3 i QIAGEN Protease). Smjesu pufer FG2/QIAGEN Protease treba pripremiti do 1 sat prije uporabe, za 500 µL pune krvi smjesa se sastoji od 250 µL pufera FG2 i 2,5 µL QIAGEN Protease.

Postupak izdvajanja počinje pipetiranjem 1250 µL pufera za lizu (FG1) u mikroepruvetu volumena 2 mL i dodavanjem 500 µL pune krvi, otopina se zatim promiješa okretanjem mikroepruvete 5 puta i slijedi centrifugiranje u mikrocentrifugi (20 sekundi na 10000 x g) i uklanjanje supernatanta. Na talog u kojem se nalaze stanične jezgre i mitohondriji se dodaje 250 µL pripremljena smjesa denaturacijskog pufera i proteaze (FG2/QIAGEN Protease) te se talog homogenizira na vrtložnoj mješalici, zatim slijedi kratko centrifugiranje (3 – 5 sekundi) i

inkubacija u termostatu 5 minuta na 65 °C. Zbog razgradnje proteina vidljiva je promjena boje uzorka iz crvene u zelenu. U mikroepruvetu se dodaje 250 μL 100 % izopropanola (za taloženje DNA) i dobro promiješa okretanjem, slijedi centrifugiranje (3 minute na 10000 x g) i uklanjanje supernatanta. Potrebno je paziti da mali bijeli talog ostane u mikroepruveti. Dodaje se 250 μL 70 % etanola i protrese na vrtložnoj mješalici 5 sekundi, pa centrifugira (3 minute na 10000 x g) i opet odlijeva supernatant. Talog (izolirana DNA) na dnu mikroepruvete se suši 5 minuta na zraku i nakon toga se dodaje 200 μL pufera FG3 (hidracijski pufer), talog se kratko homogenizira na vrtložnoj mješalici 5 sekundi i slijedi inkubacija u termostatu 1 sat na 65 °C. Uzorak DNA nakon postupka izdvajanja se čuva na temperaturi 2 – 8 °C.

4.2.4.2. Genotipizacija

Genotipizacija polimorfizma rs11799752 *ACE* I/D provodi se metodom lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR), a genotipizacija polimorfizama rs13333226 u 5' regiji gena za uromodulin (*UMOD*), rs2004776 u intronu gena za angiotenzinogen (*AGT*), rs5186 u genu za angiotenzin II receptor tip 1 (*AGTR1*), rs1801253 u genu za beta-1-adrenergički receptor (*ADRB1*) i oba polimorfizma rs266729 i rs17300539 u genu za adiponektin (*ADIPOQ*) provodi se metodom TaqMan® PCR u stvarnom vremenu.

Osnovni princip PCR se temelji na eksponencijalnom umnažanju slijeda DNA koji sadrži gen od interesa. Na umnoženim produktima provodi se analiza mogućih genskih promjena. Za umnažanje određenih dijelova DNA potrebna je genomska DNA, DNA-polimeraza, deoksiribonukleotid trifosfati (dATP, dCTP, dGTP i dTTP) i dvije početnice (uzvodna i nizvodna) te se ta smjesa podvrgava inkubaciji pod točno specifičnim uvjetima.

Ciklus PCR se sastoji od tri faze:

1. Denaturacija DNA zagrijavanjem na 94 – 96 °C pri čemu nastaje jednolančana DNA.
2. Vezanje početnica pri temperaturi 50 – 65 °C.
3. Sinteza novoga lanca komplementarnog DNA regiji omeđenoj početnicama pomoću termostabilne polimeraze na temperaturi od 72 °C. U sljedećem ciklusu, ova novostvorena molekula DNA postaje kalup.

Za dovoljnu količinu genskoga materijala potrebnog za daljnje analize potrebno je provesti više od 25 ciklusa PCR. Optimalni uvjeti za svaku PCR tj. točne koncentracije DNA-polimeraze, početnica, Mg^{2+} i genomske DNA kao i točne temperature i trajanje pojedinih faza ciklusa ovise o analitičkom sustavu i specifične su za svaki pojedini dio DNA koji sadrži gen od interesa.

A. *Genotipizacija SNP gena ACE (rs1799752)*

Načelo metode: Umnažanje slijeda DNA od interesa s PCR, te elektroforeza i vizualizacija umnoženih dijelova DNA u agaroznom gelu uz usporedbu s odgovarajućim molekularnim markerom kao standardom veličine (broja parova baza) (201).

Postupak: Reagensi za pripremu PCR reakcijske smjese otope se na sobnoj temperaturi, promiješaju na vrtložnoj mješalici (osim enzima), centrifugiraju u mikrocentrifugi 3 – 5 sekundi kako bi se sadržaj bočica spustio na dno te pipetiraju prema navedenim koncentracijama i volumenima (tablica 4.A.1). Nakon što su dodani svi sastojci, PCR reakcijska smjesa lagano se promiješa protresanjem začepljene mikroepruvete te centrifugira u mikrocentrifugi 3 – 5 sekundi. Količina PCR reakcijske smjese se pripremi za sve uzorke koji se planiraju analizirati, nakon čega se razdijeli u PCR epruvete te u njih dodaje pojedinačni uzorak DNA ili voda kao slijepa proba. Nakon dodavanja uzorka DNA u PCR reakcijsku smjesu, PCR epruvete se začepe, protresu na vrtložnoj mješalici, kratko centrifugiraju i stavljaju u uređaj za PCR GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) na program amplifikacije DNA pod nazivom ACE čiji su uvjeti navedeni u tablici 4.A.2.

Za potrebe elektroforeze produkata PCR pripremi se 1,5 % agarozni gel (Agaroza DNA Grade, 50-1000 parova baza (pb), Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD) volumena 100 mL. Kao standard veličine koristi se DNA molekularni marker XIII (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka) - standard veličine, ljestvica 50 parova baza, 50 – 750 pb. Elektroforeza se odvija u trajanju 40 minuta pri uvjetima 110 V i 400 mA. Određivanje veličine i prisustva odsječaka DNA je provedeno na uređaju za snimanje i analizu gelova G-BOX (Syngene, Cambridge, Velika Britanija).

Genotipizacija se provodi tako da se u agaroznom gelu analiziraju produkti PCR uspoređujući uzorak nepoznatog genotipa s odgovarajućim molekularnim markerom kao standardom veličine i kontrolnim uzorkom DNA heterozigotnog genotipa za *I/D* polimorfizam.

Veličine odsječaka DNA za *I/D* polimorfizam su:

- genotip *I/I* = 490 pb
- genotip *D/D* = 190 pb
- genotip *I/D* = 490/190 pb

Tablica 4.A.1. Sastojci PCR reakcijske smjese za genotipizaciju rs1799752 *ACE*

Sastojci reakcijske smjese (ukupni volumen smjese 25 µL)	**Volumen (µL)**	**Konačna koncentracija**
Sterilna dest. H_2O	12,3	
10X PCR pufer sa 15 mM $MgCl_2$ (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka)	2,5	1,5 mM
Mješavina dNTP* (5 mM ukupno) (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka)	2,5	0,5 mM
Početnica ACE-1: 5´-CTG GAC ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3´ (5 µM) (Tib-MolBiol, Berlin, Njemačka)	2,5	0,5 µM
Početnica ACE-2: 5´-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T-3´ (5 µM) (Tib-MolBiol, Berlin, Njemačka)	2,5	0,5 µM
Genomska DNA (uzorak)	2,5	200 ng
Taq DNA polimeraza (5 U/µL) (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka)	0,2	1 U

*Priprava 5 mM otopine mješavine deoksinukleozid trifosfata (dNTP):
dATP 12,5 µL (100 mM), dCTP 12,5 µL (100 mM), dGTP 12,5 µL (100 mM), dTTP 12,5 µL (100 mM), sterilna destilirana H_2O 950 µL

Tablica 4.A.2. Uvjeti PCR za genotipizaciju rs1799752 ACE

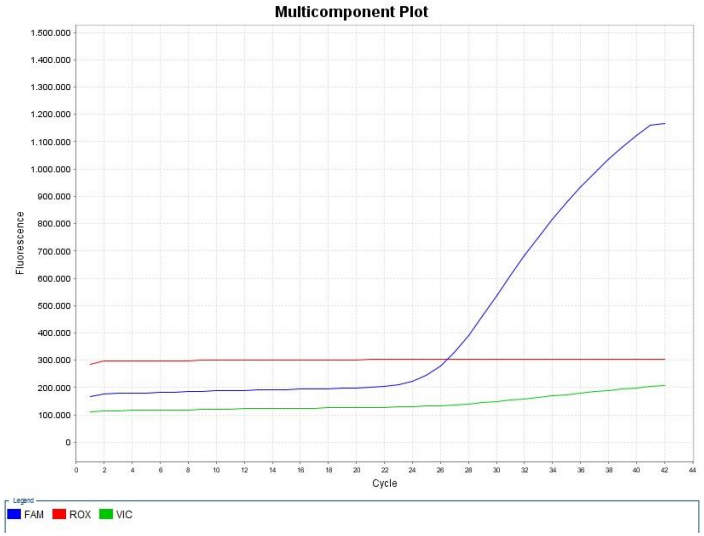
Denaturacija			
Broj segmenta	Temperatura (°C)	Trajanje (s)	Ciklusi
1	94	420	1
Umnožavanje (amplifikacija)			
Broj segmenta	Temperatura (°C)	Trajanje (s)	Ciklusi
1 Denaturacija	94	60	
2 Hibridizacija	58	60	25
3 Ekstenzija	72	120	
Finalna ekstenzija			
Broj segmenta	Temperatura (°C)	Trajanje (s)	Ciklusi
1	72	420	1

B. *Genotipizacija gena AGT, AGTR1, ADRB1, UMOD i ADIPOQ* provedena je metodom TaqMan® PCR u stvarnom vremenu na uređaju za PCR u stvarnom vremenu 7500 Real-Time PCR System Applied Biosystems (ABI 7500) (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD).

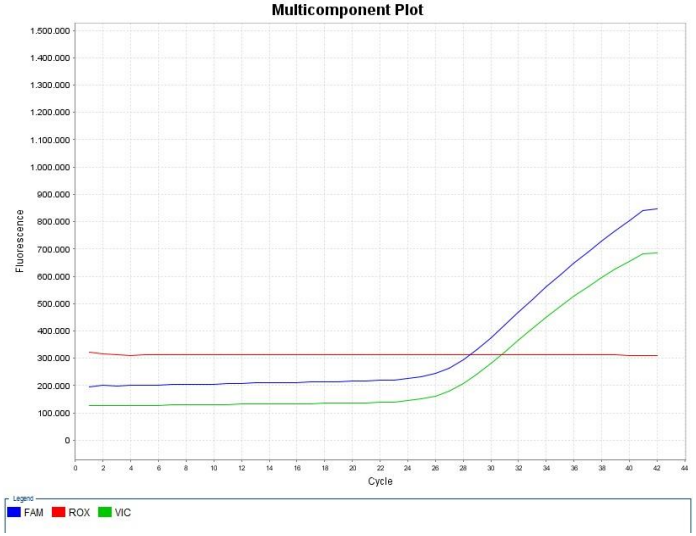
Načelo metode: Otkrivanje i analiza polimorfizama jednoga nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphism*, SNP) pomoću specifičnih TaqMan® SNP Genotyping Assay (TaqMan® SNP, (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). Metoda se temelji na hibridizaciji slijeda DNA od interesa i oligonukleotidne probe (obilježene fluorescentnom bojom) koja zbog 5´nukleazne aktivnosti Taq DNA polimeraze za vrijeme umnažanja omogućuje prijenos energije fluorescentnom rezonancijom (engl. *fluorescence resonance energy transfer*, FRET). Za amplifikaciju slijeda DNA se koriste specifične početnice i dvije TaqMan® fluorescentno

obilježene oligonukleotidne probe za detekciju alela (jedna proba se veže za divlji tip, a druga za mutirani tip alel). Na 5´ kraju svake probe nalazi se reporter boja VIC® za alel 1 ili FAM® za alel 2, a na 3´ kraju probe se nalazi nefluorescentni prigušivač. Tijekom PCR reakcije početnice i TaqMan® probe se vežu na ciljni slijed DNA. Taq DNA polimeraza produžuje početnice te kao egzonukleaza cijepa probe koje su hibridizirane na ciljni slijed DNA. Cijepanje odvaja prigušivač i reporter boju, pa dolazi do emisije fluorescencije reporter boje.

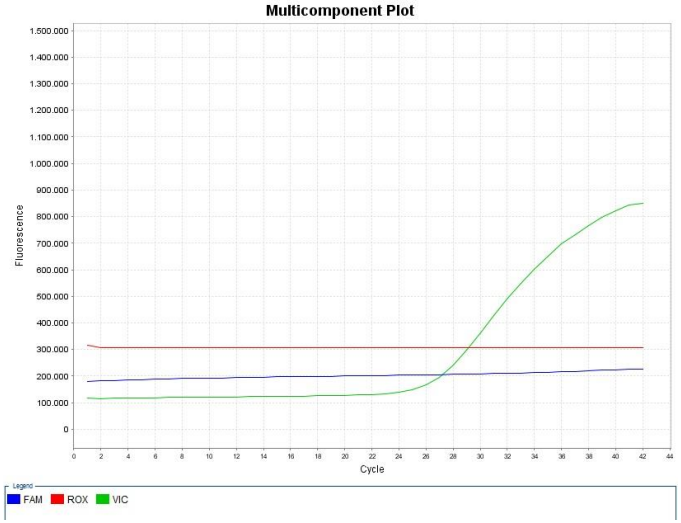
Sustav analize temelji se na detekciji i kvantifikaciji fluorescencije, čiji signal raste ovisno o povećanju broja kopija produkta u PCR reakcijskoj smjesi. Značajno povećanje VIC® fluorescentnog signala ukazuje na prisutnost homozigota za alel 1, povećanje FAM® fluorescentnog signala na prisutnost homozigota za alel 2, a povećanje oba signala ukazuje na prisutnost heterozigota. Fluorescentni signal koji se stvara tijekom PCR amplifikacije detektira se i analizira pomoću računalnog programa 7500 Fast Software v.2.3. (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). Prisutnost određenog fluorescentnog signala VIC® i/ili FAM® (slike 4.B.1 – 4.B.3) ukazuje na prisutnost odgovarajućih alela i očitava se kako je određeno za odgovarajući polimorfizam.



Slika 4.B.1. Očitanje fluorescentnog signala FAM® (homozigot za alel označen s FAM®)



Slika 4.B.2. Očitanje fluorescentnog signala VIC i FAM® (heterozigot za oba alela označenih s FAM® i VIC®)



Slika 4.B.3. Očitanje fluorescentnog signala VIC® (homozigot za alel označen s VIC®)

B.1. *Genotipizacija SNP gena AGT (rs2004776)*

Reakcijska smjesa ima ukupni volumen 50 µL i sadrži Applied Biosystems (Foster City, CA, SAD) reagense: TaqMan® Universal PCR Master Mix, TaqMan® SNP Assay *AGT* (ID C___1985478_10) Mix, i DNA razrjeđenje (tablica 4.B.1a i 4.B.1b). Uvjeti PCR na uređaju ABI 7500 prikazani su u tablici 4.B.1c.

Tablica 4.B.1a. Sastojci reakcijske smjese za genotipizaciju rs2004776 *AGT*

Sastojci reakcijske smjese	**Volumen (µL)**	**Koncentracija u reakcijskoj smjesi**
TaqMan® Universal PCR Master Mix, 2x	25,00	1x
TaqMan® SNP Assay Mix C___1985478_10, 20x	2,50	1x
DNA razrjeđenje, 10x	5,00	1-20 ng
Sterilna destilirana voda	17,50	

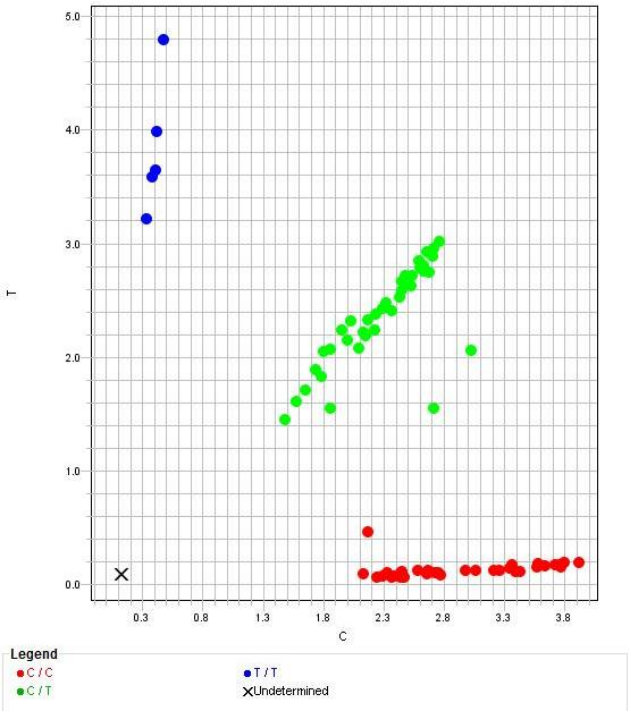
Tablica 4.B.1b. Specifičan TaqMan® SNP Assay ID za rs2004776 *AGT*

Gen - alel	**db SNP (rs#)**	**c. DNA**	**TaqMan® SNP Assay ID**
AGT	2004776	+1164 *C>T*	C___1985478_10
Polimorfizam: C/T			
Ciljna sekvenca [VIC/FAM]: *GGCTGAATGCTAAAGGTGAAGATGA**[C/T]**GGCTCATGCTCCTGTGGTGCCTGCC*			

Tablica 4.B.1c. Uvjeti PCR na uređaju ABI 7500 za genotipizaciju *rs*2004776 *AGT*

	PCR (40 ciklusa)	
Inicijacija ciljna temperatura / trajanje	**Denaturacija** ciljna temperatura / trajanje	**Amplifikacija** ciljna temperatura / trajanje
50 °C / 2 minute 95 °C / 10 minuta	95 °C / 15 sekundi	60 °C / 60 sekundi

Na temelju opisanoga postupka računarni program preračunava podatke dobivene flourescencijskom emisijom i omogućava analizu raspodjele alela. Na slici 4.B.1a prikazan je primjer provedene analize serije uzoraka na SNP rs2004776 gena *AGT*.



Slika 4.B.1a. Prikaz raspodjele alela serije uzoraka rs2004776 *AGT*

B.2 *Genotipizacija SNP gena AGTR1 (rs5186)*

Reakcijska smjesa ima ukupni volumen 50 µL i sadrži Applied Biosystems (Foster City, CA, SAD) reagense: TaqMan® Universal PCR Master Mix, TaqMan® SNP Assay AGTR1 (ID C___3187716_10) Mix, i DNA razrjeđenje (tablica 4.B.2a i 4.B.2b). Uvjeti PCR na uređaju ABI 7500 prikazani su u tablici 4.B.2c.

Tablica 4.B.2a. Sastojci reakcijske smjese za genotipizaciju rs5186 *AGTR1*

Sastojci reakcijske smjese	Volumen (µL)	Koncentracija u reakcijskoj smjesi
TaqMan® Universal PCR Master Mix, 2x	25,00	1x
TaqMan® SNP Assay Mix C___3187716_10, 20x	2,50	1x
DNA razrjeđenje, 10x	5,00	1-20 ng
Sterilna destilirana voda	17,50	

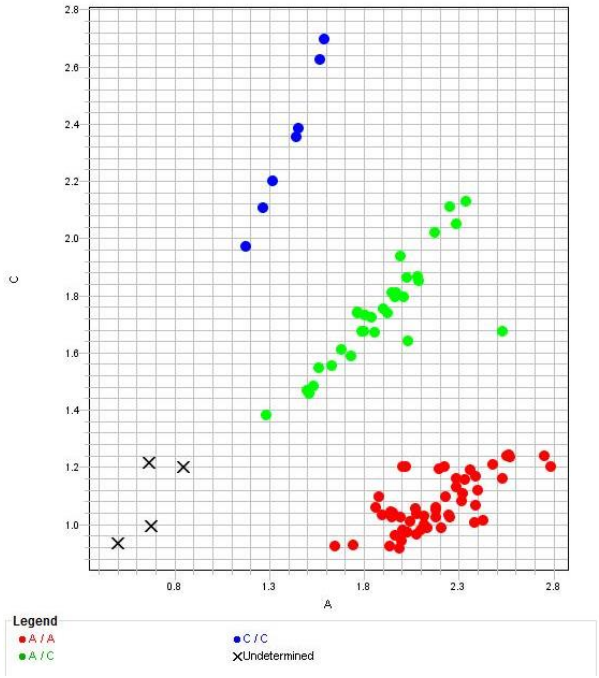
Tablica 4.B.2b. Specifičan TaqMan® SNP Assay ID za rs5186 *AGTR1 (AT1R)*

Gen - alel	db SNP (rs#)	c. DNA	*TaqMan® DME Assay ID*
AGTR1 (AT1R)	5186	**86A>C*	C___3187716_10
Polimorfizam: A/C *Sekvenca [VIC/FAM]:* *TGCAGCACTTCACTACCAAATGAGC**[A/C]**TTAGCTACTTTTCAGAATTGAAGGA*			

Tablica 4.B.2c. Uvjeti PCR na uređaju ABI 7500 za genotipizaciju rs5186 *AGTR1*

	PCR (50 ciklusa)	
Inicijacija	**Denaturacija**	**Amplifikacija**
ciljna temperatura / trajanje	ciljna temperatura / trajanje	ciljna temperatura / trajanje
50 °C / 2 minute 95 °C / 10 minuta	92 °C / 15 sekundi	60 °C / 90 sekundi

Na temelju opisanoga postupka računarni program preračunava podatke dobivene flourescencijskom emisijom i omogućava analizu raspodjele alela. Na slici 4.B.2a prikazan je primjer provedene analize serije uzoraka na SNP rs5186 gena *AGTR1*.



Slika 4.B.2a. Prikaz raspodjele alela serije uzoraka rs5186 *AGTR1*

B.3. Genotipizacija SNP gena ADRB1 (rs1801253)

Reakcijska smjesa ima ukupni volumen 50 µL i sadrži Applied Biosystems (Foster City, CA, SAD) reagense: TaqMan® Universal PCR Master Mix, TaqMan® SNP Assay ADRB1 (ID C___8898494_10) Mix, i DNA razrjeđenje (tablica 4.B.3a i 4.B.3b). Uvjeti PCR na uređaju ABI 7500 prikazani su u tablici 4.B.3c.

Tablica 4.B.3a. Sastojci reakcijske smjese za genotipizaciju rs1801253 *ADRB1*

Sastojci reakcijske smjese	Volumen (µL)	Koncentracija u reakcijskoj smjesi
TaqMan® Universal PCR Master Mix, 2x	25,00	1x
TaqMan® SNP Assay Mix C___8898494_10, 20x	2,50	1x
DNA razrjeđenje, 10x	5,00	1-20 ng
Sterilna destilirana voda	17,50	

Tablica 4.B.3b. Specifičan TaqMan® SNP Assay ID za rs1801253 *ADRB1*

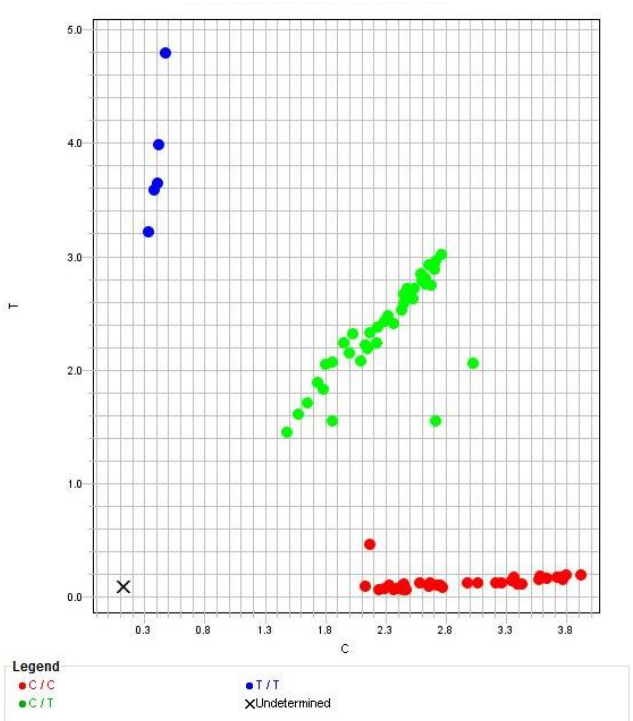
Gen - alel	db SNP* (rs#)	c. DNA	TaqMan® DME Assay ID
ADRB1	1801253	1165*G>C*	C___8898494_10

polimorfizam: C/G
sekvenca [VIC/FAM]:
*CCCCGACTTCCGCAAGGCCTTCCAG**[C/G]**GACTGCTCTGCTGCGCGCGCAGGGC*

Tablica 4.B.3c. Uvjeti PCR na uređaju ABI 7500 za genotipizaciju rs1801253 *ADRB1*

	PCR (40 ciklusa)	
Inicijacija	**Denaturacija**	**Amplifikacija**
ciljna temperatura / trajanje	ciljna temperatura / trajanje	ciljna temperatura / trajanje
50 °C / 2 minute 95 °C / 10 minuta	95 °C / 15 sekundi	60 °C / 60 sekundi

Na temelju opisanoga postupka računarni program preračunava podatke dobivene flourescencijskom emisijom i omogućava analizu raspodjele alela. Na slici 4.B.3a prikazan je primjer provedene analize serije uzoraka na SNP rs1801253 gena *ADRB1*.



Slika 4.B.4a. Prikaz raspodjele alela serije uzoraka rs1801253 *ADRB1*

B.4. *Genotipizacija SNP gena UMOD (rs13333226)*

Reakcijska smjesa ima ukupni volumen 50 µL i sadrži Applied Biosystems (Foster City, CA, SAD) reagense: TaqMan® Universal PCR Master Mix, TaqMan® SNP Assay *UMOD* (ID C_31122293_0) Mix, i DNA razrjeđenje (tablice 4.B.4a i 4.B.4b). Uvjeti PCR na uređaju ABI 7500 prikazani su u tablici 4.B.4c.

Tablica 4.B.4a. Sastojci reakcijske smjese za genotipizaciju rs13333226 *UMOD*

Sastojci reakcijske smjese	**Volumen (µL)**	**Koncentracija u reakcijskoj smjesi**
TaqMan® Universal PCR Master Mix, 2x	25,00	1x
TaqMan® SNP Assay Mix C_31122293_0, 20x	2,50	1x
DNA razrjeđenje 10x	11,25	1-20 ng
Sterilna destilirana voda	17,50	

Tablica 4.B.4b. Specifičan TaqMan® SNP Assay ID za rs13333226 *UMOD*

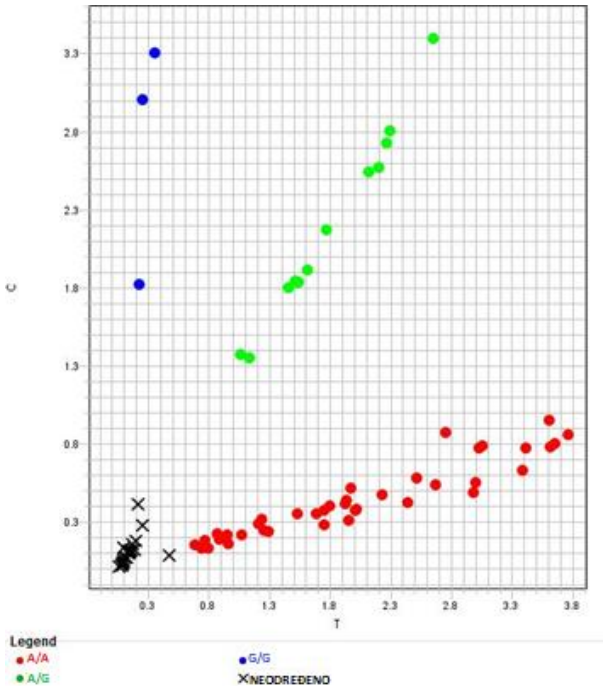
Gen - alel	**db SNP* (rs#)**	**c. DNA**	**TaqMan® DME Assay ID**
UMOD	13333226	*-1746T>G*	C__ 31122293_0
polimorfizam: A/G *Sekvenca [VIC/FAM]:* *GTCAAAGAGGTAGCACAGCTGTAGG**[A/G]**ATATTGACTCCTCTTCCCAAACAGC*			

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

Tablica 4.B.4c. Uvjeti PCR na uređaju ABI 7500 za genotipizaciju *rs*13333226 *UMOD*

	PCR (50 ciklusa)	
Inicijacija ciljna temperatura / trajanje	**Denaturacija** ciljna temperatura / trajanje	**Amplifikacija** ciljna temperatura / trajanje
50 °C / 2 minute 95 °C / 10 minuta	92 °C / 15 sekundi	60 °C / 90 sekundi

Na temelju opisanoga postupka računarni program preračunava podatke dobivene flourescencijskom emisijom i omogućava analizu raspodjele alela. Na slici 4.B.4a prikazan je primjer provedene analize serije uzoraka na SNP rs13333226 gena *UMOD*.



Slika 4.B.4a. Prikaz raspodjele alela serije uzoraka rs13333226 *UMOD*

B.5. *Genotipizacija SNP gena ADIPOQ (rs266729)*

Reakcijska smjesa ima ukupni volumen 50 µL i sadrži Applied Biosystems (Foster City, CA, SAD) reagense: TaqMan® Universal PCR Master Mix, TaqMan® SNP Assay ADIPOQ (ID C___2412786_10) Mix, i DNA razrjeđenje (tablica 4.B.5a i 4.B.5b). Uvjeti PCR na uređaju ABI 7500 prikazani su u tablici 4.B.5c.

Tablica 4.B.5a. Sastojci reakcijske smjese za genotipizaciju rs266729 *ADIPOQ*

Sastojci reakcijske smjese	Volumen (µL)	Koncentracija u reakcijskoj smjesi
TaqMan® Universal PCR Master Mix, 2x	25,00	1x
TaqMan® SNP Assay Mix C___2412786_10, 20x	2,50	1x
DNA razrjeđenje, 10x	5,00	1-20 ng
Sterilna destilirana voda	17,50	

Tablica 4.B.5b. Specifičan TaqMan® SNP Assay ID za rs266729 *ADIPOQ*

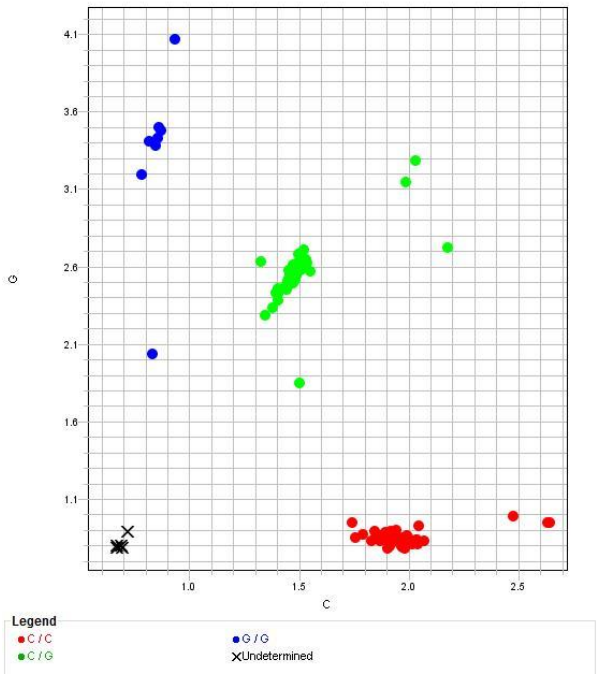
Gen - alel	db SNP* (rs#)	c. DNA	TaqMan® DME Assay ID
ADIPOQ	266729	*-11377C*>G	C___2412786_10

Polimorfizam: C/G
Sekvenca [VIC/FAM]:
*TTGCAAGAACCGGCTCAGATCCTGC**[C/G]**CTTCAAAAACAAAACATGAGCGTGC*

Tablica 4.B.5c. Uvjeti PCR na uređaju ABI 7500 za genotipizaciju rs266729 *ADIPOQ*

	PCR (40 ciklusa)	
Inicijacija ciljna temperatura / trajanje	**Denaturacija** ciljna temperatura / trajanje	**Amplifikacija** ciljna temperatura / trajanje
50 °C / 2 minute 95 °C / 10 minuta	95 °C / 15 sekunde	60 °C / 60 sekundi

Na temelju opisanoga postupka računarni program preračunava podatke dobivene flourescencijskom emisijom i omogućava analizu raspodjele alela. Na slici 4.B.5a prikazan je primjer provedene analize serije uzoraka na SNP rs266729 gena *ADIPOQ*.



Slika 4.B.5a. Prikaz raspodjele alela serije uzoraka rs266729 *ADIPOQ*

B.6. Genotipizacija SNP gena ADIPOQ (rs17300539)

Reakcijska smjesa ima ukupni volumen 50 µL i sadrži Applied Biosystems (Foster City, CA, SAD) reagense: TaqMan® Universal PCR Master Mix, TaqMan® SNP Assay ADIPOQ (ID C__33187774_10) Mix, i DNA razrjeđenje (tablica 4.B.6a i 4.B.6b). Uvjeti PCR na uređaju ABI 7500 prikazani su u tablici 4.B.6c.

Tablica 4.B.6a. Sastojci reakcijske smjese za genotipizaciju rs17300539 *ADIPOQ*

Sastojci reakcijske smjese	Volumen (µL)	Koncentracija u reakcijskoj smjesi
TaqMan® Universal PCR Master Mix, 2x	25,00	1x
TaqMan® SNP Assay Mix C__33187774_10, 20x	2,50	1x
DNA razrjeđenje, 10x	5,00	1-20 ng
Sterilna destilirana voda	17,50	

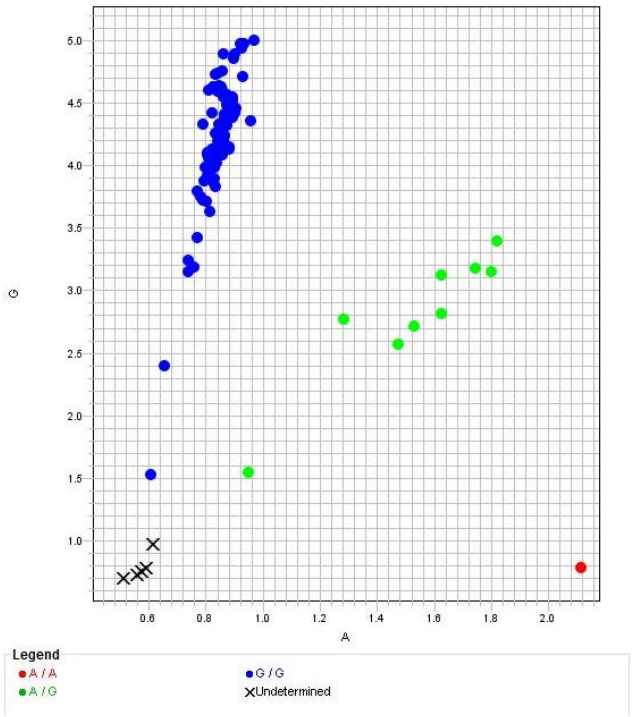
Tablica 4.B.6b. Specifičan TaqMan® SNP Assay ID za rs17300539 *ADIPOQ*

Gen - alel	db SNP* (rs#)	c. DNA	TaqMan® DME Assay ID
ADIPOQ	17300539	-11391*G>A*	C__33187774_10
Polimorfizam: A/G *Sekvenca [VIC/FAM]:* *TCAGAATGTGTGGCTTGCAAGAACC**[A/G]**GCTCAGATCCTGCCCTTCAAAAACA*			

Tablica 4.B.6c. Uvjeti PCR na uređaju ABI 7500 za genotipizaciju rs17300539 *ADIPOQ*

	PCR (40 ciklusa)	
Inicijacija	**Denaturacija**	**Amplifikacija**
ciljna temperatura / trajanje	ciljna temperatura / trajanje	ciljna temperatura / trajanje
50 °C / 2 minute 95 °C / 10 minuta	95 °C / 15 sekundi	60 °C / 60 sekundi

Na temelju opisanoga postupka računarni program preračunava podatke dobivene flourescencijskom emisijom i omogućava analizu raspodjele alela. Na slici 4.B.6a prikazan je primjer provedene analize serije uzoraka na SNP rs17300539 gena *ADIPOQ*.



Slika 4.B.6a. Prikaz raspodjele alela serije uzoraka rs17300539 *ADIPOQ*

4.3. Statistička obrada podataka

Razina statističke značajnosti je u svim analizama određena na 5 %. Kontinuirane varijable su najprije testirane na normalnu raspodjelu putem Shapiro-Wilk testa budući da su raspodjele kod svih varijabli statistički značajno odstupale od normalne, za deskriptivnu statistiku korišten je medijan te interkvartilni raspon. Za određivanje razlika u mjerenim varijablama između slučajeva i kontrola za kontinuirane varijable je korišten Mann-Whitney U test, dok je za kategorijske varijable korišten χ^2 test ili Fischerov egzaktni test ukoliko je u pojedinoj skupini bilo manje od 5 ispitanika. Za pojedinu gensku varijantu odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže ispitano je putem egzaktnoga testa s 100000 iteracija, posebno za slučajeve, kontrole te za ukupan uzorak.

Sve analize su rađene po modelu aditivnoga genskog modela, no ispitala se i povezanost drugih genskih modela na sljedeći način: ako je A rizičan alel, a B uobičajen alel, raspodjela genotipova je AA – recesivni homozigot, AB – heterozigot, BB – dominantni homozigot:

- Aditivni model: 'AA'*versus*'AB'*versus*'BB'
- Dominantni model: 'AA + AB'*versus*'BB'
- Recesivni model: 'AA'*versus*'AB + BB'
- Heterozigotni model: 'AB *versus*'AA + BB'

Korištenjem Spearmanovoga koeficijenta korelacije određena je povezanost između svih mjerenih varijabli. Za univarijatno predviđanje nastanka predhipertenzije, KV i renalnoga rizika korištena je logistička i linearna regresija (ovisno je li korištena kontinuirana ili kategorijska varijabla koja opisuje kardiovaskularni i renalni rizik). Rezultati su prikazani u obliku omjera izgleda (šansi) i 95 %-tnoga intervala pouzdanosti ili regresijskoga koeficijenta i standardne greške. Gdje je bilo potrebno dodatno su napravljene univarijatne logističke i linearne regresije prilagođene na učinke dobi i spola kako bi se sustavno uklonio njihov učinak na mjerene varijable.

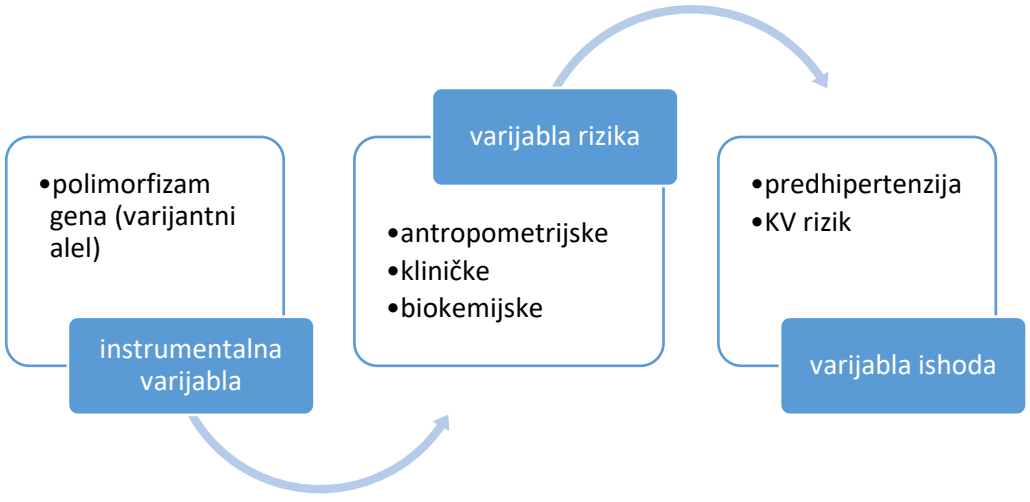
Za određivanje učinka interakcija između gena i okoliša (ostalih određivanih parametara), korištena je metoda hijerarhijske eliminacije varijabli unatrag pri kojoj inicijalni prediktivni model sadrži sve prediktore iz kojeg se zatim izbacivala jedna po jedna interakcija koja ima najmanju statističku značajnost, sve dok se ne odabere najbolji model.

Za analizu interakcija gen – gen korišten je model multifaktorskoga smanjenja dimenzija (engl. *Model Based Multifactor Dimensionality Reduction*) gdje je najprije svaki genotip testiran na povezanost s varijablom ishoda i određen kao genotip visokoga, niskoga ili bez rizika. Genotipovi iste kategorije rizika su zatim spojeni te se ponovno analizirala povezanost s varijablom ishoda. Kako bi se smanjila pogreška zbog testiranja višestrukih hipoteza korištena je

Bonferroni korekcija P vrijednosti (0,05 podijeljeno s maksimalnim brojem mogućih interakcija između određenih genskih polimorfizama). Samo modeli kojima je Bonferroni korigirana P vrijednost bila manja od 0,05 su ušli u permutacijsku analizu gdje se pomoću 100 iteracija odredila prava statistička značajnost pojedinoga modela. Najznačajniji geni iz analize gen – gen interakcije su kombinirani u različite haplotipove, te je određen najučestaliji haplotip i korištenjem univarijatne logističke regresije njegova povezanost s varijablom ishodom.

Metoda Mendelske randomizacije pomoću algoritma IVW (engl. *Inverse-Variance Weighted Method*) korištena je kako bi se pokušala odrediti uzročno-posljedična veza značajnih rezultata povezanosti određene mjerene varijable s ishodom (202). Glavni principi Mendelske randomizacije podrazumijevaju da instrumentalna varijabla (genska varijanta) nije povezana s varijablom ishoda, ali da je značajno povezana s varijablom rizika, dok je varijabla rizika značajno povezana s varijablom ishoda (shema 1).

Za statističku obradu podataka korišten je statističko-programski jezik R v3.2.2, sa sljedećim paketima: *ggplot2* v3.2.1 za izradu grafičkih prikaza (omjer izgleda i intervala pouzdanosti, eng. *forest plot*), *HardyWeinberg* v1.6.3 za izračun Hardy-Weinbergove ravnoteže, *corrplot* v0.84 za izračun Spearmanove korelacije između mjerenih varijabli, *MASS* v7.3-51.4 za odabir najznačajnijih varijabli putem algoritma hijerarhijske eliminacije varijabli unatrag, *mbmdr* v2.6 za analizu gen – gen interakcija, *hapassoc* v1.2-8 za kreiranje i analizu haplotipova, te *MendelianRandomization* v0.4.1 za analizu Mendelske randomizacije (203-212).



Shema 1. Princip Mendelske randomizacije, primjer za naše istraživanje

Kratice: KV, kardiovaskularni

5. REZULTATI

5.1. Obilježja ispitanika

Statistička analiza je učinjena na podatcima 601 ispitanika (349 žena i 252 muškarca) koji su prema JNC-7 klasifikaciji ovisno o vrijednosti AT podijeljeni u dvije skupine: kontrolna skupina ispitanika s normalnim i optimalnim AT (< 120/80 mmHg) (NT, N = 282) i skupina ispitanika s predhipertenzijom (120/80–139/89 mmHg) (PHT, N = 319). Deskriptivnom statistikom analizirani su osnovni demografski, antropometrijski podatci, klinički i biokemijski parametri svih ispitanika (tablica 5.1). U tablici 5.1a prikazana su obilježja dvije glavne skupine NT i PHT u kojoj je vidljiva razlika u spolnoj zastupljenosti. U skupini PHT je bila veća zastupljenost muškaraca (55,5 %), dok je u skupini NT bilo više žena (73,4 %), $P < 0,001$. Antropometrijski podaci (tjelesna visina, TM i opseg struka) ove dvije skupine se značajno razlikuju. Skupina PHT ima veće vrijednosti antropometrijskih parametara ($P < 0,001$). Posljedično tome, skupina PHT ima veću zastupljenost ispitanika u kategorijama ITM „prekomjerna TM“ i „debljina“ ($P < 0,001$), kao i u kategorijama umjerenoga i vrlo visokoga rizika od razvoja metaboličkih komplikacija debljine ($P = 0,025$). Također, u skupini PHT je prisutniji umjeren KV rizik ($P = 0,004$). Što se tiče biokemijskih parametara, skupina PHT je imala veće koncentracije ukupnoga kolesterola ($P = 0,005$), LDL-kolesterola ($P = 0,004$), triglicerida ($P < 0,001$), CRP ($P = 0,005$), kreatinina u serumu ($P < 0,001$) i glukoze na tašte ($P < 0,001$). Medijani koncentracija biokemijskih parametara u obje skupine su unutar referentnih intervala, a medijan koncentracija ukupnoga kolesterola i LDL-kolesterola skupine PHT se nalazi točno na gornjoj granici referentnoga intervala. Nije bilo značajnih razlika s obzirom na konzumaciju cigareta i alkohola.

Osim podjele na dvije glavne skupine, učinjena je podjela i na podskupine ovisno o kategoriji KV i KBB rizika. Tablica 5.1b. prikazuje obilježja podskupine ispitanika podijeljenih u dvije kategorije: 510 ispitanika je u kategoriji niskoga, a 15 u kategoriji umjerenoga KV rizika. Svih 15 ispitanika s umjerenim rizikom je muškog spola, te je 13 od njih u kategoriji pušača. Nadalje, medijani koncentracija ukupnoga kolesterola, LDL-kolesterola i triglicerida su veći od gornje granice referentnih intervala u kategoriji ispitanika s umjerenim KV rizikom i značajno se razlikuju od vrijednosti u podskupini s niskim rizikom ($P < 0,001$). Prikazana je i deskriptivna statistika ispitanika ovisno o kategoriji KBB rizika (tablica 5.1c). U kategoriji s niskim rizikom se nalazi 450 ispitanika, a šest je unutar podskupine s umjerenim KBB rizikom. S obzirom na mali broj ispitanika koji se nalaze u kategorijama umjerenoga KV i KBB rizika, rezultati ovih podskupina ispitanika se trebaju tumačiti s oprezom. Svi statistički značajni rezultati su naznačeni debljim tiskom („bold“) u tablicama.

Tablica 5.1. Klinička obilježja svih ispitanika

Parametri		**Svi ispitanici** (N = 601)
demografski parametri		
spol, N (%)	muškarci	252 (41,93)
	žene	349 (58,07)
dob (godine), medijan (IQR)		33 (14)
antropometrijski i klinički parametri [medijan (IQR)]		
tjelesna visina (cm)		172 (15)
tjelesna masa (kg)		75 (21)
opseg struka (cm)		87 (17)
ITM (kg/m^2)		25 (6)
kategorije ITM, N (%)	nedovoljna TM	14 (2,43)
	optimalna TM	281 (48,87)
	prekomjerna TM	195 (33,91)
	debljina	85 (14,78)
frekvencija srca (otkucaji/min)		76,5 (16)
sistolički AT (mmHg)		119 (16)
dijastolički AT (mmHg)		76,5 (11)
klasifikacija AT	normotenzija	282 (46,92)
	predhipertenzija	319 (53,08)
rizik od razvoja metaboličkih komplikacija debljine, N (%)	nema	261 (45,87)
	umjeren	159 (27,94)
	vrlo visok	149 (26,19)
KV rizik (%)		1,7 (2,6)
kategorije KV rizika, N (%)	nizak (< 10 %)	510 (97,14)
	umjeren (10 - < 20 %)	15 (2,86)
kategorije KBB rizika, N (%)	nizak	450 (98,68)
	umjeren	6 (1,32)
okolišni parametri [N (%)]		
cigarete	nepušač	281 (53,22)
	bivši pušač	36 (6,82)
	pušač	211 (39,96)
alkohol	ne konzumira	69 (60)
	≤ 2 dL/dan	37 (32,17)
	> 2 dL/dan	8 (6,96)
	> 5 dL/dan	1 (0,87)
socijalni status (€/god)	0 – 500	30 (7,81)
	501 – 1500	11 (2,86)
	1501 – 3000	60 (15,62)
	3001 – 5000	91 (23,7)
	5000 – 10000	135 (35,16)
	> 10000	57 (14,84)

Parametri	**Svi ispitanici** (N = 601)
biokemijski parametri [medijan (IQR)]	
kreatinin u serumu (μmol/L)	76 (15)
glukoza na tašte (mmol/L)	4,9 (0,7)
CRP (mg/L)	1 (1,83)
kolesterol ukupni (mmol/L)	4,9 (1,5)
HDL-kolesterol (mmol/L)	1,42 (0,49)
LDL-kolesterol (mmol/L)	2,9 (1,2)
trigliceridi (mmol/L)	0,97 (0,69)
eGFR (ml/min/1,73m^2)	98,72 (20,91)
albumin porcija (mg/L)	6,53 (6,55)
kreatinin porcija (mmol/L)	11,7 (9,3)
ACR (mg/g)	4 (3,3)
A1MCR (mg/g)	4,91 (4,51)

*Normalna raspodjela testirala se Shapiro-Wilk testom te su sve kontinuirane varijable pokazivale značajno odstupanje, $P < 0,05$; kategorije KBB rizika prema KDIGO (198), kategorije KV rizika prema *Framingham*-skom bodvnom sustavu (199).

Kratice: A1MCR, omjer alfa-1-mikroglobulina i kreatinina u mokraći; ACR, omjer albumina i kreatinina u mokraći; AT, arterijski tlak; CRP, C-reaktivni protein; eGFR, procjena glomerularne filtracije prema CKD-EPI; IQR, interkvartalni raspon; ITM, indeks tjelesne mase; KBB, kronična bubrežna bolest; KV, kardiovaskularni; TM, tjelesna masa.

Tablica 5.1a. Klinička obilježja ispitanika s normotenzijom i predhipertenzijom

PARAMETRI		NT	PHT	P*
demografski parametri				
ispitanici, N (%)		282 (46,9)	319 (53,1)	
spol, N (%)	muškarci	75 (26,6)	177 (55,5)	**<0,001**
	žene	207 (73,4)	142 (44,5)	
dob (godine), medijan (IQR)		31 (13,0)	34 (13,0)	0,082
antropometrijski i klinički parametri [medijan (IQR)]				
tjelesna visina (cm)		169 (13,0)	175 (15,0)	**<0,001**
tjelesna masa (kg)		69 (18,0)	80 (21,0)	**<0,001**
opseg struka (cm)		84 (17,5)	90 (17,0)	**<0,001**
ITM (kg/m^2)		23,7 (6,0)	25,9 (5,7)	**<0,001**
kategorije ITM, N (%)	nedovoljna TM	13 (4,78)	1 (0,33)	**<0,001**
	optimalna TM	155 (56,99)	126 (41,58)	
	prekomjerna TM	78 (28,68)	117 (38,61)	
	debljina	26 (9,56)	59 (19,47)	
frekvencija srca (otkucaji/min)		76 (17,12)	77,5 (15)	0,134
sistolički AT (mmHg)		111 (9,5)	126 (10,8)	**<0,001**
dijastolički AT (mmHg)		72 (10,0)	81 (8,0)	**<0,001**
rizik od razvoja metaboličkih komplikacija debljine, N (%)	nema	140 (51,66)	121 (40,6)	**0,025**
	umjeren	65 (23,99)	94 (31,54)	
	vrlo visok	66 (24,35)	83 (27,85)	
KV rizik (%)		1,2 (1,62)	2,3 (2,9)	**<0,001**
Kategorije KV rizika, N (%)	nizak (< 10 %)	243 (99,59)	267 (95,02)	**0,004**
	umjeren (10 - < 20 %)	1 (0,41)	14 (4,98)	
Kategorije KBB rizika, N (%)	nizak	211 (99,06)	239 (98,35)	0,080
	umjeren	2 (0,94)	4 (1,65)	
okolišni parametri [N (%)]				
cigarete	nepušač	127 (51,42)	154 (54,8)	0,103
	bivši pušač	12 (4,86)	24 (8,54)	
	pušač	108 (43,72)	103 (36,65)	
alkohol	ne konzumira	33 (70,21)	36 (52,94)	0,262
	≤ 2 dL/dan	12 (25,53)	25 (36,76)	
	> 2 dL/dan	2 (4,26)	6 (8,82)	
	> 5 dL/dan	0	1 (1,47)	
socijalni status (€/god)	0 – 500	9 (5,29)	21 (9,81)	**0,023**
	501 – 1500	5 (2,94)	6 (2,80)	
	1501 – 3000	38 (22,35)	22 (10,28)	
	3001 – 5000	41 (24,12)	50 (23,36)	
	5000 – 10000	56 (32,94)	79 (36,92)	
	> 10000	21 (12,35)	36 (16,82)	

PARAMETRI	NT	PHT	P*
biokemijski parametri [medijan (IQR)]			
kreatinin u serumu (μmol/L)	74 (14)	79 (18)	**<0,001**
glukoza na tašte (mmol/L)	4,8 (0,7)	4,9 (0,7)	**<0,001**
CRP (mg/L)	0,8 (1,5)	1,1 (1,8)	**0,005**
kolesterol ukupni (mmol/L)	4,8 (1,4)	5,0 (1,5)	**0,005**
HDL-kolesterol (mmol/L)	1,47 (0,52)	1,40 (0,48)	0,098
LDL-kolesterol (mmol/L)	2,70 (1,30)	3,00 (1,20)	**0,004**
trigliceridi (mmol/L)	0,9 (0,6)	1,07 (0,8)	**<0,001**
eGFR (mL/min/1,73m^2)	99 (21)	98 (20)	0,306
albumin porcija (mg/L)	6,5 (6,3)	6,6 (6,8)	0,699
kreatinin porcija (mmol/L)	11,3 (9,8)	12,2 (9,2)	0,740
ACR (mg/g)	3,9 (3,3)	4,0 (3,0)	0,413
A1MCR (mg/g)	4,9 (4,9)	4,9 (4,2)	0,917

*P vrijednost Mann-Whitney U testa za kontinuirane varijable (normalna raspodjela testirala se Shapiro-Wilk testom te su sve kontinuirane varijable pokazivale značajno odstupanje, $P < 0,05$); P vrijednost χ^2 testa ili Fischerovog egzaktnog testa (ako je u pojedinoj grupi bilo manje od 5 ispitanika) za kategorijske varijable; kategorije KBB rizika prema KDIGO (198), kategorije KV rizika prema *Framingham*-skom bodvnom sustavu (199)

Kratice: A1MCR, omjer alfa-1-mikroglobulina i kreatinina u mokraći; ACR, omjer albumina i kreatinina u mokraći; AT, arterijski tlak; CRP, C-reaktivni protein; eGFR, procjena glomerularne filtracije prema CKD-EPI; IQR, interkvartalni raspon; ITM, indeks tjelesne mase; KBB, kronična bubrežna bolest; KV, kardiovaskularni; NMT, normotenzija; PHT, predhipertezija; TM, tjelesna masa.

Tablica 5.1b. Deskriptivna statistika ispitanika ovisno o kardiovaskularnom riziku

Parametri		**Nizak KV rizik (N = 510)**	**Umjeren KV rizik (N = 15)**	**P***
demografski parametri				
spol, N (%)	muškarci	220 (43,14)	15 (100)	**<0,001**
	žene	290 (56,86)	/	
dob (godine), medijan (IQR)		32 (13)	42 (5)	**<0,001**
antropometrijski i klinički parametri [medijan (IQR)]				
tjelesna visina (cm)		172 (15)	178 (9)	0,053
tjelesna masa (kg)		75 (21)	92 (22,5)	**0,003**
opseg struka (cm)		87 (17,75)	97 (12,25)	**0,004**
ITM (kg/m^2)		25 (6)	28,3 (4,3)	**0,016**
kategorije ITM, N (%)	nedovoljna TM	11 (2,22)	/	0,174
	optimalna TM	242 (48,79)	3 (21,43)	
	prekomjerna TM	166 (33,47)	8 (57,14)	
	debljina	77 (15,52)	3 (21,43)	
frekvencija srca (otkucaji/min)		77,25 (15,5)	71,25 (16,75)	0,105
sistolički AT (mmHg)		118 (16)	128,5 (7)	**0,003**
dijastolički AT (mmHg)		76 (11,38)	81 (6)	**0,007**
klasifikacija AT	NMT	243 (47,65)	1 (6,67)	**0,004**
	PHT	267 (52,35)	14 (93,33)	
rizik od razvoja metaboličkih komplikacija debljine, N (%)	nema	227 (45,95)	4 (28,57)	0,367
	umjeren	138 (27,94)	6 (42,86)	
	vrlo visok	129 (26,11)	4 (28,57)	
KV rizik (%)		1,7 (2,4)	11,2 (3,3)	**<0,001**
kategorije KBB rizika, N (%)	nizak	406 (98,78)	13 (92,86)	0,486
	umjeren	5 (1,22)	1 (7,14)	
okolišni parametri [N (%)]				
cigarete	nepušač	273 (54,6)	2 (13,33)	**<0,001**
	bivši pušač	34 (6,8)	/	
	pušač	193 (38,6)	13 (86,67)	
alkohol	ne konzumira	65 (61,9)	2 (33,33)	0,288
	≤ 2 dL/dan	31 (29,52)	4 (66,67)	
	> 2 dL/dan	8 (7,62)	/	
	> 5 dL/dan	1 (0,95)	/	
socijalni status (€/god)	0 – 500	28 (7,82)	/	0,720
	501 – 1500	10 (2,79)	/	
	1501 – 3000	56 (15,64)	1 (7,14)	
	3001 – 5000	85 (23,74)	4 (28,57)	
	5000 – 10000	126 (35,2)	6 (42,86)	
	> 10000	53 (14,8)	3 (21,43)	

Parametri	Nizak KV rizik (N = 510)	Umjeren KV rizik (N = 15)	P*
biokemijski parametri [medijan (IQR)]			
kreatinin u serumu (μmol/L)	76 (15,75)	90,5 (19,5)	**<0,001**
glukoza na tašte (mmol/L)	4,85 (0,7)	5,55 (1,52)	**<0,001**
CRP (mg/L)	1 (1,9)	1,7 (1)	0,063
kolesterol ukupni (mmol/L)	4,85 (1,6)	6,2 (1,25)	**<0,001**
HDL-kolesterol (mmol/L)	1,41 (0,48)	1,2 (0,38)	**<0,001**
LDL-kolesterol (mmol/L)	2,9 (1,2)	4,2 (1,3)	**<0,001**
trigliceridi (mmol/L)	0,97 (0,67)	1,9 (1,18)	**<0,001**
eGFR (mL/min/1,73m^2)	99,05 (20,26)	89,65 (22,69)	0,056
albumin porcija (mg/L)	6,54 (6,81)	8,28 (4,54)	0,652
kreatinin porcija (mmol/L)	11,5 (9,6)	13,7 (5,7)	0,191
ACR (mg/g)	4 (3,4)	2,65 (2,83)	0,082
A1MCR (mg/g)	4,81 (4,4)	5,66 (3,25)	0,816

*P vrijednost Mann-Whitney U testa za kontinuirane varijable; P vrijednost χ^2 testa ili Fisherovog egzaktnog testa (ako je u pojedinoj grupi bilo manje od 5 ispitanika) za kategorijske varijable; ; kategorije KBB rizika prema KDIGO (198), kategorije KV rizika prema *Framingham*-skom bodvnom sustavu (199)

Kratice: A1MCR, omjer alfa-1-mikroglobulina i kreatinina u mokraći; ACR, omjer albumina i kreatinina u mokraći; AT, arterijski tlak; CRP, C-reaktivni protein; eGFR, procjena glomerularne filtracije prema CKD-EPI; IQR, interkvartalni raspon; ITM, indeks tjelesne mase; KBB, kronična bubrežna bolest; KV, kardiovaskularni; NMT, normotenzija; PHT, predhipertezija; TM, tjelesna masa.

Tablica 5.1c. Klinička obilježja ispitanika ovisno o renalnom riziku

Parametri		**Nizak KBB rizik (N = 450)**	**Umjeren KBB rizik (N = 6)**	**P***
demografski parametri				
spol, N (%)	muškarci	185 (41,11)	2 (33,33)	1,000
	žene	265 (58,89)	4 (66,67)	
dob (godine), medijan (IQR)		34 (14,75)	40,5 (13)	0,212
antropometrijski i klinički parametri [medijan (IQR)]				
tjelesna visina (cm)		170 (15)	167,5 (10,75)	0,599
tjelesna masa (kg)		74 (21)	72 (18,25)	0,595
opseg struka (cm)		87 (17)	78 (10)	0,242
ITM (kg/m^2)		25,1 (5,8)	24,65 (2,5)	0,569
kategorije ITM, N (%)	nedovoljna TM	12 (2,73)	/	0,711
	optimalna TM	200 (45,45)	4 (66,67)	
	prekomjerna TM	159 (36,14)	1 (16,67)	
	debljina	69 (15,68)	1 (16,67)	
frekvencija srca (otkucaji/min)		76,5 (15,25)	72 (20,75)	0,318
sistolički AT (mmHg)		118 (15,88)	115,75 (1,88)	0,408
dijastolički AT (mmHg)		76 (11)	82,5 (19,75)	0,583
klasifikacija AT	NMT	211 (46,89)	2 (33,33)	0,803
	PHT	239 (53,11)	4 (66,67)	
rizik od razvoja metaboličkih komplikacija debljine, N (%)	nema	178 (40,83)	4 (80)	0,172
	umjeren	137 (31,42)	/	
	vrlo visok	121 (27,75)	1 (20)	
KV rizik (%)		2 (2,7)	2,65 (1,15)	0,541
kategorije KV rizika, N (%)	nizak (< 10 %)	406 (96,9)	5 (83,33)	0,486
	umjeren (10 - < 20 %)	13 (3,1)	1 (16,67)	
okolišni parametri [N (%)]				
cigarete	nepušač	210 (51,09)	3 (50)	0,748
	bivši pušač	32 (7,79)	/	
	pušač	169 (41,12)	3 (50)	
alkohol	ne konzumira	61 (61,62)	2 (66,67)	0,967
	≤ 2 dL/dan	30 (30,3)	1 (33,33)	
	> 2 dL/dan	7 (7,07)	/	
	> 5 dL/dan	1 (1,01)	/	
socijalni status (€/god)	0 – 500	30 (8,43)	/	0,077
	501 – 1500	10 (2,81)	/	
	1501 – 3000	56 (15,73)	/	
	3001 – 5000	88 (24,72)	/	
	5000 – 10000	123 (34,55)	2 (40)	
	> 10000	49 (13,76)	3 (60)	

Parametri	Nizak KBB rizik (N = 450)	Umjeren KBB rizik (N = 6)	P*
biokemijski parametri [medijan (IQR)]			
kreatinin u serumu (μmol/L)	76 (14,75)	82,5 (22)	0,642
glukoza na tašte (mmol/L)	4,9 (0,7)	5 (0,75)	0,703
CRP (mg/L)	1,1 (2)	0,4 (0,4)	0,159
kolesterol ukupni (mmol/L)	5 (1,4)	4,85 (1)	0,747
HDL-kolesterol (mmol/L)	1,43 (0,49)	1,35 (0,21)	0,720
LDL-kolesterol (mmol/L)	3 (1,2)	3,05 (0,6)	0,584
trigliceridi (mmol/L)	1 (0,76)	1,07 (0,69)	0,739
eGFR (mL/min/1,73m^2)	98,27 (20,74)	96,81 (29,01)	0,518
albumin porcija (mg/L)	6,46 (6,4)	35,8 (114,4)	**0,044**
kreatinin porcija (mmol/L)	11,9 (9)	9 (3,4)	0,054
ACR (mg/g)	4 (3,17)	42,2 (33,62)	**0,002**
A1MCR (mg/g)	5 (4,49)	12 (0)	0,154

*P vrijednost Mann-Whitney U testa za kontinuirane varijable; P vrijednost χ^2 testa ili Fisherovog egzaktnog testa (ako je u pojedinoj grupi bilo manje od 5 ispitanika) za kategorijske varijable; ; kategorije KBB rizika prema KDIGO (198), kategorije KV rizika prema *Framingham*-skom bodvnom sustavu (199)

Kratice: A1MCR, omjer alfa-1-mikroglobulina i kreatinina u mokraći; ACR, omjer albumina i kreatinina u mokraći; AT, arterijski tlak; CRP, C-reaktivni protein; eGFR, procjena glomerularne filtracije prema CKD-EPI; IQR, interkvartalni raspon; ITM, indeks tjelesne mase; KBB, kronična bubrežna bolest; KV, kardiovaskularni; NMT, normotenzija; PHT, predhipertezija; TM, tjelesna masa.

5.2. Raspodjela genotipova i učestalost pojedinih alela

Proveden je egzaktni test Hardy-Weinbergove ravnoteže (engl. *Hardy-Weinberg equilibrium*, HWE) s 100000 iteracija na razini svih ispitanika (tablica 5.2). Niti jedan istraživani polimorfizam nije odstupao od HWE. Prikazana je učestalost pojedinih genotipova kao i učestalost *minor* alela istraživanih polimorfizama u ukupnoj populaciji. Učestalost *minor* alela *T* rs2004776 *AGT* je 29,1 %, *minor* alela *C* rs5186 *AGTR1* 27,1 %, *minor* alela *G* rs1801253 *ADRB1* 27,1 %, *minor* alela *G* rs266729 *ADIPOQ* je 29,6 %, *minor* alela *A* rs17300539 *ADIPOQ* 8,4 %, *minor* alela *G* rs13333228 *UMOD* 15,6 % te alela *I* rs4646994 *ACE* je 48,9 %.

Osim na razini cijele skupine, odstupanje pojedinih polimorfizama od HWE analizirano je i u glavnim skupinama normotoničara i predhipertoničara. Test je pokazao odstupanje od HWE za polimorfizam rs1801253 gena *ADRB1* u skupini normotoničara, dok za druge polimorfizme nije bilo odstupanja (tablica 5.2a). U tablici 5.2a je prikazana raspodjela genotipova i učestalost *minor* alela istraživanih polimorfizama u skupinama NT i PHT. Jedina značajna razlika je nađena u broju heterozigotnih nositelja *C/G* polimorfizma rs266729 gena *ADIPOQ*. U skupini PHT je bilo manje heterozigotnih nositelja nego u skupini NT (35,1 % *vs*. 44,7 %, P = 0,037). Nije nađena značajna razlika u učestalosti *minor* alela.

Odstupanje pojedinih polimorfizama od HWE je istraženo i u subpopulaciji ispitanika podijeljenih ovisno o KV riziku. Svi polimorfizmi bili su u skladu s HWE (tablica 5.2b). Nije bilo razlike u raspodjeli istraživanih genotipova niti u učestalosti *minor* alela u ispitanika ovisno o kategoriji KV rizika. Analiza odstupanja od HWE je napravljena i u subpopulaciji ispitanika podijeljenoj prema kategorijama KBB rizika (nizak i umjeren), te je nađeno odstupanje od HWE za rs2004776 *AGT* u skupini s niskim KBB rizikom (tablica 5.2c). Analiza raspodjele istraživanih genotipova i učestalosti *minor* alela u ovoj subpopulaciji ukazala je na razliku raspodjele genotipova polimorfizma rs1801253 *ADRB1* no zbog maloga broja ispitanika u kategoriji umjerenoga KBB rizika, i posljedično male snage, ovaj rezultat treba uzeti sa zadrškom.

Tablica 5.2. Raspodjela odabranih genotipova i učestalost alela istraživanih polimorfizama u svih ispitanika

Svi ispitanici (N = 601)			**N (%)**	**HWE P***
angiotenzinogen, *AGT* (rs2004776)	genotip	*CC*	285 (47,4)	0,087
		CT	259 (43,1)	
		TT	41 (6,8)	
	učestalost alela	*C*	829 (70,9)	
		T	341 (29,1)	
angiotenzin II receptor tip 1, *AGTR1* (rs5186)	genotip	*AA*	304 (50,6)	0,462
		AC	236 (39,3)	
		CC	39 (6,5)	
	učestalost alela	*A*	844 (72,9)	
		C	314 (27,1)	
beta-1-adrenergički receptor, *ADRB1* (rs1801253)	genotip	*GG*	32 (5,3)	0,059
		CG	241 (40,1)	
		CC	290 (48,3)	
	učestalost alela	*G*	305 (27,1)	
		C	821 (72,9)	
adiponektin, *ADIPOQ* (rs266729)	genotip	*CC*	279 (46,4)	0,844
		CG	238 (39,6)	
		GG	48 (8,0)	
	učestalost alela	*C*	796 (70,4)	
		G	334 (29,6)	
adiponektin, *ADIPOQ* (rs17300539)	genotip	*GG*	470 (78,2)	0,414
		GA	90 (15,0)	
		AA	2 (0,3)	
	učestalost alela	*G*	1030 (91,6)	
		A	94 (8,4)	
uromodulin, *UMOD* (rs13333228)	genotip	*AA*	405 (67,4)	0,536
		AG	155 (25,8)	
		GG	12 (2,0)	
	učestalost alela	*A*	965 (84,4)	
		G	179 (15,6)	
angiotenzin konvertaza, *ACE* (rs4646994)	genotip	*II*	131 (21,8)	0,552
		ID	289 (48,1)	
		DD	143 (23,8)	
	učestalost alela	*I*	551 (48,9)	
		D	575 (51,1)	

*P vrijednost egzaktnog testa Hardy-Weinbergove ravnoteže s 100000 iteracija;

Kratica: HWE, Hardy-Weinbergova ravnoteža

Tablica 5.2a. Raspodjela odabranih genotipova i učestalost alela istraživanih polimorfizama u ispitanika s normotenzijom i predhipertenzijom

		NT N = 282		PHT N = 319		P*
		N (%)	HWE P⁺	N (%)	HWE P⁺	
angiotenzinogen, *AGT* (rs2004776)	*CC*	140 (49,7)	0,241	145 (45,5)	0,235	0,539
	CT	118 (41,8)		141 (44,2)		
	TT	17 (6,0)		24 (7,5)		
	C	398 (72,4)		431 (69,5)		0,315
	T	152 (27,6)		189 (30,5)		
angiotenzin II receptor tip 1, *AGTR1* (rs5186)	*AA*	141 (50,0)	0,548	163 (51,1)	0,668	0,891
	AC	114 (40,4)		122 (38,2)		
	CC	19 (6,7)		20 (6,3)		
	A	396 (72,3)		448 (73,4)		0,700
	C	152 (27,7)		162 (26,6)		
beta-1-adrenergički receptor, *ADRB1* (rs1801253)	*GG*	13 (4,6)	**0,043**	19 (6,0)	0,559	0,487
	CG	119 (42,2)		122 (38,2)		
	CC	131 (46,5)		159 (49,8)		
	G	145 (27,6)		160 (26,7)		0,786
	C	381 (72,4)		440 (73,3)		
adiponektin, *ADIPOQ*_1 (rs266729)	*CC*	121 (42,9)	0,064	158 (49,5)	0,159	**0,037**
	CG	126 (44,7)		112 (35,1)		
	GG	18 (6,4)		30 (9,4)		
	C	368 (69,4)		428 (71,3)		0,527
	G	162 (30,6)		172 (28,7)		
adiponektin, *ADIPOQ*_2 (rs17300539)	*GG*	214 (75,9)	0,489	256 (80,3)	0,722	0,299
	GA	49 (17,4)		41 (12,9)		
	AA	1 (0,35)		1 (0,3)		
	G	477 (90,3)		553 (92,8)		0,171
	A	51 (9,7)		43 (7,2)		
uromodulin, *UMOD* (rs13333228)	*AA*	178 (63,1)	0,686	227 (71,2)	0,656	0,228
	AG	79 (28,0)		76 (23,8)		
	GG	7 (2,5)		5 (1,57)		
	A	435 (82,4)		530 (86,0)		0,107
	G	93 (17,6)		86 (14,0)		
angiotenzin konvertaza, *ACE* (rs4646994)	*II*	62 (22,0)	0,448	69 (21,6)	0,111	0,150
	ID	125 (44,3)		164 (51,4)		
	DD	76 (27,0)		67 (21,0)		
	I	249 (47,3)		302 (50,3)		0,346
	D	277 (52,7)		298 (49,7)		

*P vrijednost χ^2 testa ili Fischer exact testa (ako je u pojedinoj grupi bilo <5 ispitanika); ⁺P vrijednost egzaktnog testa HWE s 100.000 iteracija.

Kratice: HWE, Hardy-Weinbergova ravnoteža; NT, normotenzija; PHT, predhipertezija

Tablica 5.2b. Raspodjela odabranih genotipova i učestalost alela istraživanih polimorfizama u ispitanika ovisno o kategorijama kardiovaskularnog rizika

		Nizak KV rizik N = 510		Umjeren KV rizik N = 15		P*
		N (%)	HWE P⁺	N (%)	HWE P⁺	
angiotenzinogen, *AGT* (rs2004776)	*CC*	250 (49)	0,092	3 (20)	0,157	0,094
	CT	216 (42,4)		10 (66,7)		
	TT	31 (6,1)		1 (6,7)		
	C	716 (72,0)		16 (57,1)		0,131
	T	278 (28,0)		12 (42,9)		
angiotenzin II receptor tip 1, *AGTR1* (rs5186)	*AA*	259 (50,8)	0,565	9 (60)	0,369	0,435
	AC	201 (39,4)		3 (20)		
	CC	34 (6,7)		1 (6,7)		
	A	719 (72,8)		21 (80,8)		0,495
	C	269 (27,2)		5 (19,2)		
beta-1-adrenergički receptor, *ADRB1* (rs1801253)	*GG*	27 (5,3)	0,064	0 (0)	0,545	0,678
	CG	206 (40,4)		6 (40)		
	CC	247 (48,4)		7 (46,7)		
	G	260 (27,1)		6 (23,1)		0,818
	C	700 (72,9)		20 (76,9)		
adiponektin, *ADIPOQ*_1 (rs266729)	*CC*	234 (45,9)	0,275	9 (60)	0,370	0,320
	CG	208 (40,8)		3 (20)		
	GG	36 (7,1)		1 (6,7)		
	C	676 (70,7)		21 (80,8)		0,370
	G	280 (29,3)		5 (19,2)		
adiponektin, *ADIPOQ*_2 (rs17300539)	*GG*	401 (78,6)	0,575	13 (86,7)	/	0,298
	GA	73 (14,3)		0 (0)		
	AA	2 (0,4)		0 (0)		
	G	875 (91,9)		26 (100,0)		0,254
	A	77 (8,1)		0 (0)		
uromodulin, *UMOD* (rs13333228)	*AA*	349 (68,4)	1,000	13 (86,7)	1,000	0,430
	AG	126 (24,7)		2 (13,3)		
	GG	11 (2,2)		0 (0)		
	A	824 (84,8)		28 (93,3)		0,301
	G	148 (15,2)		2 (6,7)		
angiotenzin konvertaza, *ACE* (rs4646994)	*II*	119 (23,3)	0,850	2 (13,3)	0,151	0,228
	ID	244 (47,8)		9 (60)		
	DD	119 (23,3)		1 (6,7)		
	I	482 (50,0)		13 (54,2)		0,844
	D	482 (50,0)		11 (45,8)		

*P vrijednost χ^2 testa ili Fischer exact testa (ako je u pojedinoj grupi bilo <5 ispitanika); ⁺P vrijednost egzaktnog testa HWE s 100.000 iteracija.

Kratice: HWE, Hardy-Weinbergova ravnoteža; KV, kardiovaskularni

Tablica 5.2c. Raspodjela odabranih genotipova i učestalost alela istraživanih polimorfizama u ispitanika ovisno o kategorijama renalnog rizika

		Nizak KBB rizik (N = 450)		Umjeren KBB rizik (N = 6)		P*
		N (%)	HWE P+	N (%)	HWE P+	
angiotenzinogen, *AGT* (rs2004776)	*CC*	215 (47,8)	**0,046**	3 (50)	1,000	0,546
	CT	196 (43,6)		2 (33,3)		
	TT	27 (6)		1 (16,7)		
	C	626 (69,6)		8 (66,7)		0,965
	T	250 (27,8)		4 (33,3)		
angiotenzin II receptor tip 1, *AGTR1* (rs5186)	*AA*	230 (51,1)	0,453	3 (50)	1,000	0,579
	AC	175 (38,9)		2 (33,3)		
	CC	27 (6)		1 (16,7)		
	A	635 (70,6)		8 (66,7)		0,839
	C	229 (25,4)		4 (33,3)		
beta-1-adrenergički receptor, *ADRB1* (rs1801253)	*GG*	22 (4,9)	0,135	2 (33,3)	1,000	**0,011**
	CG	176 (39,1)		2 (33,3)		
	CC	227 (50,4)		2 (33,3)		
	G	220 (24,4)		6 (50)		0,120
	C	630 (70)		6 (50)		
adiponektin, *ADIPOQ*_1 (rs266729)	*CC*	209 (46,4)	1,000	2 (33,3)	0,521	0,416
	CG	173 (38,4)		4 (66,7)		
	GG	36 (8)		0 (0)		
	C	591 (65,7)		8 (66,7)		1,000
	G	245 (27,2)		4 (33,3)		
adiponektin, *ADIPOQ*_2 (rs17300539)	*GG*	361 (80,2)	0,711	6 (100)	/	0,639
	GA	53 (11,8)		0 (0)		
	AA	1 (0,2)		0 (0)		
	G	775 (86,1)		12 (100)		0,738
	A	55 (6,1)		0 (0)		
uromodulin, *UMOD* (rs13333228)	*AA*	299 (66,4)	1,000	4 (66,7)	1,000	0,884
	AG	116 (25,8)		2 (33,3)		
	GG	11 (2,4)		0 (0)		
	A	714 (79,3)		10 (83,3)		1,000
	G	138 (15,3)		2 (16,7)		
angiotenzin konvertaza, *ACE* (rs4646994)	*II*	103 (22,9)	0,848	1 (16,7)	1,000	0,737
	ID	213 (47,3)		4 (66,7)		
	DD	105 (23,3)		1 (16,7)		
	I	419 (46,6)		6 (50)		1,000
	D	423 (47)		6 (50)		

*P vrijednost χ^2 testa ili Fischer exact testa (ako je u pojedinoj grupi bilo <5 ispitanika); +P vrijednost egzaktnog testa HWE s 100.000 iteracija.

Kratice: HWE, Hardy-Weinbergova ravnoteža; KBB, kronična bubrežna bolest

Povezanost odabranih genotipova polimorfizama s predhipertenzijom, KV i KBB rizikom provedena je univarijatnom logističkom regresijom. Uspoređene su dvije glavne skupine ispitanika s normotenzijom i predhipertenzijom, te subpopulacije ispitanika razvrstane ovisno o stupnju KV i KBB rizika. U tablici 5.3 su prikazani dominantni, recesivni i heterozigotni genski modeli rizika.

Univarijatna logistička regresija je pokazala statistički značajan rezultat za heterozigotni genski model (*CG vs GG/CC*) polimorfizma rs266729 *ADIPOQ* u smislu smanjenoga rizika za predhipertenziju (OR 0,66; 95 % CI 0,47-0,92; P = 0,014). Izgled za predhipertenziju je 0,66 puta manji u heterozigotnog nositelja *C*/*G* polimorfizma rs266729 *ADIPOQ* u odnosu prema pojedincima koji nisu heterozigoti *major* alela *C*.

Za povećan KV rizik se pokazao značajan dominantan (*CT/TT vs CC*) genski model polimorfizma rs2004776 *AGT* (OR 3,71; 95 % CI 1,02-13,46; P = 0,046). Izgled za umjeren KV rizik je 3,71 puta veći u nositelja alela *T* polimorfizma rs2004776 *AGT* u odnosu prema pojedincima koji nisu nositelji. Regresija je za KBB rizik ukazala na značajan dominantan (*GC/CC* vs *GG*) model polimorfizma rs1801253 *ADRB1* (OR 0,11; 95 % CI 0,02-0,63; P = 0,013). Izgled za umjeren KBB rizik je 0,11 puta manji u nositelja alela *C* polimorfizma rs1801253 *ADRB* u odnosu prema pojedincima koji nisu nositelji.

Tablica 5.3. Povezanost genskih polimorfizama s predhipertenzijom, kardiovaskularnim i renalnim rizikom ovisno o različitom genskom modelu

		Predhipertenzija			KV rizik			KBB rizik		
		OR	**95 % CI**	**P**	**OR**	**95 % CI**	**P**	**OR**	**95 % CI**	**P**
AGT **rs2004776**	DM CT/TT vs CC	1,18	0,85-1,63	0,318	3,71	1,02-13,46	**0,046**	nije zadovoljio HWE prag		
	RM TT vs CT/CC	1,27	0,67-2,42	0,462	1,16	0,15-9,13	0,890			
	HM CT vs TT/CC	1,11	0,8-1,54	0,532	3,25	1,01-10,51	0,049			
AGTR1 **rs5186**	DM AC/CC vs AA	0,92	0,67-1,28	0,633	0,49	0,15-1,61	0,240	1,14	0,23-5,7	0,875
	RM CC vs AC/AA	0,94	0,49-1,8	0,857	1,13	0,14-8,93	0,910	3	0,34-26,59	0,324
	HM AC vs CC/AA	0,94	0,67-1,3	0,695	0,44	0,12-1,61	0,213	0,73	0,13-4,05	0,723
ADRB1 **rs1801253**	DM GC/CC vs GG	nije zadovoljio HWE prag				/		0,11	0,02-0,63	**0,013**
	RM CC vs GC/GG				1,10	0,36-3,32	0,865	0,44	0,08-2,41	0,341
	HM GC vs GG/CC				1,14	0,38-3,44	0,816	0,71	0,13-3,9	0,691
ADIPOQ **rs266729**	DM CG/GG vs CC	0,76	0,54-1,05	0,097	0,43	0,13-1,40	0,161	2	0,36-11,04	0,426
	RM GG vs CG/CC	1,52	0,83-2,8	0,175	1,02	0,13-8,09	0,983		/	
	HM CG vs GG/CC	0,66	0,47-0,92	**0,014**	0,39	0,11-1,43	0,156	2,83	0,51-15,64	0,232
ADIPOQ **rs17300539**	DM GA/AA vs GG	0,70	0,45-1,10	0,122		/			/	
	RM AA vs GA/GG	0,89	0,06-14,23	0,932		/			/	
	HM GA vs GG/AA	0,70	0,45-1,10	0,122		/			/	

		Predhipertenzija			KV rizik			KBB rizik		
		OR	**95 % CI**	**P**	**OR**	**95 % CI**	**P**	**OR**	**95 % CI**	**P**
***UMOD* rs13333228**	DM AG/GG vs AA	0,74	0,51-1,06	0,100	0,39	0,09-1,76	0,222	1,18	0,21-6,51	0,852
	RM GG vs AG/AA	0,61	0,19-1,93	0,397		/			/	
	HM AG vs GG/AA	0,77	0,53-1,11	0,160	0,44	0,1-1,97	0,283	1,34	0,24-7,39	0,740
***ACE* rs4646994**	DM ID/II vs DD	1,41	0,97-2,07	0,075	3,61	0,46-28,22	0,222	1,66	0,19-14,38	0,645
	RM II vs ID/DD	0,97	0,65-1,43	0,872	0,61	0,13-2,82	0,527	0,62	0,07-5,35	0,662
	HM ID vs II/DD	1,33	0,96-1,86	0,091	2,93	0,78-10,94	0,111	1,95	0,35-10,78	0,442

Kratice: OR; omjer izgleda; 95 % CI; 95 %-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda; KV; kardiovaskularni; KBB; kronična bubrežna bolest; P; razina statističke značajnosti; DM; dominantni genski model; RM; recesivni genski model; HM; heterozigotni genski model

5.3. Ostali određivani parametri

Osim polimorfizama gena, svim ispitanicima određeni su antropometrijski, klinički, biokemijski, te okolišni parametri opisani u poglavlju 5.1.

Tablica 5.4. prikazuje kvantitativnu povezanost svih određivanih parametara s predhipertenzijom, KV i KBB rizikom (KV i KBB rizik su za potrebe korelacije izraženi u obliku kontinuiranih varijabli).

Spearmanova korelacija je za predhipertenziju pokazala niske koeficijente korelacija tj. slabu povezanost sa spolom (R -0,29; P < 0,001), tjelesnom visinom (R 0,23; P < 0,001) i TM (R 0,331; P < 0,001), opsegom struka (R 0,26; P 0,001), ITM (R 0,24; P < 0,001), te koncentracijom kreatinina u serumu (R 0,22; P < 0,001).

Za KV rizik korelacija je pokazala slabu povezanost s TM (R 0,27; P < 0,001), opsegom struka (R 0,36; P < 0,001), ITM (R 0,30; P < 0,001); DAT (R 0,26; P < 0,001), predhipertenzijom (R 0,31; P < 0,001) i rizikom od razvoja metaboličkih komplikacija debljine (R 0,24; P < 0,001), koncentracijom triglicerida (R 0,41; P < 0,001), eGFR (R -0,30; P < 0,001), omjerom alfa-1-mikroglobulina i kreatinina u mokraći (R 0,26; P < 0,001). Umjereno do dobra povezanost s višim koeficijentom korelacije nađena je jedino s koncentracijom LDL-kolesterola (R 0,57; P < 0,001).

Rizik za razvoj KBB je prikazan preko dva parametra, eGFR i ACR. KBB rizik izražen preko eGFR je slabo povezan s KV rizikom (R -0,30; P < 0,001) i koncentracijom kolesterola (R -0,21; P < 0,001), dok je KBB rizik izražen preko ACR slabo povezan sa spolom (R 0,31; P < 0,001) i tjelesnom visinom (R -0,24; P < 0,001)

Nakon ovih analiza provedena je univarijatna logistička regresija i univarijatna logistička regresija prilagođena na učinke dobi i spola.

U tablici 5.5a su prikazani izgledi uzročno-posljedičnih odnosa za predhipertenziju i svih određenih antropometrijskih, kliničkih, biokemijskih, te okolišnih parametara. Izgled za predhipertenziju je 0,29 puta manji za žene u odnosu na muškarce (OR 0,29; 95 % CI 0,21-0,41; P < 0,001); 1,03 puta veći u ispitanika s većom TM (OR 1,03 %; 95 % CI 1,01-1,04; P < 0,001), 1,03 puta veći u ispitanika s većim opsegom struka (OR 1,03 %; 95 % CI 1,01-1,04; P = 0,001), 1,09 puta veći u ispitanika s većim ITM (OR 1,09 %; 95 % CI 1,04-1,13; P < 0,001), 13,24 puta veći u ispitanika s prekomjernom TM (OR 13,24 %; 95 % CI 1,66-105,72; P = 0,015), 20,41 puta veći u ispitanika s debljinom (OR 20,41 %; 95 % CI 2,47-168,57; P = 0,005), 1,02 puta veći u ispitanika s većom frekvencijom srca (OR 1,02 %; 95 % CI 1,00-1,04; P = 0,028), 1,85 puta veći u skupini visokoga rizika od razvoja metaboličkih komplikacija debljine u odnosu na nizak rizik (OR 1,85; 95 % CI 1,19-2,89; P = 0,007); 1,83 puta veći s većom koncentracijom glukoze (OR 1,83; 95 % CI 1,27-2,63; P < 0,001), 1,20 puta veći s većom koncentracijom CRP (OR 1,20;

95 % CI 1,04-1,38; P = 0,012), 1,25 puta veći s većom koncentracijom ukupnoga kolesterola (OR 1,25; 95 % CI 1,05-1,50; P = 0,015), te 1,27 puta veći s većom koncentracijom LDL-kolesterola (OR 1,27; 95 % CI 1,03-1,56; P = 0,025). Za heterozigotan genotip *ADIPOQ* rs266729 (OR 0,67; 95 % CI 0,47-0,97; P = 0,034) je uočen 0,67 puta manji izgled za predhipertenziju.

Izgledi uzročno-posljedičnih odnosa za KV rizik s obzirom na sve određene antropometrijske, kliničke, biokemijske, te okolišne parametre su prikazani u tablici 5.5b. Regresija je provedena za KV rizik izražen i kao postotak tj. kontinuirana varijabla i kao kategorijska varijabla (nizak i umjeren rizik). Za kontinuiranu varijablu je provedena univarijatna linearna regresija i zapažena je značajna pozitivna povezanost sa sljedećih parametrima: TM (β 0,04; SE 0,01; P < 0,001), opsegom struka (β 0,04; SE 0,01; P < 0,001), ITM (β 0,14; SE 0,03; P < 0,001), prekomjernom TM i debljinom tj. kategorijama ITM (β 2,11 i 2,71; SE 0,9 i 0,93; P = 0,019 i 0,004), predhipertenzijom (β 1,57; SE 0,25; P < 0,001), koncentracijom kreatinina u serumu (β 0,05; SE 0,01; P < 0,001), koncentracijom glukoze na tašte (β 1,83; SE 0,24; P < 0,001), koncentracijom CRP (β 0,24; SE 0,10; P = 0,021), koncentracijom LDL – kolesterola (β 1,46; SE 0,13; P < 0,001) i triglicerida (β 1,40; SE 0,13; P < 0,001) te omjera alfa-1-mikroglobulina i kreatinina u mokraći (β 0,06; SE 0,03; P = 0,040). Za eGFR je uočena negativna značajna povezanost (β -0,05; SE 0,01; P < 0,001). Univarijatna logistička regresija provedena je za kategorije KV rizika (nizak i umjeren) te je osim pozitivnih omjera tj. većih izgleda za gore navedene parametre (izuzev kategorija ITM, frekvencije srca, koncentracije CRP i omjera alfa-1-mikroglobulina i kreatinina u mokraći) pokazala i 3,86 puta veći izgled za nositelje heterozigotnog genotipa rs2004776 *AGT* (OR 3,86; 95 % CI 1,05-14,2; P = 0,042).

Univarijatna linearna regresija i univarijatna linearna regresija prilagođena na učinke dobi i spola provedena je za KBB rizik s obzirom na sve određene antropometrijske, kliničke, biokemijske, te okolišne parametre. Rezultati za KBB rizik izražen putem eGFR su prikazani u tablici 5.5c1. Zapažena je značajna negativna povezanost sa sljedećih parametrima: SAT (β -0,11; SE 0,06; P = 0,047, skupina bivših pušača (β -6,11; SE 2,39; P = 0,011) i koncentracijom kreatinina u porciji (β -0,33; SE 0,09; P < 0,001. Rezultati za KBB rizik izražen putem ACR prikazani su u tablici 5.5c2. Zapažena je značajna povezanost sa sljedeća dva parametra: skupina umjerenog rizika od razvoja metaboličkih komplikacija debljine (β -1,82; SE 0,81; P = 0,024) i skupina umjerenog KV rizika (β 5,83; SE 2,22; P = 0,009).

Za umjeren KBB rizik provedena je univarijatna logistička regresija i univarijatna logistička regresija prilagođena na učinke dobi i spola (tablica 5.5c3). Značajan je 0,11 i 0,10 puta manji izgled KBB rizika za heterozigotne i homozigotne nositelje alela *C* rs1801253 *ADRB1* (95 % CI 0,01-0,88 i 0,01-0,74; P = 0,037 i 0,024).

Tablica 5.4. Korelacija ostalih određivanih parametara s predhipertenzijom, kardiovaskularnim i renalnim rizikom

	Predhipertenzija		**KV rizik (%)**		**KBB rizik (eGFR)**		**KBB rizik (ACR)**	
	R	**P***	**R**	**P***	**R**	**P***	**R**	**P***
spol	-0,29	**<0,001**	/	/	/	/	0,31	**<0,001**
dob (godine)	0,07	0,082	/	/	/	/	0,08	0,106
antropometrijski i klinički parametri								
tjelesna visina (cm)	0,23	**<0,001**	0,07	0,116	0,10	**0,028**	-0,24	**<0,001**
tjelesna masa (kg)	0,31	**<0,001**	0,27	**<0,001**	-0,01	0,776	-0,20	**<0,001**
opseg struka (cm)	0,26	**<0,001**	0,36	**<0,001**	-0,02	0,682	-0,13	**0,005**
ITM (kg/m^2)	0,24	**<0,001**	0,30	**<0,001**	-0,10	**0,034**	-0,10	**0,035**
frekvencija srca (otkucaji/min)	0,07	0,134	-0,08	0,076	0,06	0,164	0,00	0,929
sistolički AT (mmHg)	/	/	/	/	-0,04	0,378	-0,08	0,086
dijastolički AT (mmHg)	/	/	0,26	**<0,001**	-0,10	**0,034**	-0,03	0,487
klasifikacija AT	/	/	0,31	**<0,001**	-0,05	0,307	-0,04	0,413
rizik od razvoja metaboličkih komplikacija debljine	0,09	**0,026**	0,24	**<0,001**	-0,10	**0,039**	0,05	0,322
KV rizik (%)	/	/	/	/	-0,30	**<0,001**	-0,01	0,761
okolišni parametri								
cigarete	-0,05	0,232	/	/	-0,01	0,883	-0,01	0,788
alkohol	0,18	0,053	0,01	0,947	0,15	0,110	-0,08	0,427
socijalni status	0,08	0,120	0,09	0,067	0,11	**0,038**	-0,14	**0,007**
biokemijski parametri								
kreatinin u serumu (μmol/L)	0,22	**<0,001**	0,14	**0,003**	/	/	/	/
glukoza na tašte (mmol/L)	0,17	**<0,001**	0,16	**<0,001**	-0,08	0,077	-0,08	0,103
CRP (mg/L)	0,13	**0,004**	0,21	**<0,001**	-0,06	0,214	-0,02	0,760
kolesterol ukupni (mmol/L)	0,12	**0,005**	/	/	-0,21	**<0,001**	0,07	0,125
HDL-kolesterol (mmol/L)	-0,07	0,098	/	/	-0,07	0,143	0,19	**<0,001**
LDL-kolesterol (mmol/L)	0,12	**0,004**	0,57	**<0,001**	-0,19	**<0,001**	0,06	0,223

	Predhipertenzija		KV rizik (%)		KBB rizik (eGFR)		KBB rizik (ACR)	
	R	**P***	**R**	**P***	**R**	**P***	**R**	**P***
trigliceridi (mmol/L)	0,14	**<0,001**	0,41	**<0,001**	-0,11	**0,016**	-0,09	**0,044**
eGFR (mL/min/1,73m^2)	-0,05	0,307	-0,30	**<0,001**	/	/	-0,03	0,490
albumin porcija (mg/L)	0,02	0,699	0,01	0,769	0,06	0,232	/	/
kreatinin porcija (mmol/L)	0,02	0,740	-0,06	0,232	-0,08	0,106	/	/
ACR(mg/g)	-0,04	0,413	-0,01	0,761	-0,03	0,490	/	/
A1MCr (mg/g)	0,01	0,917	0,26	**<0,001**	-0,08	0,169	-0,01	0,809

Kratice: R, koeficijent korelacije; *P vrijednost Spearmanove korelacije; A1MCR, omjer alfa-1-mikroglobulina i kreatinina u mokraći; ACR, omjer albumina i kreatinina u mokraći; AT, arterijski tlak; CRP, C-reaktivni protein; eGFR, procjena glomerularne filtracije prema CKD-EPI; IQR, interkvartalni raspon; ITM, indeks tjelesne mase; KBB, kronična bubrežna bolest; KV, kardiovaskularni

Tablica 5.5a. Povezanost određivanih parametara i predhipertenzije

		Univarijatna logistička regresija			Univarijatna logistička regresija prilagođena na učinke dobi i spola		
		OR	**95 % CI**	**P**	**OR**	**95 % CI**	**P**
spol	Muškarci	1				/	
	Žene	0,29	0,21-0,41	**<0,001**			
dob (godine)		1,02	1,00-1,04	0,093		/	
antropometrijski i klinički parametri							
tjelesna visina (cm)		1,05	1,03-1,07	**<0,001**	1,01	0,99-1,04	0,406
tjelesna masa (kg)		1,04	1,03-1,06	**<0,001**	1,03	1,01-1,04	**<0,001**
opseg struka (cm)		1,04	1,03-1,06	**<0,001**	1,03	1,01-1,04	**0,001**
ITM (kg/m^2)		1,11	1,06-1,15	**<0,001**	1,09	1,04-1,13	**<0,001**
kategorije ITM	nedovoljna TM	1			1		
	optimalna TM	10,57	1,37-81,69	**0,024**	8,31	1,05-65,78	**0,045**
	prekomjerna TM	19,50	2,51-151,72	**0,005**	13,24	1,66-105,72	**0,015**
	debljina	29,50	3,67-236,9	**0,001**	20,41	2,47-168,57	**0,005**
frekvencija srca (otkucaji/min)		1,01	1,00-1,03	0,123	1,02	1,00-1,04	**0,028**
rizik od razvoja metaboličkih komplikacija debljine	nema	1			1		
	umjeren	1,67	1,12-2,49	**0,011**	1,84	1,19-2,84	**0,006**
	vrlo visok	1,46	0,97-2,18	0,069	1,85	1,19-2,89	**0,007**
kategorije KBB rizika	nizak	1			1		
	umjeren	1,77	0,32-9,74	0,514	1,83	0,31-10,72	0,502
okolišni parametri							
cigarete	nepušač	1			1		
	bivši pušač	1,65	0,79-3,43	0,180	1,61	0,75-3,48	0,222
	pušač	0,79	0,55-1,12	0,188	0,77	0,53-1,12	0,170
alkohol	ne konzumira	1			1		
	≤ 2 dL/dan	1,91	0,83-4,4	0,129	1,52	0,63-3,66	0,351
	> 2 dL/dan	2,75	0,52-14,59	0,235	2,13	0,37-12,09	0,395
	> 5 dL/dan	/	/	/	/	/	/

		Univarijatna logistička regresija			Univarijatna logistička regresija prilagođena na učinke dobi i spola		
		OR	**95 % CI**	**P**	**OR**	**95 % CI**	**P**
socijalni status (€/god)	0 – 500	1			1		
	501 – 1500	0,51	0,12-2,13	0,359	0,33	0,07-1,48	0,148
	1501 – 3000	0,25	0,10-0,64	**0,004**	0,23	0,09-0,61	**0,003**
	3001 – 5000	0,52	0,22-1,26	0,150	0,47	0,19-1,16	0,103
	5000 – 10000	0,60	0,26-1,42	0,247	0,46	0,19-1,11	0,086
	> 10000	0,73	0,28-1,90	0,524	0,49	0,18-1,32	0,160
biokemijski parametri							
kreatinin u serumu (μmol/L		1,04	1,02-1,06	**<0,001**	1,02	1,00-1,04	0,089
glukoza na tašte (mmol/L)		2,07	1,46-2,94	**<0,001**	1,83	1,27-2,63	**0,001**
CRP (mg/L)		1,20	1,05-1,38	**0,006**	1,20	1,04-1,38	**0,012**
kolesterol ukupni (mmol/L)		1,27	1,09-1,48	**0,003**	1,25	1,05-1,50	**0,015**
HDL-kolesterol (mmol/L)		0,70	0,44-1,11	0,133	1,12	0,67-1,86	0,671
LDL-kolesterol (mmol/L)		1,33	1,10-1,59	**0,003**	1,27	1,03-1,56	**0,025**
trigliceridi (mmol/L)		1,36	1,10-1,67	**0,004**	1,15	0,93-1,42	0,191
eGFR (mL/min/1,73m^2)		0,99	0,98-1,01	0,302	0,99	0,97-1,00	0,137
albumin porcija (mg/L)		1	0,99-1,01	0,426	1	0,99-1,01	0,484
kreatinin porcija (mmol/L)		1,01	0,98-1,03	0,691	1	0,97-1,03	0,939
ACR (mg/g)		0,99	0,97-1,02	0,494	1	0,97-1,02	0,765
A1MCr (mg/g)		1	0,96-1,05	0,972	1,01	0,96-1,06	0,708
genski polimorfizmi							
AGT (rs2004776)	*CC*	1			1		
	CT	1,15	0,82-1,62	0,406	1,19	0,83-1,69	0,347
	TT	1,36	0,70-2,65	0,360	1,46	0,73-2,93	0,289
AGTR1 (rs5186)	*AA*	1			1		
	AC	0,93	0,66-1,30	0,657	0,95	0,66-1,35	0,758
	CC	0,91	0,47-1,77	0,783	1	0,50-2,02	0,994
ADRB1 (rs1801253)	*GG*	1			1		
	CG	0,7	0,33-1,48	0,354	0,71	0,33-1,53	0,380

		Univarijatna logistička regresija			Univarijatna logistička regresija prilagođena na učinke dobi i spola		
		OR	**95 % CI**	**P**	**OR**	**95 % CI**	**P**
	CC	0,83	0,4-1,74	0,624	0,89	0,41-1,91	0,760
ADIPOQ (rs266729)	*CC*	1			1		
	CG	0,68	0,48-0,96	**0,030**	0,67	0,47-0,97	**0,034**
	GG	1,28	0,68-2,40	0,448	1,34	0,69-2,58	0,384
ADIPOQ (rs17300539)	*GG*	1			1		
	GA	0,7	0,44-1,1	0,122	0,74	0,46-1,2	0,222
	AA	0,84	0,05-13,44	0,899	1,55	0,1-25,04	0,759
UMOD (rs13333228)	*AA*	1			1		
	AG	0,75	0,52-1,09	0,136	0,72	0,49-1,07	0,107
	GG	0,56	0,17-1,79	0,329	0,63	0,18-2,16	0,458
ACE (rs4646994)	*II*	1,26	0,79-2,03	0,336	1,15	0,70-1,89	0,585
	ID	1,49	1,00-2,23	0,053	1,38	0,91-2,10	0,134
	DD	1			1		

Kratice: OR, omjer izgleda, 95 % CI, 95 %-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda, P, razina statističke značajnosti, / – model ne konvergira (nedovoljan broj ispitanika); A1MCR, omjer alfa-1-mikroglobulina i kreatinina u mokraći; ACR, omjer albumina i kreatinina u mokraći; CRP, C-reaktivni protein; eGFR, procjena glomerularne filtracije prema CKD-EPI; ITM, indeks tjelesne mase; KBB, kronična bubrežna bolest; KV, kardiovaskularni; TM, tjelesna masa.

Tablica 5.5b. Učinak određivanih čimbenika na kardiovaskularni rizik

		Univarijatna linearna regresija (KV rizik, %)			Univarijatna logistička regresija (KV rizik, kategorije)		
		β	**SE**	**P**	**OR**	**95 % CI**	**P**
antropometrijski i klinički parametri							
tjelesna visina (cm)		0,03	0,01	**0,033**	1,05	1,00-1,11	0,071
tjelesna masa (kg)		0,04	0,01	**<0,001**	1,04	1,01-1,07	**0,005**
opseg struka (cm)		0,06	0,01	**<0,001**	1,05	1,01-1,09	**0,007**
ITM (kg/m^2)		0,14	0,03	**<0,001**	1,09	1,00-1,20	**0,047**
kategorije ITM	nedovoljna TM	0					
	optimalna TM	1,22	0,89	0,171		/	
	prekomjerna TM	2,11	0,90	**0,019**			
	debljina	2,71	0,93	**0,004**			
frekvencija srca (otkucaji/min)		-0,02	0,01	0,191	0,95	0,90-1,01	0,105
dijastolički AT (mmHg)		0,09	0,02	**<0,001**	1,10	1,02-1,20	**0,015**
klasifikacija AT	NMT	0			1		
	PHT	1,57	0,25	**<0,001**	12,74	1,66-97,62	**0,014**
rizik od razvoja metaboličkih komplikacija debljine	nema	0			1		
	umjeren	1,15	0,30	**<0,001**	2,47	0,68-8,90	0,168
	vrlo visok	0,87	0,31	**0,005**	1,76	0,43-7,15	0,430
kategorije KBB rizika	nizak	0			1		
	umjeren	0,95	1,29	0,462	6,25	0,68-57,33	0,105
okolišni parametri							
alkohol	ne konzumira	0					
	≤ 2 dL/dan	0,87	0,68	0,207		/	
	> 2 dL/dan	-0,72	1,23	0,557			
	> 5 dL/dan	-0,86	3,30	0,795			

		Univarijatna linearna regresija (KV rizik, %)			Univarijatna logistička regresija (KV rizik, kategorije)		
		β	**SE**	**P**	**OR**	**95 % CI**	**P**
socijalni status (€/god)	0 – 500	0					
	501 – 1500	2,22	1,21	0,067			
	1501 – 3000	0,50	0,76	0,508		/	
	3001 – 5000	1,36	0,71	0,057			
	5000 – 10000	1	0,68	0,144			
	> 10000	1,09	0,76	0,150			
biokemijski parametri							
kreatinin u serumu (μmol/L)		0,05	0,01	**<0,001**	1,08	1,04-1,13	**<0,001**
glukoza na tašte (mmol/L)		1,83	0,24	**<0,001**	8,07	3,64-17,88	**<0,001**
CRP (mg/L)		0,24	0,10	**0,021**	1,19	0,84-1,68	0,323
LDL-kolesterol (mmol/L)		1,46	0,13	**<0,001**	3,88	2,22-6,78	**<0,001**
trigliceridi (mmol/L)		1,40	0,13	**<0,001**	1,85	1,35-2,52	**<0,001**
eGFR (mL/min/1,73m^2)		-0,05	0,01	**<0,001**	0,96	0,93-1,00	**0,046**
ACR (mg/g)		0,02	0,02	0,410	1,03	1,00-1,07	0,056
A1MCr(mg/g)		0,06	0,03	**0,040**	0,97	0,79-1,20	0,803
genski polimorfizmi							
AGT (rs2004776)	*CC*	0			1		
	CT	0,05	0,27	0,868	3,86	1,05-14,20	**0,042**
	TT	0,25	0,56	0,651	2,69	0,27-26,64	0,398
AGTR1 (rs5186)	*AA*	0			1		
	AC	-0,46	0,27	0,088	0,43	0,11-1,61	0,209
	CC	-0,33	0,53	0,531	0,85	0,10-6,89	0,876
ADRB1 (rs1801253)	*GG*	0				/	
	CG	0,33	0,58	0,573			

		Univarijatna linearna regresija (KV rizik, %)			Univarijatna logistička regresija (KV rizik, kategorije)		
		β	**SE**	**P**	**OR**	**95 % CI**	**P**
	CC	0,19	0,58	0,741			
ADIPOQ (rs266729)	*CC*	0			1		
	CG	-0,41	0,27	0,123	0,38	0,10-1,40	0,145
	GG	-0,29	0,50	0,564	0,72	0,09-5,87	0,761
ADIPOQ (rs17300539)	*GG*	0					
	GA	-0,44	0,36	0,220		/	
	AA	-1,64	2,02	0,416			
UMOD (rs13333228)	*AA*	0			1		
	AG	-0,19	0,31	0,544	0,43	0,09-1,91	0,266
	GG	-0,47	0,93	0,614	/	/	/
ACE (rs4646994)	*II*	0,06	0,36	0,878	2	0,18-22,35	0,574
	ID	0,33	0,31	0,292	4,39	0,55-35,05	0,163
	DD	0			1		

Kratice: β, regresijski koeficijent; SE, standardna greška; P, razina statističke značajnosti; / – model ne konvergira (nedovoljan broj ispitanika); OR, omjer izgleda; 95 % CI, 95 %-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda; A1MCR, omjer alfa-1-mikroglobulina i kreatinina u mokraći; ACR, omjer albumina i kreatinina u mokraći; AT, arterijski tlak; CRP, C-reaktivni protein; eGFR, procjena glomerularne filtracije prema CKD-EPI; ITM, indeks tjelesne mase; KBB, kronična bubrežna bolest; KV, kardiovaskularni; NMT, normotenzija; PHT, predhipertezija; TM, tjelesna masa.

Tablica 5.5c1. Učinak određivanih čimbenika na renalni rizik (prema eGFR)

		Univarijatna linearna regresija			Univarijatna linearna regresija prilagođena na učinke dobi i spola		
		β	**SE**	**P**	**β**	**SE**	**P**
antropometrijski i klinički parametri							
tjelesna visina (cm)		0,16	0,07	**0,015**	-0,12	0,08	0,152
tjelesna masa (kg)		0,01	0,04	0,825	-0,04	0,04	0,302
opseg struka (cm)		0	0,05	0,978	0,03	0,05	0,596
ITM (kg/m^2)		-0,18	0,14	0,197	-0,06	0,12	0,633
kategorije ITM	nedovoljna TM	0			0		
	optimalna TM	-2,90	4,12	0,482	-1,43	3,75	0,702
	prekomjerna TM	-3,91	4,15	0,346	-1,79	3,79	0,637
	debljina	-6,04	4,31	0,162	-3,17	3,94	0,422
frekvencija srca (otkucaji/min)		0,10	0,06	0,079	0,03	0,05	0,610
sistolički AT (mmHg)		-0,04	0,06	0,480	-0,11	0,06	**0,047**
dijastolički AT (mmHg)		-0,16	0,08	**0,044**	-0,05	0,07	0,462
klasifikacija AT	NMT	0			0		
	PHT	-1,32	1,28	0,303	-1,79	1,20	0,138
rizik od razvoja metaboličkih komplikacija debljine	nema	0			0		
	umjeren	-3,33	1,53	**0,030**	-0,07	1,45	0,963
	vrlo visok	-2,70	1,56	0,084	0,95	1,49	0,524
KV rizik (%)		-0,92	0,21	**<0,001**	-0,15	0,26	0,559
kategorije KV rizika	nizak	0			0		
	umjeren	-7,70	3,79	**0,043**	-4,12	3,61	0,254
okolišni parametri							
cigarete	nepušač	0			0		
	bivši pušač	-5,87	2,64	**0,027**	-6,11	2,39	**0,011**
	pušač	-0,06	1,40	0,968	0,59	1,27	0,644

		Univarijatna linearna regresija			Univarijatna linearna regresija prilagođena na učinke dobi i spola		
		β	**SE**	**P**	**β**	**SE**	**P**
alkohol	ne konzumira	0			0		
	≤ 2 dL/dan	4,04	2,78	0,149	2,54	2,63	0,337
	> 2 dL/dan	3,95	4,99	0,430	1,04	4,64	0,824
	> 5 dL/dan	23,33	13,44	0,086	16,61	12,44	0,185
socijalni status (€/god)	0 – 500	0			0		
	501 – 1500	0,94	4,87	0,846	5,46	4,49	0,225
	1501 – 3000	4,37	3,10	0,159	6,63	2,84	**0,020**
	3001 – 5000	2,37	2,92	0,416	4,49	2,67	0,093
	5000 – 10000	7,18	2,79	**0,011**	8,06	2,57	**0,002**
	> 10000	3,78	3,13	0,228	4,72	2,89	0,103
biokemijski parametri							
glukoza na tašte (mmol/L)		-2,09	1,14	0,068	-1,32	1,06	0,212
CRP (mg/L)		-0,50	0,51	0,331	-0,05	0,45	0,912
kolesterol ukupni (mmol/L)		-2,45	0,60	**<0,001**	-0,30	0,60	0,622
HDL-kolesterol (mmol/L)		-1,99	1,78	0,265	1,41	1,67	0,400
LDL-kolesterol (mmol/L)		-2,69	0,71	**<0,001**	-0,40	0,70	0,567
trigliceridi (mmol/L)		-1,44	0,70	**0,039**	-1,02	0,65	0,116
albumin porcija (mg/L)		-0,01	0,03	0,742	-0,01	0,03	0,752
kreatinin porcija (mmol/L)		-0,14	0,10	0,158	-0,33	0,09	**<0,001**
ACR (mg/g)		-0,06	0,08	0,504	0,02	0,08	0,757
A1MCr (mg/g)		-0,23	0,16	0,165	-0,01	0,15	0,932
genski polimorfizmi							
AGT (rs2004776)	*CC*	0			0		
	CT	-0,69	1,34	0,606	-0,89	1,22	0,463
	TT	-1,38	2,66	0,603	-2,29	2,41	0,342
AGTR1 (rs5186)	*AA*	0			0		
	AC	1,49	1,35	0,272	0,25	1,24	0,839
	CC	-2,38	2,68	0,376	-1,89	2,44	0,439

		Univarijatna linearna regresija			Univarijatna linearna regresija prilagođena na učinke dobi i spola		
		β	**SE**	**P**	**β**	**SE**	**P**
ADRB1 (rs1801253)	*GG*	0			0		
	CG	3,49	2,96	0,240	3,98	2,68	0,139
	CC	2,94	2,92	0,315	2,52	2,65	0,342
*ADIPOQ*_1 (rs266729)	*CC*	0			0		
	CG	1,05	1,37	0,445	1,19	1,26	0,343
	GG	-2,41	2,41	0,318	-1,48	2,21	0,503
*ADIPOQ*_2 (rs17300539)	*GG*	0			0		
	GA	3,46	1,97	0,079	3,42	1,81	0,060
	AA	10,35	13,66	0,449	11,15	12,54	0,374
UMOD (rs13333228)	*AA*	0			0		
	AG	0,04	1,49	0,976	-0,08	1,35	0,956
	GG	0,36	4,26	0,932	0,15	3,87	0,970
ACE (rs4646994)	*II*	-0,66	1,87	0,725	-1,28	1,7	0,452
	ID	-1,42	1,61	0,378	-1,62	1,47	0,270
	DD	0			0		

Kratice: β, regresijski koeficijent; SE, standardna greška; P, razina statističke značajnosti; A1MCR, omjer alfa-1-mikroglobulina i kreatinina u mokraći; ACR, omjer albumina i kreatinina u mokraći; AT, arterijski tlak; CRP, C-reaktivni protein; eGFR, procjena glomerularne filtracije prema CKD-EPI; ITM, indeks tjelesne mase; KBB, kronična bubrežna bolest; KV, kardiovaskularni; NMT, normotenzija; PHT, predhipertezija; TM, tjelesna masa.

Tablica 5.5c2. Učinak određivanih čimbenika na renalni rizik (prema ACR)

		Univarijatna linearna regresija			Univarijatna linearna regresija prilagođena na učinke dobi i spola		
		β	**SE**	**P**	**β**	**SE**	**P**
spol	muškarci	0				/	
	žene	1,58	0,71	**0,027**			
dob (godine)		0,07	0,04	0,121		/	
antropometrijski i klinički parametri							
tjelesna visina (cm)		-0,05	0,04	0,181	0,02	0,05	0,704
tjelesna masa (kg)		-0,02	0,02	0,303	0	0,03	0,909
opseg struka (cm)		-0,03	0,03	0,290	-0,01	0,03	0,613
ITM		-0,02	0,08	0,821	-0,01	0,08	0,854
kategorije ITM	nedovoljna TM	0			0		
	optimalna TM	-1,56	2,28	0,495	-1,51	2,28	0,510
	prekomjerna TM	-2,10	2,30	0,362	-2,02	2,31	0,384
	debljina	-1,32	2,40	0,583	-1,25	2,41	0,605
frekvencija srca (otkucaji/min)		-0,01	0,03	0,747	-0,01	0,03	0,810
sistolički AT (mmHg)		-0,05	0,03	0,149	-0,03	0,04	0,401
dijastolički AT (mmHg)		-0,06	0,04	0,155	-0,07	0,05	0,106
klasifikacija AT	NMT	0			0		
	PHT	-0,49	0,71	0,489	-0,22	0,73	0,768
rizik od razvoja metaboličkih komplikacija debljine	nema	0			0		
	umjeren	-1,20	0,79	0,131	-1,82	0,81	**0,024**
	vrlo visok	-0,25	0,82	0,759	-1,16	0,84	0,167
KV rizik (%)		0,1	0,12	0,410	0,13	0,16	0,419
kategorije KV rizika	nizak	0			0		

		Univarijatna linearna regresija			Univarijatna linearna regresija prilagođena na učinke dobi i spola		
		β	**SE**	**P**	**β**	**SE**	**P**
	umjeren	4,96	2,13	**0,020**	5,83	2,22	**0,009**
				okolišni parametri			
cigarete	nepušač	0			0		
	bivši pušač	-0,66	1,48	0,654	-0,57	1,48	0,698
	pušač	0,25	0,81	0,759	0,18	0,80	0,825
alkohol	ne konzumira	0			0		
	≤ 2 dL/dan	-1,46	2,22	0,512	-0,74	2,26	0,743
	> 2 dL/dan	-0,72	4,03	0,859	-0,09	4,05	0,981
	> 5 dL/dan	0,55	10,18	0,957	2,11	10,26	0,838
socijalni status (€/god)	0 – 500	0			0		
	501 – 1500	-0,88	3,01	0,771	-0,83	3,03	0,783
	1501 – 3000	1,56	1,86	0,402	1,27	1,86	0,494
	3001 – 5000	-0,05	1,74	0,976	-0,21	1,74	0,902
	5000 – 10000	0,28	1,68	0,866	0,49	1,68	0,769
	> 10000	3,42	1,89	0,071	3,76	1,9	**0,049**
				biokemijski parametri			
kreatinin u serumu (μmol/L)		-0,05	0,03	0,066	-0,02	0,04	0,574
glukoza na tašte (mmol/L)		0,55	0,64	0,389	0,64	0,65	0,327
CRP (mg/L)		-0,28	0,30	0,349	-0,30	0,30	0,329
kolesterol ukupni (mmol/L)		0,67	0,34	**0,048**	0,56	0,37	0,131
HDL-kolesterol (mmol/L)		0,94	1,01	0,350	0,30	1,04	0,774
LDL-kolesterol (mmol/L)		0,78	0,40	0,052	0,66	0,43	0,126
triglyceridi (mmol/L)		0,03	0,39	0,936	0,09	0,40	0,817
eGFR (mL/min/1,73m^2)		-0,02	0,03	0,504	0,01	0,03	0,757

		Univarijatna linearna regresija			Univarijatna linearna regresija prilagođena na učinke dobi i spola		
		β	**SE**	**P**	**β**	**SE**	**P**
A1MCr (mg/g)		-0,03	0,06	0,624	-0,05	0,06	0,363
		genski polimorfizmi					
AGT (rs2004776)	*CC*	0			0		
	CT	-1,37	0,73	0,062	-1,38	0,73	0,059
	TT	0,57	1,49	0,702	0,60	1,49	0,684
AGTR1 (rs5186)	*AA*	0			0		
	AC	-0,61	0,75	0,418	-0,50	0,75	0,508
	CC	0,96	1,52	0,528	0,84	1,52	0,582
ADRB1 (rs1801253)	*GG*	0			0		
	CG	-2,23	1,63	0,171	-2,23	1,62	0,170
	CC	-2,33	1,61	0,148	-2,3	1,6	0,151
ADIPOQ (rs266729)	*CC*	0			0		
	CG	1,37	0,77	0,078	1,32	0,77	0,087
	GG	0,02	1,38	0,990	-0,05	1,38	0,973
ADIPOQ (rs17300539)	*GG*	0			0		
	GA	-0,72	1,12	0,520	-0,82	1,12	0,464
	AA	-0,29	7,72	0,970	-0,8	7,7	0,918
UMOD (rs13333228)	*AA*	0			0		
	AG	0,81	0,82	0,326	0,82	0,82	0,314
	GG	-0,90	2,25	0,690	-0,89	2,25	0,691
ACE (rs4646994)	*II*	-0,86	1,07	0,423	-0,66	1,07	0,534
	ID	0,06	0,91	0,950	0,21	0,91	0,821
	DD	0			0		

Kratice: β, regresijski koeficijent; SE, standardna greška; P, razina statističke značajnosti; / – model ne konvergira; A1MCR, omjer alfa-1-mikroglobulina i kreatinina u mokraći; ACR, omjer albumina i kreatinina u mokraći; AT, arterijski tlak; CRP, C-reaktivni protein; eGFR, procjena glomerularne filtracije prema CKD-EPI; ITM, indeks tjelesne mase; KBB, kronična bubrežna bolest; KV, kardiovaskularni; NMT, normotenzija; PHT, predhipertezija; TM, tjelesna masa.

Tablica 5.5c3. Učinak određivanih čimbenika na umjereni renalni rizik

		Univarijatna logistička regresija			Univarijatna logistička regresija prilagođena na učinke dobi i spola		
		OR	**95 % CI**	**P**	**OR**	**95 % CI**	**P**
antropometrijski i klinički parametri							
tjelesna visina (cm)		0,98	0,91-1,06	0,651	0,99	0,88-1,11	0,858
tjelesna masa (kg)		0,98	0,93-1,04	0,534	0,98	0,92-1,05	0,541
opseg struka (cm)		0,96	0,89-1,03	0,263	0,95	0,88-1,04	0,258
ITM (kg/m^2)		0,97	0,80-1,17	0,716	0,95	0,78-1,16	0,634
kategorije ITM	nedovoljna TM						
	optimalna TM						
	prekomjerna TM		/			/	
	debljina						
frekvencija srca (otkucaji/min)		0,95	0,87-1,04	0,272	0,96	0,87-1,05	0,329
sistolički AT (mmHg)		0,97	0,90-1,05	0,474	0,97	0,90-1,05	0,500
dijastolički AT (mmHg)		0,98	0,89-1,09	0,766	0,97	0,88-1,08	0,629
klasifikacija AT	NMT	1			1		
	PHT	1,77	0,32-9,74	0,514	1,81	0,31-10,49	0,507
rizik od razvoja metaboličkih komplikacija debljine	nema						
	umjeren		/			/	
	vrlo visok						
KV rizik (%)		1,06	0,90-1,25	0,469	1,03	0,80-1,32	0,826
kategorije KV rizika	nizak	1			1		
	umjeren	6,25	0,68-57,33	0,105	8,34	0,43-162,49	0,162
okolišni parametri							
cigarete	nepušač						
	bivši pušač		/			/	
	pušač						

		Univarijatna logistička regresija			Univarijatna logistička regresija prilagođena na učinke dobi i spola		
		OR	**95 % CI**	**P**	**OR**	**95 % CI**	**P**
alkohol	ne konzumira						
	≤ 2 dL/dan		/			/	
	> 2 dL/dan						
	> 5 dL/dan						
socijalni status (€/god)	0 – 500						
	501 – 1500						
	1501 – 3000		/			/	
	3001 – 5000						
	5000 – 10000						
	> 10000						
biokemijski parametri							
glukoza na tašte (mmol/L)		1,37	0,36-5,21	0,645	1,25	0,33-4,76	0,749
CRP (mg/L)		0,64	0,25-1,62	0,346	0,61	0,23-1,59	0,309
kolesterol ukupni (mmol/L)		1,22	0,58-2,57	0,595	1,04	0,45-2,44	0,921
HDL-kolesterol (mmol/L)		0,68	0,06-7,19	0,746	0,50	0,04-6,19	0,591
LDL-kolesterol (mmol/L)		1,38	0,59-3,25	0,458	1,20	0,46-3,10	0,709
trigliceridi (mmol/L)		0,86	0,30-2,46	0,783	0,79	0,24-2,53	0,689
A1MCr (mg/g)		1,08	0,93-1,26	0,329	1,06	0,91-1,24	0,429
Genski polimorfizmi							
AGT (rs2004776)	*CC*	1			1		
	CT	0,73	0,12-4,42	0,733	0,74	0,12-4,47	0,740
	TT	2,65	0,27-26,43	0,405	2,97	0,29-30,10	0,357
AGTR1 (rs5186)	*AA*	1			1		
	AC	0,88	0,14-5,30	0,886	0,98	0,16-5,97	0,980
	CC	2,84	0,29-28,27	0,373	2,90	0,29-29,24	0,366
ADRB1 (rs1801253)	*GG*	1			1		
	CG	0,13	0,02-0,93	**0,043**	0,11	0,01-0,88	**0,037**

		Univarijatna logistička regresija			Univarijatna logistička regresija prilagođena na učinke dobi i spola		
		OR	**95 % CI**	**P**	**OR**	**95 % CI**	**P**
	CC	0,10	0,01-0,72	**0,023**	0,10	0,01-0,74	**0,024**
ADIPOQ (rs266729)	*CC*	1			1		
	CG	2,42	0,44-13,35	0,312	2,44	0,44-13,54	0,309
	GG	/	/	/	/	/	/
ADIPOQ (rs17300539)	*GG*						
	GA		/			/	
	AA						
UMOD (rs13333228)	*AA*	1			1		
	AG	1,29	0,23-7,13	0,771	1,31	0,24-7,27	0,759
	GG	/	/	/	/	/	/
ACE (rs4646994)	*II*	1,02	0,06-16,52	0,989	1,09	0,07-17,92	0,950
	ID	1,97	0,22-17,86	0,546	1,96	0,21-17,91	0,551
	DD	1			1		

Kratice: P, razina statističke značajnosti; / – model ne konvergira (nedovoljan broj ispitanika); OR, omjer izgleda; 95 % CI, 95 %-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda; A1MCR, omjer alfa-1-mikroglobulina i kreatinina u mokraći; AT, arterijski tlak; CRP, C-reaktivni protein; ITM, indeks tjelesne mase; KBB, kronična bubrežna bolest; KV, kardiovaskularni; NMT, normotenzija; PHT, predhipertezija; TM, tjelesna masa.

5.4. Interakcija genskih varijanti s ostalim određivanim parametrima

Budući da etiologija AH i predhipertenzije uključuje međusobnu interakciju gena i vanjskih čimbenika tj. ostalih određivanih parametara napravljena je univarijatna linearna regresija povezanosti genskih polimorfizama sa svim ostalim određivanim parametrima koja je ukazala na značajne povezanosti pojedinih polimorfizama istraživanih gena s antropometrijskim, kliničkim, biokemijskim kao i okolišnim parametrima, rezultati su prikazani u tablici 5.6.

Uočena je značajna negativna povezanost alela *T* rs5186 *AGTR1* s dobi (β -1,05; SE 0,52; P < 0,05) te značajna pozitivna povezanost alela *C* rs1801253 *ADRB1* s koncentracijom albumina u porciji (β 4,15; SE 1,93; P < 0,05) i omjerom alfa-1-mikroglobulina i kreatinina u mokraći (β 1,47; SE 0,55; P < 0,05). Za alel *G* rs266729 *ADIPOQ* nađena je negativna povezanost s CRP (β -0,20; SE 0,10; P < 0,05), a pozitivna povezanost s koncentracijom HDL – kolesterola (β 0,06; SE 0,02; P < 0,05). Alel *A* rs17300539 *ADIPOQ* je značajno pozitivno povezan s tjelesnom masom (β 5,43; SE 1,84; P < 0,05), opsegom struka (β 4,94; SE 1,43; P < 0,05), ITM (β 1,65; SE 0,51; P < 0,05), a negativno je povezan sa SAT (β -2,42; SE 1,18; P < 0,05) i koncentracijom kreatinina u serumu (β -3,66; SE 1,69; P < 0,05). Rezultat regresije je ukazao na značajnu negativnu povezanost alela *G* rs13333228 *UMOD* sa sistoličkim (β -1,86; SE 0,88; P < 0,05) i DAT (β -1,35; SE 0,65; P < 0,05). Za alel *T* rs2004776 *AGT* i alel *I* rs1799752 *ACE* rezultati nisu pokazali značajnu povezanost s niti jednim određivanim parametrom.

Analiza međusobnoga učinka genskih polimorfizama i svih određivanih čimbenika na pojavnost predhipertenzije je učinjena s multiplom univarijatnom logističkom regresijom uz hijerarhijsku eliminaciju varijabli unatrag. Rezultati su prikazani u tablici 5.7a. Regresija je rezultirala modelom koji uključuje značajni učinak međusobne interakcije dobi (OR 0,31; 95 % CI 0,13-0,71; P = 0,006), tjelesne visine (OR 0,96; 95 % CI 0,92-1,00; P = 0,043) i TM (OR 1,06; 95 % CI 1,03-1,09; P < 0,001), frekvencije srca (OR 1,03; 95 % CI 1,01-1,05; P = 0,014), koncentracije glukoze na tašte (OR 1,63; 95 % CI 1,01-2,62; P = 0,044), ukupnoga kolesterola (OR2,39; 95 % CI 1,09-5,24; P = 0,03), i heterozigotnoga genotipa rs17300539 *ADIPOQ* (OR 0,37; 95 % CI 0,18-0,77; P = 0,008), ali ne uključuje polimorfizam rs266729 *ADIPOQ* koji se pokazao značajnim u univarijatnoj logističkoj regresiji prilagođenoj na učinke dobi i spola (tablica 5.5a), niti polimorfizam rs13333228 *UMOD* koji je univarijatnom linearnom regresijom značajno povezan sa vrijednosti SAT i DAT (tablica 5.6). Model međusobnih interakcija je još obuhvatio i rizik od razvoja metaboličkih komplikacija debljine, koncentraciju LDL-kolesterola i triglicerida, ali bez značajnoga doprinosa.

Multipla univarijatna linearna regresija uz hijerarhijsku eliminaciju varijabli unatrag te multipla univarijatna logistička regresija uz hijerarhijsku eliminaciju varijabli unatrag je

provedena i za analizu mogućega učinka međusobnih interakcija genskih polimorfizama i svih određivanih čimbenika na pojavnost KV rizika čiji rezultati su prikazani u tablicama 5.7b1 i 5.7b2.

Model za KV rizik (izražen kao kontinuirana varijabla) je ukazao na značajnu pozitivnu povezanost opsega struka (β 0,05; SE 0,02; P = 0,004), stanja predhipertenzije (β 0,82; SE 0,28; P = 0,004), koncentracije LDL-kolesterola (β 0,82; SE 0,15; P < 0,001) i triglicerida (β 0,49; SE 0,14; P < 0,001) te negativnu povezanost s eGFR (β -0,04; SE 0,01; P < 0,001), ali niti jedan genski polimorfizam nije ušao u model.

Drugi model za pojavu KV rizika (izražen kao kategorijska varijabla) je obuhvatio značajnu pozitivnu povezanost međusobnih interakcija koncentracije kreatinina u serumu (OR 1,09; 95 % CI 1,03-1,16; P = 0,006), glukoze na tašte (OR 6,40; 95 % CI 1,89-21,76; P = 0,003) i LDL-kolesterola (OR 4,88; 95 % CI 2,10-11,36; P < 0,001) te nositelja heterozigotnoga genotipa C/T polimorfizma rs2004776 *AGT* (OR 6,31; 95 % CI 1,16-34,31; P = 0,033). U model međusobnih interakcija su ušli i stanje predhipertenzije i nositelj homozigotnoga genotipa *T/T* polimorfizma rs2004776 *AGT*, ali bez značajnog doprinosa.

Istovjetne regresijske analize povezanosti međusobnih interakcija (ovisno radi li se o kontinuiranim ili kategorijskim varijablama) su provedene i za KBB rizik izražen kao eGFR, ACR i kategorijski (nizak i umjeren rizik), no niti jedan dobiveni model nije dokazao interakciju istraživanih polimorfizama s ostalim određivanim parametrima koja imaju učinak na pojavnost KBB rizika (tablice 5.7c1., 5.7c2. i 5.7c3.). Model zajedničkoga učinka genskih polimorfizama i ostalih parametara na KBB rizik (izraženog kao eGFR) je obuhvatio tjelesnu visinu, KV rizik (%), koncentraciju ukupnoga kolesterola u serumu i kreatinina u porciji, ali bez ijednog polimorfizma. Model KBB rizika (izraženog kao ACR) je obuhvatio spol i koncentraciju ukupnoga kolesterola, ali također bez ijednog polimorfizma. Zajednički učinak genskih polimorfizama i ostalih parametara na KBB rizik (izraženog kategorijski) je u modelu sadržavao samo značajan negativan utjecaj *G/C* i *C/C* genotipa polimorfizma rs1801253 *ADRB1* bez ijednog drugog parametra.

Tablica 5.6. Povezanost genskih polimorfizama s antropometrijskim, kliničkim i biokemijskim parametrima (univarijatna linearna regresija; prikazani samo rezultati gdje je $P < 0,05$ u obliku β (SE))

	AGT **rs2004776**	***AGTR1*** **rs5186**	***ADRB1*** **rs1801253**	***ADIPOQ*** **rs266729**	***ADIPOQ*** **rs17300539**	***UMOD*** **rs13333226**	***ACE*** **rs1799752**
dob (godine)	/	-1,05 (0,52)	/	/	/	/	/
antropometrijski i klinički parametri							
tjelesna masa (kg)	/	/	/	/	5,43 (1,84)	/	/
opseg struka (cm)	/	/	/	/	4,94 (1,43)	/	/
indeks tjelesne mase (kg/m^2)	/	/	/	/	1,65 (0,51)	/	/
sistolički arterijski tlak (mmHg)	/	/	/	/	-2,42 (1,18)	-1,86 (0,88)	/
dijastolički arterijski tlak (mmHg)	/	/	/	/	/	-1,35 (0,65)	/
biokemijski parametri							
kreatinin u serumu (μmol/L)	/	/	/	/	-3,66 (1,69)	/	/
C-reaktivni protein (mg/L)	/	/	/	-0,20 (0,10)	/	/	/
HDL-kolesterol (mmol/L)	/	/	/	0,06 (0,02)	/	/	/
albumin porcija (mg/L)	/	/	-4,15 (1,93)	/	/	/	/
omjer alfa 1 mikroglobulina i kreatinina u mokraći (mg/g)	/	/	-1,47 (0,55)	/	/	/	/

Kratice: β, regresijski koeficijent; SE, standardna greška; P, razina statističke značajnosti; / – nema značajne povezanosti.

Tablica 5.7a. Zajednički učinak genskih polimorfizama i određivanih parametara na predhipertenziju (odabrani značajni modeli iz univarijatne logističke regresije iz Tablice 5.5a.)

		Multipla univarijatna logistička regresija			Multipla univarijatna logistička regresija uz hijerarhijsku eliminaciju varijabli unatrag		
		OR	**95 % CI**	**P**	**OR**	**95 % CI**	**P**
spol	muškarci	1				/	
	žene	0,28	0,11-0,75	**0,011**	0,31	0,13-0,71	**0,006**
dob (godine)		1,01	0,98-1,05	0,490		/	
tjelesna visina (cm)		0,94	0,83-1,05	0,266	0,96	0,92-1,00	**0,043**
tjelesna masa (kg)		1,08	0,96-1,22	0,222	1,06	1,03-1,09	**<0,001**
opseg struka (cm)		0,99	0,94-1,05	0,821		/	
ITM (kg/m^2)		0,93	0,68-1,28	0,658		/	
frekvencija srca (otkucaji/min)		1,03	1,01-1,06	**0,012**	1,03	1,01-1,05	**0,014**
rizik od razvoja metaboličkih komplikacija debljine	nema	1			1		
	umjeren	2,07	0,9-4,77	0,086	1,95	0,99-3,84	0,053
	vrlo visok	0,80	0,23-2,79	0,729	0,68	0,27-1,71	0,413
kreatinin u serumu (μmol/L)		1,01	0,98-1,04	0,542		/	
glukoza na tašte (mmol/L)		1,61	0,99-2,63	0,054	1,63	1,01-2,62	**0,044**
CRP (mg/L)		1,07	0,88-1,31	0,474		/	
kolesterol ukupni (mmol/L)		2,21	0,97-5,04	0,060	2,39	1,09-5,24	**0,030**
LDL-kolesterol (mmol/L)		0,48	0,20-1,17	0,106	0,47	0,20-1,10	0,083
trigliceridi (mmol/L)		0,78	0,54-1,13	0,191	0,76	0,53-1,08	0,123
ADIPOQ rs266729	*CC*	1					
	CG	0,71	0,41-1,22	0,213		/	
	GG	1,25	0,48-3,26	0,648			

		Multipla univarijatna logistička regresija			Multipla univarijatna logistička regresija uz hijerarhijsku eliminaciju varijabli unatrag		
		OR	**95 % CI**	**P**	**OR**	**95 % CI**	**P**
ADIPOQ rs17300539	*GG*	1			1		
	GA	0,39	0,18-0,84	**0,016**	0,37	0,18-0,77	**0,008**
	AA		/				
UMOD rs13333226	*AA*	1					
	AG	0,72	0,39-1,31	0,276		/	
	GG	1,12	0,23-5,36	0,892			

Kratice: OR, omjer izgleda; 95 % CI, 95 %-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda; P, razina statističke značajnosti; / – izbačeno iz modela jer ne pridonosi značajno na varijablu ishoda; CRP, C-reaktivni protein; ITM, indeks tjelesne mase

Tablica 5.7b1. Zajednički učinak genskih polimorfizama i određivanih čimbenika na kardiovaskularni rizik (%; odabrani značajni modeli iz univarijatne linearne regresije iz Tablice 5.5b.)

		Multipla univarijatna linearne regresija			Multipla univarijatna linearne regresija uz hijerarhijsku eliminaciju varijabli unatrag		
		β	**SE**	**P**	**β**	**SE**	**P**
tjelesna visina (cm)		0,03	0,08	0,731		/	
tjelesna masa (kg)		0,01	0,09	0,954		/	
opseg struka (cm)		0,04	0,03	0,204	0,05	0,02	**0,004**
ITM (kg/m^2)		0,04	0,25	0,877		/	
dijastolički AT (mmHg)		0,00	0,02	0,889		/	
klasifikacija AT	NMT	0			0		
	PHT	0,85	0,37	**0,021**	0,82	0,28	**0,004**
rizik od razvoja metaboličkih komplikacija debljine	nema	0			0		
	umjeren	-0,26	0,43	0,543	-0,09	0,37	0,808
	vrlo visok	-1,23	0,69	0,075	-0,87	0,50	0,086
kreatinin u serumu (μmol/L)		-0,03	0,02	0,169		/	
glukoza na tašte (mmol/L)		0,44	0,26	0,094	0,43	0,26	0,096
CRP (mg/L)		-0,03	0,11	0,747		/	
LDL-kolesterol (mmol/L)		0,83	0,16	**<0,001**	0,82	0,15	**<0,001**
triglyceridi (mmol/L)		0,48	0,14	**<0,001**	0,49	0,14	**<0,001**
eGFR (mL/min/1,73m^2)		-0,05	0,02	**0,001**	-0,04	0,01	**<0,001**
A1MCR (mg/g)		0,07	0,03	0,063	0,06	0,03	0,065

Kratice: β, regresijski koeficijent; SE, standardna greška; P, razina statističke značajnosti; / – izbačeno iz modela jer ne pridonosi značajno na varijablu ishoda; A1MCR, omjer alfa-1-mikroglobulina i kreatinina u mokraći; AT, arterijski tlak; CRP, C-reaktivni protein; ITM, indeks tjelesne mase; KV, kardiovaskularni, NMT, normotenzija; PHT, predhipertezija.

Tablica 5.7b2. Zajednički učinak genskih polimorfizama i određivanih čimbenika na na kardiovaskularni rizik (kategorije; odabrani značajni modeli iz univarijatne logističke regresije iz Tablice 5.5b.)

		Multipla univarijatna logistička regresija			**Multipla univarijatna logistička regresija uz hijerarhijsku eliminaciju varijabli unatrag**		
		OR	**95 % CI**	**P**	**OR**	**95 % CI**	**P**
tjelesna masa (kg)		1,07	0,91-1,24	0,420		/	
opseg struka (cm)		0,99	0,85-1,16	0,910		/	
ITM (kg/m^2)		0,85	0,52-1,37	0,501		/	
dijastolički AT (mmHg)		1,02	0,88-1,18	0,805		/	
klasifikacija AT	NMT	1			1		
	PHT	4,51	0,25-82,19	0,309	5,53	0,51-59,61	0,158
kreatinin u serumu (μmol/L)		1,08	0,95-1,22	0,238	1,09	1,03-1,16	**0,006**
glukoza na tašte (mmol/L)		5,87	1,55-22,24	**0,009**	6,40	1,89-21,76	**0,003**
LDL-kolesterol (mmol/L)		4,77	1,99-11,43	**<0,001**	4,88	2,10-11,36	**<0,001**
trigliceridi (mmol/L)		1,42	0,59-3,40	0,436		/	
eGFR (mL/min/1,73m^2)		1,01	0,91-1,11	0,895		/	
AGT (rs2004776)	*CC*	1			1		
	CT	7,64	1,16-50,32	**0,034**	6,31	1,16-34,31	**0,033**
	TT	3,71	0,18-77,11	0,398	4,06	0,28-58,87	0,305

Kratice: OR, omjer izgleda; 95 % , 95 %-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda; P, razina statističke značajnosti; / – izbačeno iz modela jer ne pridonosi značajno na varijablu ishoda; AT, arterijski tlak; eGFR, procjena glomerularne filtracije prema CKD-EPI; ITM, indeks tjelesne mase; KV, kardiovaskularni; NMT, normotenzija; PHT, predhipertezija.

Tablica 5.7c1. Zajednički učinak genskih polimorfizama i određivanih čimbenika na renalni rizik (eGFR; odabrani značajni modeli iz univarijatne linearna regresije iz Tablice 5.5c1.)

	Multipla univarijatna linearna regresija			**Multipla univarijatna linearna regresija uz hijerarhijsku eliminaciju varijabli unatrag**		
	β	**SE**	**P**	**β**	**SE**	**P**
tjelesna visina (cm)	0,14	0,07	**0,047**	0,14	0,07	**0,05**
sistolički AT (mmHg)	0.00	0,08	0,955		/	
dijastolički AT (mmHg)	-0,05	0,1	0,63		/	
KV rizik (%)	-0,65	0,26	**0,014**	-0,74	0,24	**0,002**
kolesterol ukupni (mmol/L)	-0,74	1,94	0,704	-1,17	0,7	0,096
LDL-kolesterol (mmol/L)	-0,43	2,23	0,848		/	
trigliceridi (mmol/L)	-0,59	0,9	0,512		/	
kreatinin porcija (mmol/L)	-0,17	0,1	0,087	-0,16	0,1	0,095

Kratice: β, regresijski koeficijent; SE, standardna greška; P, razina statističke značajnosti; / – izbačeno iz modela jer ne pridonosi značajno na varijablu ishoda; AT, arterijski tlak; eGFR, procjena glomerularne filtracije prema CKD-EPI; KBB, kronična bubrežna bolest; KV, kardiovaskularni

Tablica 5.7.c2. Zajednički učinak genskih polimorfizama i određivanih čimbenika na renalni rizik (ACR; odabrani značajni modeli iz univarijatne linearne regresije iz Tablice 5.5c2.)

		Multipla univarijatna linearna regresija			Multipla univarijatna linearna regresija uz hijerarhijsku eliminaciju varijabli unatrag		
		β	**SE**	**P**	**β**	**SE**	**P**
spol							
	muškarci	0			0		
	žene	1,55	0,73	**0,034**	1,61	0,72	**0,027**
dob (godine)		0,03	0,05	0,481		/	
kolesterol ukupni (mmol/L)		0,56	0,37	0,131	0,67	0,34	**0,049**

Kratice: β, regresijski koeficijent; SE, standardna greška; P, razina statističke značajnosti

Tablica 5.7c3. Zajednički učinak genskih polimorfizama i određivanih čimbenika na renalni rizik (kategorije; odabrani značajni modeli iz univarijatne logističke regresije iz Tablice 5.5c3)

		Multipla univarijatna logistička regresija			Multipla univarijatna logistička regresija uz hijerarhijsku eliminaciju varijabli unatrag		
		OR	**95 % CI**	**P**	**OR**	**95 % CI**	**P**
beta-1-adrenergički receptor, *ADRB1* (rs1801253)							
	GG	1			1		
	GC	0,13	0,02-0,93	**0,043**	0,13	0,02-0,93	**0,043**
	CC	0,10	0,01-0,72	**0,023**	0,10	0,01-0,72	**0,023**

Kratice: OR, omjer izgleda; 95 % CI, 95 %-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda; P, razina statističke značajnosti; / – izbačeno iz modela jer ne pridonosi značajno na varijablu ishoda

Uzročno-posljedična vezu značajnih rezultata povezanosti određenih mjerenih parametara s ishodom odredili smo i metodom Mendelske randomizacije.

Modeli koji su zadovoljili sva tri kriterija (genski polimorfizam tj. varijatni alel nije značajno povezan s varijablom ishoda, no povezan je s varijablom rizika, a varijabla rizika je značajno povezana s varijablom ishoda prema podacima iz tablica 5.4.a, 5.4.b. i 5.5) su prikazani u tablici 5.8. Ovom analizom nije utvrđena značajna povezanost niti za predhipertenziju, KV rizik, ni za KBB rizik.

Tablica 5.8. Rezultati metode Mendelske randomizacije za one modele koji su zadovoljili sva tri kriterija (genski polimorfizam nije značajno povezan s varijablom ishoda, no povezan je s varijablom rizika, a varijabla rizika je značajno povezana s varijablom ishoda)

Model	β	SE	P
predhipertenzija			
(modeli osnovani na temelju rezultata univarijatne logističke regresije)			
ADIPOQ_1 ~ CRP ~ PHT	0,46	0,66	0,483
ADIPOQ_2 ~ CREAs ~ PHT	-0,09	0,06	0,132
ADIPOQ_2 ~ ITM ~ PHT	0,20	0,13	0,132
ADIPOQ_2 ~ OS ~ PHT	0,07	0,04	0,132
ADIPOQ_2 ~ TT ~ PHT	0,06	0,04	0,132
KV rizik (%)			
(modeli osnovani na temelju rezultata univarijatne linearne regresije)			
ADRB1 ~ A1MCr ~ KVR	-1,34	1,02	0,190
ADIPOQ_1 ~ CRP ~ KVR	0,13	0,09	0,158
ADIPOQ_2 ~ CREAs ~ KVR	0,29	0,21	0,158
ADIPOQ_2 ~ ITM ~ KVR	0,10	0,07	0,158
ADIPOQ_2 ~ OS ~ KVR	0,09	0,06	0,158
ADIPOQ_2 ~ TT ~ KVR	-0,02	0,15	0,876
UMOD ~ DAT ~ KVR	0,15	0,20	0,451
KBB rizik (kategorije)			
(modeli osnovani na temelju rezultata univarijatne logističke regresije)			
ADRB1 ~ ALB(U) ~ KBB	0,28	0,15	0,062

Kratice: β, regresijski koeficijent; SE, standardna greška; P, razina statističke značajnosti; *ADIPOQ_1*, rs266729*;* CREAs, kreatinin u serumu; PHT, predhipertenzija; KVR, kardiovaskularni rizik; TT, tjelesna težina; CRP, C-reaktivni protein; A1MCr, omjer alfa-1-mikroglobulina i kreatinina u mokraći; *ADIPOQ_2*, rs17300539; *ADRB1*, rs1801253; OS, opseg struka; DAT, dijastolički arterijski tlak; ITM, indeks tjelesna mase; *UMOD*, rs13333226); KBB, kronična bubrežna bolest; KV, kardiovaskularni; ALB(U), albumin u mokraći.

5.5. Interakcije gen – gen

Interakcije gen – gen su analizirane prema modelu genotipova visokoga (interakcija s ishodom je pozitivna) i niskoga rizika (interakcija s ishodom je negativna) univarijatnom i multiplom univarijatnom logističkom regresijom u odnosu na pojavnost ishoda (predhipertenzija, KV i KBB rizik), nakon čega su samo značajne interakcije dodatno analizirane permutacijskim testom kako bi se utvrdila stvarna značajnost dobivenih modela. Rezultati su prikazani u tablici 5.9.

Za ishod „predhipertenzija“ multiplom univarijatnom analizom interakcija gen – gen nađene su značajne interakcije:

- dva polimorfizma (rs1799752 *ACE* + rs266729 *ADIPOQ*) s dva značajna genotipa (β 0,73; P = 0,01)
- četiri polimorfizma (rs1799752 *ACE* + rs13333226 *UMOD* + rs17300539 *ADIPOQ* + rs266729 *ADIPOQ*) s jednim značajnim genotipom (β 0,92; P = 0,02)
- pet polimorfizama (rs1799752 *ACE* + rs17300539 *ADIPOQ* + rs266729 *ADIPOQ* + rs5186 *AGTR1* + rs2004776 *AGT)* s dva značajna genotipa (β 1,17; P = 0,02)
- pet polimorfizama (rs1799752 *ACE* + rs13333226 *UMOD* + rs17300539 *ADIPOQ* + rs266729 *ADIPOQ* + rs5186 AGTR1) s dva značajna genotipa (β 0,90; P < 0,01)

Univarijatnom logističkom regresijom identificirana su dva haplotipa koja su značajno pozitivno povezana s pojavnošću predhipertenzije:

- hIAGC; interakcija četiri polimorfizma:
  rs1799752 *ACE* + rs13333226 *UMOD* + rs17300539 *ADIPOQ* + rs266729 *ADIPOQ*
  (OR 1,41; 95 % CI 1,02-1.94; P=0,04), učestalost ovoga haplotipa u cijeloj skupini je 0,28, u NT 0,24, a značajno je veća u PHT 0,32
- hIAGCA; interakcija pet polimorfizama:
  rs1799752 ACE + rs13333226 *UMOD* + rs17300539 *ADIPOQ* + rs266729 *ADIPOQ* + rs5186 *AGTR1* (OR 1,47; 95 % CI 1,01-2,14; P = 0,05), učestalost ovog haplotipa u cijeloj skupini je 0,21, u NT 0,18, a značajno je veća u PHT 0,23

S obzirom na mali broj ispitanika u kategoriji ishoda „umjereni KV rizik“, nije bilo moguće ispravno utvrditi interakcije gen – gen nego je analiza napravljena na svih sedam genskih polimorfizama. Prvotno se međusobna interakcija svih polimorfizama pokazala značajna (rs1799752 *ACE* + rs13333226 *UMOD* + rs17300539 *ADIPOQ* + rs266729 *ADIPOQ* +

rs1801253 *ADRB1* + rs5186 *AGTR1* + rs2004776 *AGT*), s ukupno osam mogućih kombinacija genotipova, ali permutacijski test sa 100 iteracija nije potvrdio tu značajnost.

Jednaka situacija se ponovila kod analize za ishod „umjeren KBB rizik“. Budući da polimorfizam *AGT* nije zadovoljio HWE prag nije mogao ući u analizu, pa je analiza napravljena na ostalih šest polimorfizama. Međusobna interakcija šest polimorfizama (rs1799752 ACE + rs13333226 UMOD + rs17300539 ADIPOQ + rs266729 ADIPOQ + rs266729 ADRB1 + rs5186 AGTR1) se pokazala značajnom, s mogućih šest kombinacija genotipova, ali opet permutacijski test nije potvrdio značajnost.

Posljedično, s ishodima vezanim uz KV i KBB rizik nije nađena značajna povezanost pojedinih haplotipova, što je također posljedica izrazito malog broja podskupine ispitanika u kategorijama umjerenog KV i KBB rizika.

Tablica 5.9. Statistički značajni rezultati analize interakcija gen – gen i na temelju toga analiza najučestalijega haplotipa ispitanika s normotenzijom i predhipertenzijom te ovisno o kardiovaskularnom i renalnom riziku (univarijatna logistička regresija)

Broj gena	Interakcija	Analiza interakcija gen – gen					Analiza haplotipova						
		N	Genotip	Beta	P*	P**	Haplotip	Učestalost	Učestalost NMT	Učestalost PHT	OR	95 % CI	P***
predhipertenzija[a]													
2	*ACE* *ADIPOQ_1*	2	1/0 0/2	0,73	**<0,001**	**0,01**	hDC hIC	0,35 0,35	0,36 0,33	0,35 0,36	0,95 1,14	0,72-1,26 0,86-1,51	0,73 0,36
4	*ACE* *UMOD* *ADIPOQ_2* *ADIPOQ_1*	1	1 0 0 0	0,92	**<0,001**	**0,02**	hIAGC hDAGC	0,28 0,26	**0,24** 0,25	**0,32** 0,26	1,41 1,09	1,02-1,94 0,79-1,49	**0,04** 0,60
5	*ACE* *ADIPOQ_2* *ADIPOQ_1* *AGTR1* *AGT*	2	1 0 0 0/1 1/0	1,17	**0,001**	**0,02**	hIGCAC hDGCAC	0,17 0,14	0,15 0,20	0,19 0,13	1,17 0,96	0,79-1,73 0,63-1,46	0,43 0,85
	ACE *UMOD* *ADIPOQ_2* *ADIPOQ_1* *AGTR1*	2	1 0 0 0 0/1	0,90	**0,001**	**<0,01**	hIAGCA hDAGCA	0,21 0,19	**0,18** 0,17	**0,23** 0,19	1,47 1,11	1,01-2,14 0,76-1,62	**0,05** 0,58
KV rizik[b]													
7	*ACE* *UMOD* *ADIPOQ_2* *ADIPOQ_1* *ADRB1* *AGTR1* *AGT*	8	0/1/2 0/1/2 0/1/2 0/1/2 0/1/2 0/1/2 0/1/2	0,293	**<0,001**	0,98	hIAGCCAC	0,10	/	/	model ne konvergira		
KBB rizik[c]													
6	*ACE* *UMOD* *ADIPOQ_2* *ADIPOQ_1* *ADRB1* *AGTR1*	6	0/1/2 0 0 0/1/2 0 0	0,240	**<0,001**	0,19	hIAGCCA	0,15	/	/	model ne konvergira		

Legenda [a] Gen *ADRB1* nije uključen jer nije zadovoljio HWE prag; prikazani samo rezultati gdje je P zadržao značajnost nakon permutacijskog testa u analizi interakcija gen – gen; u analizi haplotipova prikazani rezultati za dva najučestalija haplotipa (h). Nastavak legende na sljedećoj stranici.

[b] S obzirom na mali broj ispitanika u kategoriji umjerenoga kardiovaskularnog rizika niti jedan model se nije pokazao značajnim u permutacijskom testu, stoga je za analizu haplotipova ostavljen samo zajednički model sa svih sedam analiziranih genskih polimorfizama

[c] Gen *AGT* nije uključen jer nije zadovoljio HWE prag; obzirom na mali broj ispitanika u kategoriji umjerenoga renalnog rizika niti jedan model se nije pokazao značajnim u permutacijskom testu, stoga je za analizu haplotipova ostavljen samo zajednički model sa svih sedam analiziranih genskih polimorfizama

Kratice: N, broj značajnih genotipova u interakciji; beta, regresijski koeficijent učinka; P*, razina statističke značajnosti nakon Bonferroni korekcije; P**, razina statističke značajnosti nakon permutacijskog testa s 100 iteracija; OR, omjer izgleda; 95 % CI, 95 %-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda; P***, razina statističke značajnosti nakon univarijatne logističke regresije najučestalijeg haplotipa; 0, *major* alel homozigot; 1, heterozigot; 2, *minor* alel homozigot * Genotip visokoga rizika, regresijski koeficijent učinka povezanosti interakcije gen – gen s varijablom ishoda je pozitivnoga smjera; genotip niskoga rizika, regresijski koeficijent učinka povezanosti interakcije gen – gen s varijablom ishoda je negativnoga smjera; [+] Prilagođeno na dob i spol; *ACE, rs1799752; AGT*, rs2004776, *AGTR1*,rs5186*; ADIPOQ_1*, rs266729*; ADIPOQ_2*, rs17300539; *UMOD*, rs13333226; 0, *major* alel homozigot; 1, heterozigot; 2 , *minor* alel homozigot (za *ACE* 0, genotip D/D; 1, genotip I/D; 2, genotip I/I). Haplotip (h) sadrži određeni alel gena u interakciji, npr. hDC; alel *D* rs1799752 gena *ACE* i alel *C* rs266729 gena ADIPOQ.

5.6. Interakcije gen – gen – ostali određivani parametri

Međusoban odnos svih određivanih demografskih, antropometrijskih, kliničkih, biokemijskih, okolišnih i genskih parametara pomoću Spearmanovog koeficijenta korelacija prikazan je na slici 5.1 uz napomenu da su prikazane samo statistički značajne korelacije, a jači intenzitet boje označava snažniju korelaciju.

Zbog kompleksnosti istraživanja napravljena je i zajednička analiza multiplom logističkom regresijom međusobnih interakcija gen – gen i interakcija gen – ostali određivani parametri gdje su najznačajnije varijable odabrane putem algoritma hijerarhijske eliminacije varijabli unatrag za predhipertenziju, KV i KBB rizik. Rezultati analize tj. značajni modeli su prikazani u tablici 5.10.

Model interakcija gen – gen – ostali određivani parametri povezan s pojavnošću predhipertenzije (slika 5.2) je obuhvatio sljedeće parametre sa statistički značajnim interakcijama u modelu:

- spol, tjelesna visina i TM, koncentracija glukoze na tašte
- polimorfizam rs17300539 *ADIPOQ* tj. *minor* alel *A*

Osim gore navedenih značajnih parametara još su u model uključeni, ali bez statističke značajnosti:

- dob
- frekvencija srca
- interakcija dva polimorfizma (rs1799752 *ACE* + rs266729 *ADIPOQ*)

Model interakcija gen – gen – ostali određivani parametri povezan s pojavnošću predhipertenzije i KV rizika (slika 5.3) je obuhvatio sljedeće parametre sa statistički značajnim interakcijama u modelu:

- tjelesna masa, koncentracija kreatinina u serumu, koncentracija glukoze na tašte,
- međusobne interakcije:
    - četiri polimorfizma (rs1799752 *ACE* + rs13333226 *UMOD* + rs17300539 *ADIPOQ* + rs266729 *ADIPOQ*) tj. haplotip hIAGC
    - pet polimorfizama (rs1799752 *ACE* + rs17300539 *ADIPOQ* + rs266729 *ADIPOQ* + rs5186 *AGTR1* + rs2004776 *AGT)* tj. dva moguća haplotipa hIGCAC i hDGCAC

Osim gore navedenih značajnih parametara još su u model uključeni, ali bez statističke značajnosti:

- rs2004776 *AGT (*alel *T)*

- međusobna interakcija:
    - dva polimorfizma (rs1799752 *ACE* + rs266729 *ADIPOQ*)
    - pet polimorfizama (rs1799752 *ACE* + rs13333226 *UMOD* + rs17300539 *ADIPOQ* + rs266729 *ADIPOQ* + rs5186 AGTR1)

Model interakcija gen – gen – ostali određivani parametri povezan s pojavnošću predhipertenzije i KBB rizika (slika 5.3) je obuhvatio sljedeće parametre sa statistički značajnim interakcijama u modelu:

- tjelesna masa, koncentracija glukoze na tašte, triglicerida
- polimorfizam rs17300539 *ADIPOQ*

Osim gore navedenih značajnih parametara još je u model uključena, ali bez statističke značajnosti:

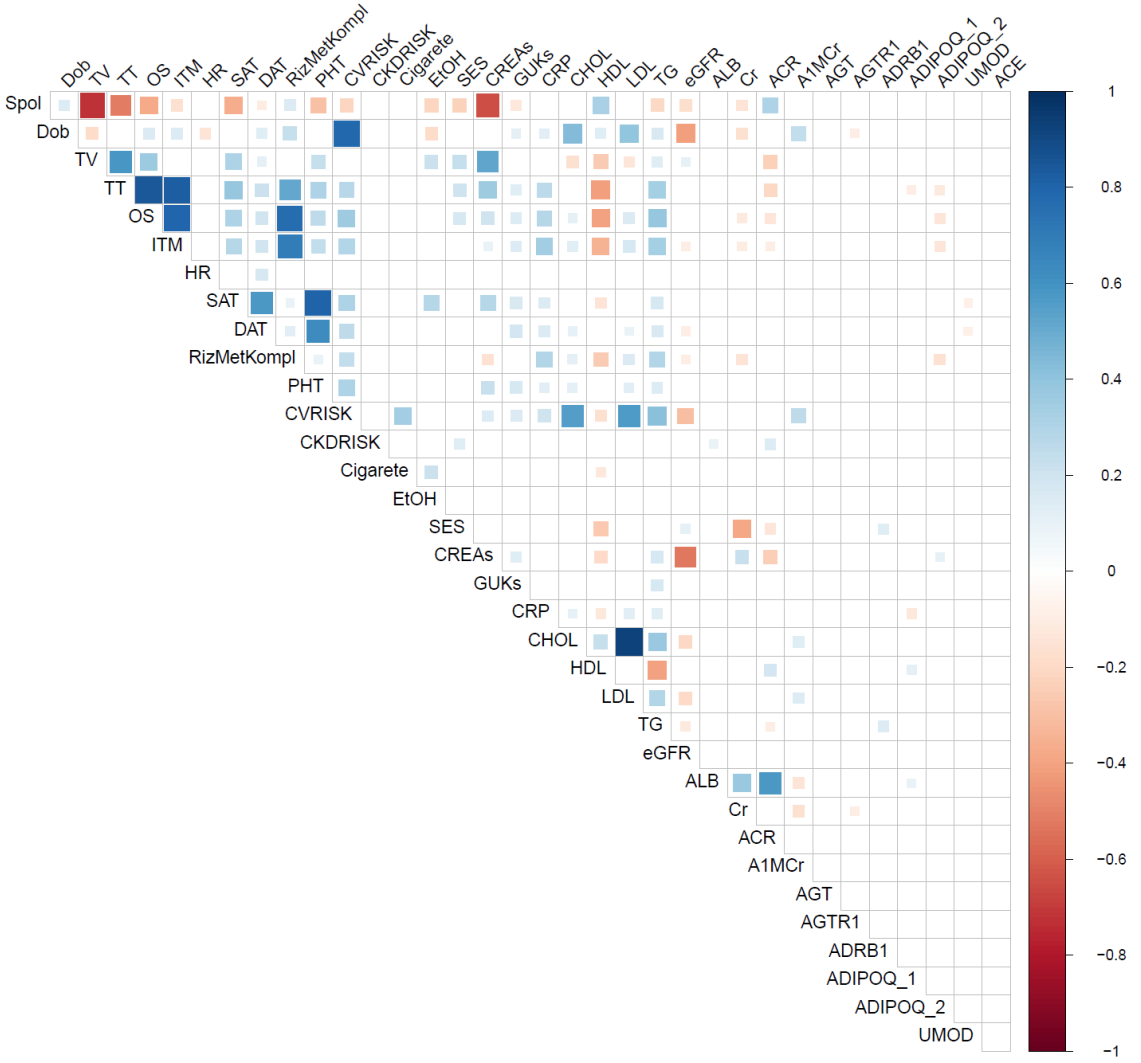
- međusobna interakcija:
    - dva polimorfizma (rs1799752 *ACE* + rs266729 *ADIPOQ*)

Model interakcija gen – gen – ostali određivani parametri povezan s pojavnošću predhipertenzije, KV i KBB rizik (slika 5.4) je obuhvatio sljedeće parametre sa statistički značajnim interakcijama u modelu:

- tjelesna masa, koncentracija glukoze na tašte
- polimorfizam rs17300539 *ADIPOQ*

Osim gore navedenih značajnih parametara još su u model uključeni, ali bez statističke značajnosti:

- polimorfizam rs2004776 *AGT (*alel *T)*
- međusobna interakcija:
    - dva polimorfizma (rs1799752 *ACE* + rs266729 *ADIPOQ*)



Slika 5.1. Odnos između demografskih, antropometrijskih, kliničkih, biokemijskih, okolišnih i genskih parametara prikazan pomoću Spearmanovog koeficijenta korelacija (prikazane su samo statistički značajne korelacije, dok jači intenzitet boje označava snažniju korelaciju.

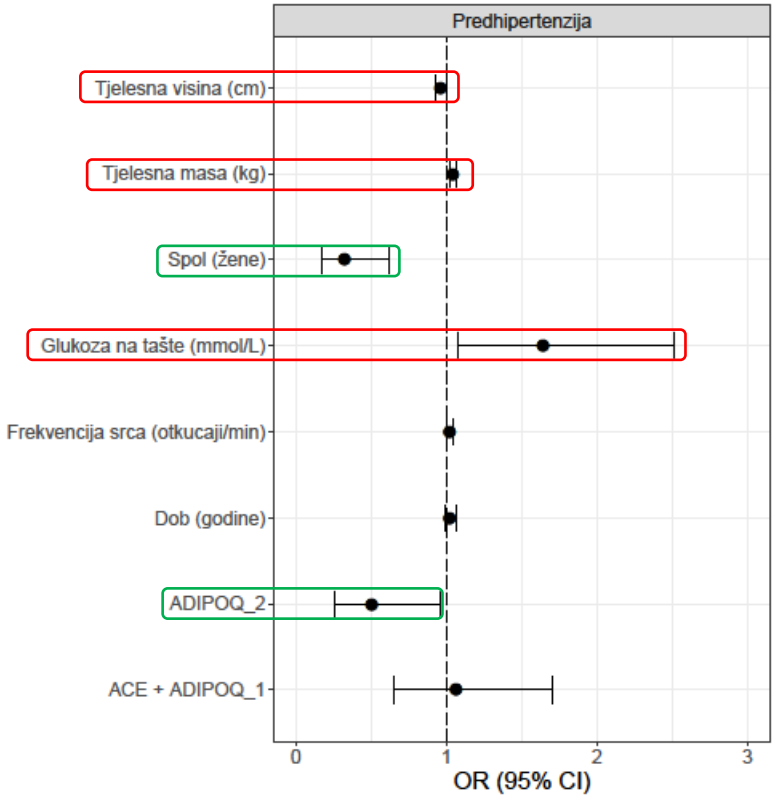
Kratice: A1MCr, omjer alfa-1-mikroglobulina i kreatinina; *ACE*, alel *D;* ACR, omjer albumina i kreatinina u mokraći; *ADIPOQ_1*, rs266729*; ADIPOQ_2*, rs17300539; ALB, albumin porcija; *AGT*, rs2004776, *AGTR1*, rs5186; CHOL, ukupni kolesterol; CKDRisk, rizik za razvoj kronične bubrežne bolesti; Cr, kreatinin porcija; CREAs, kreatinin u serumu; CRP, C-reaktivni protein; CVRisk, kardiovaskularni rizik; DAT, dijastolički arterijski tlak; eGFR, procjenjena glomerulana filtracija; EtOH, alkohol; GUKs, glukoza na tašte; HLD, HDL-kolesterol, HR, frekvencija srca; ITM, indeks tjelesne mase; LDL, LDL-kolesterol; OS, opseg struka; PHT, predhipertenzija; RizMetKompl, rizik od razvoja metaboličkih komplikacija debljine; SAT, sistolički arterijski tlak; SES, socijalni status; TG, trigliceridi; TT, tjelesna masa; TV, tjelesna visina; *UMOD*, rs13333226

Tablica 5.10. Značajni modeli zajedničke analize interakcija gen – ostali određivani parametri i interakcije gen – gen (najznačajnije varijable izabrane iz tablica 5.7a, 5.7b1, 5.7b2, 5.75c1, 5.7c2, 5.7c3, a značajne interakcije gen – gen izabrane iz tablice 5.9) povezani s pojavnošću predhipertenzije, kardiovaskularnoga i renalnoga rizika

	Multipla logistička regresija			**Multipla logistička regresija uz hijerarhijsku eliminaciju varijabli unatrag**		
	OR	**95 % CI**	**P**	**OR**	**95 % CI**	**P**
PREDHIPERTENZIJA						
spol (žene)	0,32	0,17-0,62	**<0,001**	0,32	0,17-0,62	**<0,001**
dob (godine)	1,02	0,99-1,05	0,221	1,02	0,99-1,06	0,104
tjelesna visina (cm)	0,97	0,93-1,00	**0,048**	0,96	0,93-1,00	**0,043**
tjelesna masa (kg)	1,04	1,02-1,06	**<0,001**	1,04	1,02-1,06	**<0,001**
frekvencija srca (otkucaji/min)	1,02	1,00-1,04	0,082	1,02	1,00-1,04	0,068
glukoza na tašte (mmol/L)	1,63	1,07-2,50	**0,023**	1,64	1,07-2,51	**0,022**
kolesterol ukupni (mmol/L)	1,09	0,86-1,38	0,495		/	
ADIPOQ_2	0,53	0,27-1,02	0,058	0,50	0,26-0,96	**0,037**
ACE + ADIPOQ_1	1,07	0,66-1,73	0,784	1,06	0,65-1,70	0,826
ACE + UMOD + ADIPOQ_2 + ADIPOQ_1		/			/	
ACE + ADIPOQ_2 + ADIPOQ_1 + AGTR1 + AGT		/			/	
ACE + UMOD + ADIPOQ_2 + ADIPOQ_1 + AGTR1		/			/	
PREDHIPERTENZIJA I KV RIZIK						
tjelesna masa (kg)	1,03	1,00-1,07	0,070	1,04	1,02-1,06	**<0,001**
opseg struka (cm)	1,01	0,97-1,05	0,572		/	
frekvencija srca (otkucaji/min)	1,01	0,99-1,04	0,237		/	
kreatinin u serumu (μmol/L)	1,03	1,01-1,06	**0,016**	1,03	1,01-1,05	**0,007**
glukoza na tašte (mmol/L)	1,82	1,17-2,83	**0,008**	1,79	1,16-2,78	**0,009**
LDL-kolesterol (mmol/L)	1,23	0,94-1,61	0,133		/	
trigliceridi (mmol/L)	0,88	0,66-1,17	0,383		/	
eGFR (mL/min/1,73m^2)	1,00	0,98-1,03	0,718		/	
AGT	0,68	0,45-1,01	0,058	0,68	0,46-1,02	0,063
ACE + ADIPOQ_1	0,69	0,38-1,23	0,206	0,70	0,40-1,25	0,231
ACE + UMOD + ADIPOQ_2 + ADIPOQ_1	1,51	1,02-2,22	**0,039**	1,53	1,04-2,25	**0,030**
ACE + ADIPOQ_2 + ADIPOQ_1 + AGTR1 + AGT	1,33	1,02-1,74	**0,036**	1,31	1,01-1,71	**0,043**
ACE + UMOD + ADIPOQ_2 + ADIPOQ_1 + AGTR1	0,59	0,33-1,04	0,070	0,58	0,33-1,03	0,063

	Multipla logistička regresija			Multipla logistička regresija uz hijerarhijsku eliminaciju varijabli unatrag		
	OR	**95 % CI**	**P**	**OR**	**95 % CI**	**P**
PREDHIPERTENZIJA I KBB RIZIK						
tjelesna visina (cm)	0,99	0,97-1,02	0,557		/	
tjelesna masa (kg)	1,05	1,03-1,07	**<0,001**	1,04	1,03-1,06	**<0,001**
frekvencija srca (otkucaji/min)	1,01	0,99-1,03	0,437		/	
glukoza na tašte (mmol/L)	1,80	1,18-2,74	**0,006**	1,83	1,21-2,79	**0,005**
kolesterol ukupni (mmol/L)	1,13	0,91-1,4	0,281		/	
ADIPOQ_2	0,45	0,23-0,88	**0,020**	0,45	0,23-0,86	**0,016**
ADRB1	1,07	0,74-1,54	0,729		/	
ACE + ADIPOQ_1	1,08	0,67-1,76	0,744	1,05	0,65-1,70	0,836
ACE + UMOD + ADIPOQ_2 + ADIPOQ_1		/			/	
ACE + ADIPOQ_2 + ADIPOQ_1 + AGTR1 + AGT		/			/	
ACE + UMOD + ADIPOQ_2 + ADIPOQ_1 + AGTR1		/			/	
PREDHIPERTENZIJA, KV I KBB RIZIK						
tjelesna visina (cm)	0,99	0,96-1,02	0,501		/	
tjelesna masa (kg)	1,05	1,02-1,09	**0,002**	1,05	1,03-1,06	**<0,001**
opseg struka (cm)	0,99	0,96-1,03	0,739		/	
frekvencija srca (otkucaji/min)	1,01	0,99-1,03	0,451		/	
glukoza na tašte (mmol/L)	1,90	1,22-2,95	**0,004**	1,90	1,23-2,95	**0,004**
LDL-kolesterol (mmol/L)	1,15	0,88-1,51	0,303		/	
trigliceridi (mmol/L)	0,94	0,71-1,24	0,671		/	
ADIPOQ_2	0,38	0,18-0,79	**0,009**	0,38	0,19-0,77	**0,008**
ADRB1	1,07	0,71-1,60	0,759		/	
AGT	0,87	0,59-1,29	0,492	0,88	0,60-1,29	0,514
ACE + ADIPOQ_1	1,01	0,60-1,70	0,962	0,98	0,59-1,64	0,938
ACE + UMOD + ADIPOQ_2 + ADIPOQ_1		/			/	
ACE + ADIPOQ_2 + ADIPOQ_1 + AGTR1 + AGT		/			/	
ACE + UMOD + ADIPOQ_2 + ADIPOQ_1 + AGTR1		/			/	

Kratice: OR, omjer izgleda; 95 % , 95 %-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda; P, razina statističke značajnosti; / – izbačeno iz modela jer ne pridonosi značajno na varijablu ishoda; *ACE*, rs1799752; *AGT*, rs2004776, *AGTR1*, rs5186; *ADIPOQ*_1, rs266729; *ADIPOQ*_2, rs17300539; *UMOD*, rs 13333226.

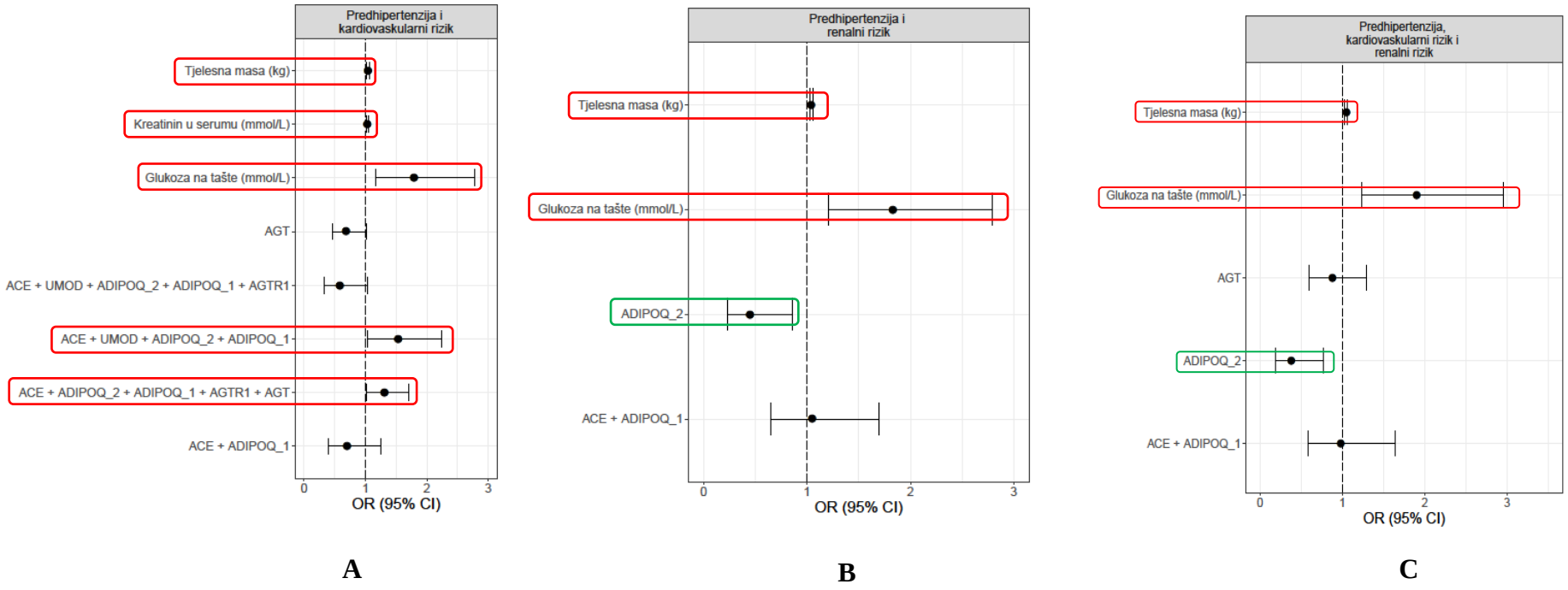


Slika 5.2. Značajni model zajedničke analize međusobnih interakcija gen – ostali određivani parametri i interakcija gen – gen.

Najznačajnije varijable odabrane putem algoritma hijerarhijske eliminacije varijabli unatrag povezane s predhipertenzijom, značajne interakcije gen – gen izabrane su iz tablice 5.9; dok su za ostale parametre odabrani oni koji su pokazali značajnu razliku između osoba s normotenzijom i predhipertenzijom iz tablice 5.1a.

Obrubljene su varijable koje značajno utječu na ishod, crvenom bojom pro-predhipertenzivne varijable, a zelenom zaštitne varijable unutar modela.

Kratice: OR, omjer izgleda; 95 % CI, 95 %-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda; *ACE*, rs1799752*; ADIPOQ_1*, rs266729*; ADIPOQ_2*, rs17300539.



Slika 5.3. Značajni modeli zajedničke analize međusobnih interakcija gen – ostali određivani parametri i interakcija gen – gen.

Najznačajnije varijable odabrane putem algoritma hijerarhijske eliminacije varijabli unatrag) povezan s predhipertenzijom i KV rizikom (A), predhipertenzijom i KBB (B) i sumarno PHT + KV rizik + KBB rizik (C).

Značajne interakcije gen – gen izabrane iz tablice 5.9; dok su za ostale parametre odabrani oni koji su pokazali značajnu razliku između osoba s normotenzijom i predhipertenzijom, umjerenim i niskim KV i KBB rizikom iz tablica 5.1a – 5.1c. Obrubljene su varijable koje značajno utječu na ishod, crvenom bojom - rizične varijable, a zelenom zaštitne varijable unutar modela.

Kratice: OR, omjer izgleda; 95 % CI, 95 %-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda; *ACE*, rs1799752*; AGT*, rs2004776, *AGTR1*, rs5186*; ADIPOQ_1*, rs266729*; ADIPOQ_2*, rs17300539; *UMOD*, rs 13333226.

6. RASPRAVA

Arterijska hipertenzija je multifaktorijalna kompleksna bolest s izraženom nasljednom komponentom koja utječe na mnoge organske sustave, uključujući mozak, srce, krvožilni sustav i bubrege, a također je sastavnica metaboličkoga sindroma. Visoke vrijednosti AT su vodeći nasljedni čimbenik rizika za pojavu moždanoga udara i koronarne bolesti i visoki AT se u cijelom svijetu smatra odgovornim za 7,8 milijuna smrti i 148 milijuna izgubljenih životnih godina prilagođenih invaliditetu (213). Unatoč širokoj rasprostranjenosti i velikoj učestalosti, etiologija primarne AH je i dalje u velikom dijelu nepoznata. Kao što je već spomenuto, etiologija AH je složena od brojnih genskih i okolišnih čimbenika, a poznati pojedini genski čimbenici objašnjavaju tek oko 3 % varijabilnosti AT, što samo govori u prilog mnogim otvorenim pitanjima u genetici i stalnom potrebom za novim istraživanjima (73,84-86,214-217). Genski lokusi uključeni u regulaciju AT obuhvaćaju između ostaloga proteine uključene u RAAS, krvožilni sustav, sustav komplementa, endokrini sustav i središnji živčani sustav. Evangelou i sur. su krajem 2018. godine objavili rezultate do sada najvećeg GWAS-a povezanoga s AT koji je proveden na više od milijun ljudi europskoga porijekla. Identificirali su 535 novih genskih lokusa povezanih s AT. Njihovi rezultati su ukazali na nove fiziološke puteve odgovorne za regulaciju AT te su identificirali poveznicu između gena i načina života. Ovaj GWAS objašnjava 27 % procjenjenoga nasljednog čimbenika za AT s ukupno 901 poznatih genskih lokusa povezanih s AT (218). Potvrdili su prijašnje navode o povezanosti gena za AT s antropometrijskim svojstvima, autoimunim, onkološkim, hematološkim, metaboličkim bolestima kao i s bolestima bubrega i koagulopatijama. Također, nađena je poveznica s frekvencijom srca, EKG nalazom, koronarnom bolesti te infarktom miokarda, kao i metabolizmom lipida i načinom života. Sve to potvrđuje kompleksnost regulacije AT u organizmu. No, ne smije se zaboraviti da je metodologija GWAS namijenjena istraživanju genske arhitekture na populacijskoj, a ne na pojedinačnoj razini. Također, rezultati GWAS-a ne detekturaju uzročni gen niti otkrivaju mehanizme. Zbog toga se ne mogu jednostavno klinički primijeniti, već ih je potrebno kroz biološke populacijske studije potvrditi i na taj način prevesti u kliničku praksu.

Prema svim do sada objavljenim podacima, u etiologiju AH je uključen velik broj lokusa s malim pojedinačnim učinkom na vrijednosti AT, a potvrdu njihove značajnosti svakako otežavaju niske učestalosti *minor* alela (najčešće rizični alel). Zbog toga je bitno provesti populacijska istraživanja AH koja će zbog smanjene genske varijabilnosti imati jednostavniju gensku arhitekturu. Dosadašnja istraživanja genetičke osnove AH nisu se najvećim dijelom bavila predhipertenzijom tj. visoko normalnim AT, već su bila ograničena samo na vrijednosti AT ≥140/90 mmHg. Pretraga biomedicinske baze podatka Medline pomoću PubMed tražilice za

period svih godina (zaključno s 01. srpnja 2020.) definirana putem MeSH Terms: *prehypertension; polymorphism, genetic* nalazi samo osam publikacija objavljenih između 2010. i 2016. godine. Ipak, kliničari su sve svjesniji stanja predhipertenzije kao zdravstveno-rizičnoga čimbenika, što je vidljivo i iz definicije AH od strane AHA/ACC u kojoj je snižena granica vrijednosti AT na 130/80 mmHg (11). Nastavno na ovu promjenu američke definicije AH, i u Europi se prema najnovijim europskim smjernicama za AH vrijednosti AT 120/80–139/89 mmHg ne podcjenjuju te se smatraju visoko normalnima i upućuju na granično stanje AT (13). Objavljeni su brojni dokazi o povezanosti AT ≥ 130/80 mmHg s većim brojem KV događaja, te se sve više stavlja naglasak na preventivne mjere KV morbiditeta s obzirom na ukupnu populaciju izloženu riziku (33-38).

Prema našim saznanjima ovo istraživanje je prvo koje je istraživalo učestalost sedam polimorfizama u šest gena (rs2004776 *AGT,* rs1799752 *ACE,* rs5196 *AGTR1,* rs1801253 *ADRB1,* rs13333226 *UMOD* te rs266729 i rs17300539 *ADIPOQ)* uključenih u različite biološke puteve regulacije AT u populaciji predhipertoničara i normotoničara. Budući da pojedini polimorfizmi ne mogu imati ključnu etiološku ulogu u multifaktorijalnim kompleksnim bolestima, kao što je AH, naglasak ovoga rada je stavljen i na istraživanje mogućih interakcija gen – gen i gen – okoliš tj. preciznije rečeno, demografskih, antropometrijskih, kliničkih, biokemijskih i okolišnih parametara te sveukupnih interakcija gen – gen – okoliš značajno povezanih s predhipertenzijom.

6.1. Povezanost genskih varijanti i predhipertenzije

Ovim istraživanjem nismo uočili razliku učestalosti pojedinih polimorfizama gena rs2004776 *AGT,* rs1799752 *ACE,* rs5196 *AGTR1,* rs1801253 *ADRB1,* rs13333226 *UMOD* te rs266729 i rs17300539 *ADIPOQ* između osoba s visoko normalnim AT (predhipertenzijom) u odnosu na osobe s optimalnim i normalnim AT. Također, nismo uočili razlike u raspodjeli pojedinih genotipova istrqaživanih polimorfizama u većine gena. Jedina značajna razlika je uočena za heterozigotne nositelje *C/G* polimorfizma rs266729 *ADIPOQ*. Skupina predhipertoničara je imala značajno manje (35,1 %) heterozigotnih nositelja *C/G* rs266729 nego skupina osoba s optimalnim i normalnim vrijednostima AT (44,7 %).

Usporedba naših rezultata učestalosti *minor* alela svih istraživanih polimorfizama u našoj cijeloj skupini s podacima projekta *1000Genome* pokazala je većim dijelom podudarnost s podacima za europsku populaciju. Međutim za dva *minor* alela smo pronašli značajnu razliku. Podjednaka rasprostranjenost je utvrđena za alel *D rs1799752 ACE* koja u europskoj populaciji iznosi 46 – 58 %, a unutar tog raspona nalaze se i rezultati našega istraživanjaa; 52,7 % u skupini normotoničara, te 49,7 % u predhipertoničara (116). Nadalje, učestalost *minor* alela *C* polimorfizma *rs5186 AGTR1* je u europskoj populaciji 27,2 %, kao i u našim skupinama (27,7 %

normotoničari, te 26,6 % u predhipertoničari) (132). Rasprostranjenost *minor* alela *A* rs17300539 *ADIPOQ* je u europskoj populaciji 7,4 %, dok je u ovom istraživanju 9,7 % u normotoničara, te 7,2 % u predhipertoničara (194). Učestalost *minor* alela *G* polimorfizma *rs266729 ADIPOQ* je u europskoj populaciji 28,1 %, dok je naš rezultat 30,6 % u normotoničara, te 28,7 % u predhipertoničara (193). Značajna razlika učestalosti je nađena za *minor* alel *T* polimorfizma rs2004776 *AGT*, koja u europskoj populaciji iznosi 22,6 %, dok je u našoj populaciji znatno veća, kod normotoničara 27,6 %, te 30,5 % u skupini predhipertoničara (P = 0,001) (97). Druga značajna razlika rasprostranjenosti je nađena za *minor* alel *G* polimorfizma *rs13333226 UMOD*, koja u europskoj populaciji iznosi 20,2 %, dok naši rezultati ukazuju na manju učestalost, 17,6 % kod normotoničara, te 14,0 % u predhipertoničara (P = 0,006) (160). Uočene razlike učestalosti pojedinih varijantnih alela ne iznenađuje s obzirom da referentna baza projekta *1000Genomes* ne sadrži podatke iz hrvatske populacije, a poznato je kako genska raznolikost postoji između etničkih skupina.

Ovaj rad je prikazao rezultate predviđanja pojedinih genskih modela rizika za predhipertenziju u hrvatskoj populaciji koji su pokazali značajnu povezanost heterozigotnoga modela (*CG vs GG+CC*) polimorfizma rs266729 *ADIPOQ* u smislu smanjenoga rizika za predhipertenziju (OR 0,66; 95 % CI 0,47-0,92; P = 0,014) tj. pojava predhipertenzije je 34 % manje vjerojatna u heterozigotnih nositelja rs266729, što se potvrđuje naš nalaz veće učestalosti heterozigotnih nositelja C/G *ADIPOQ* u skupini ispitanika s optimalnim i normalnim AT. Naš nalaz heterozigotnosti rs266729 kao mogućega zaštitnog čimbenika predhipertenzije je u suglasju s objavljenim rezultatima meta-analize koja je također za heterozigotni model polimorfizma rs266729 utvrdila značajno manji rizik (OR 0,81; 95 % CI 0,63–1,04) za pojavnost AH, ali samo u bjelačkoj subpopulaciji (188). Navedena meta-analiza o povezanosti polimorfizama *ADIPOQ* i AH je obradila 11 objavljenih istraživanja na ukupno 4837 ispitanika s AH i 5618 kontrola te je jedan od zaključaka povezanost *minor* alela *G* s većim rizikom za AH koju mi nismo potvrdili vjerojatno zbog maloga broja ispitanika s prisutnim genotipom *G*/*G* (samo 18 u skupini predhipertoničara, a 30 u kontrolnoj skupini).

6.2. Povezanost genskih varijanti i kardiovaskularnoga i renalnoga rizika

Koncept tzv. kardiorenalnoga kontinuuma temelji se na spoznaji o početku progresije KV bolesti samim postojanjem čimbenika rizika (npr. povišeni AT i šećerna bolest) te o vrlo sličnoj spoznaji nastanka KBB povezanoga s čimbenicima rizika. Jedan od njih je svakako povišen AT budući da je AH vodeći uzrok terminalne faze KBB koja počinje s prvim znakovima oštećenja bubrežene funkcije.

Poznat je uzročno-posljedični učinak vrijednosti AT na pojavnost KV bolesti kao što su dokazali Havulinna i sur. svojim istraživanjem modela od ukupno 32 SNP-a s utjecajem na vrijednosti AT kao genskoga biljega za KV bolesti. Njihovi rezultati su dokazali snažnu povezanost takvoga KV genskoga biljega s AT, AH i incidencijom KV bolesti neovisno o tradicionalnim KV čimbenicima rizika (219). Temeljem njihovoga istraživanja i mi smo proveli analizu učestalosti polimorfizama kao i povezanosti genskih modela i KV rizika u našoj skupini ispitanika. Što se tiče raspodjele *minor* alela nije nađena razlika u skupinama s niskim i umjerenim KV rizikom. Međutim, rezultat istraživanja genskih modela je ukazao na moguću povezanost dominantnoga (*CT/TT* vs *CC*) modela za polimorfizam rs2004776 *AGT* (OR 3,71; 95 % CI 1,02-13,46; P = 0,046) što upućuje da bi nositelji *minor* alela *T* mogli imati povećan KV rizik. Potrebno je napomenuti da je interval pouzdanosti ovog modela vrlo širok što ukazuje na veliku varijabilnost unutar ispitivane populacije, te su za zaključak potrebna dodatna istraživanja na većem broju ispitanika u kategoriji s umjerenim KV rizikom. Ovaj nalaz, koji ne možemo sa sigurnošću potvrditi, je u skladu s prethodno objavljenim rezultatima GWAS koji je ukazao na povezanost *minor* alela *T* rs2004776 u intronu I gena *AGT* s višim vrijednostima AT (61).

Što se tiče renalnoga rizika, također nije nađena razlika u raspodjeli *minor* alela niti u raspodjeli genotipova u skupinama s niskim i umjerenim KBB rizikom. Međutim, rezultat analize genskih modela je ukazao na moguću povezanost dominantnoga (*GC/CC vs GG*) modela za polimorfizam rs1801253 *ADRB1* (OR 0,11; 95 % CI 0,02-0,63; P = 0,013) što upućuje da bi nositelji *minor* alela *C* mogli imati smanjen KBB rizik. Do sada je dokazana povezanost rs1801253 s višim vrijednostima SAT i DAT, KV bolestima, i o povezanosti s učinkovitosti metoprolola (73,87-91,137,138,144,145). Alel *C* je odgovoran za zamjenu aminokiseline glicina s argininom na poziciji 389 C-terminalnog kraja receptora.

Za tumačenje rezultata za KV i KBB rizik ovi nalazi moraju biti potvrđeni na većim skupinama ispitanika s umjerenim KV i KBB rizikom.

6.3. Povezanost genskih varijanti s određivanim parametrima

Osim analize genskih rizičnih modela za predhipertenziju i KV rizik, napravljena je i analiza povezanosti pojedinih genskih varijanti s ostalim parametrima. Naši rezultati potvrđuju „zaštitni“ utjecaj polimorfizma rs13333228 *UMOD* za AH budući da ukazuju na značajnu povezanost *minor* alela *G* s nižim vrijednostima SAT i DAT (60,73,85,156). Nadalje, uočili smo povezanost *minor* alela *A* rs17300539 *ADIPOQ* s nižim vrijednostima SAT i manjom koncentracijom kreatinina u serumu, ali i većom tjelesnom masom, opsegom struka i ITM u cijeloj skupini. Ovaj nalaz je u indirektnom skladu s povezanosti *minor* alela *A* rs17300539 s većim koncentracijama ADPN u cirkulaciji (163). Mi nismo u ovom istraživanju analizirali

koncentraciju ADPN u plazmi, ali nalaz povezanosti ovoga alela s nižim vrijednostima SAT je istoznačnoga smjera kao i nalaz meta-analize koji je dokazao 6 % smanjeni rizik od AH povezan s povećanjem koncentracije adiponektina za 1 μg / mL (95 %CI 0,92-0,97) (180). Nalaz utjecaja ovoga polimorfizma na pretilost je potpuno u suglasju s rezultatima meta-analize o povezanosti ovoga polimofizma i njegovoga utjecaja na tjelesnu masu u bjelačkoj populaciji (184).

6.4. Povezanost ostalih čimbenika s predhipertenzijom, kardiovaskularnim i renalnim rizikom

S ciljem istraživanja međusobnih interakcija gen-gen, gen-okoliš i gen-gen-okoliš, morali smo analizirati koji su ostali čimbenici značajno povezani s pojavom predhipertenzije. Rezultati su pokazali povećan rizik pojavnosti predhipertenzije s muškim spolom, s većom tjelesnom masom i opsegom struka, ITM, frekvencijom srca, većom koncentracijom glukoze na tašte, CRP, ukupnim kolesterolom i LDL-kolesterolom. Naši rezultati su potpuno u skladu s već objavljenim rezultatima istraživanja koja su obuhvatila rizične čimbenike predhipertenzije (19,22,23).

Budući da je mali broj ispitanika bio u kategoriji „umjeren KV rizik“ izrazili smo KV rizik kao postotak tj. kontinuiranu varijablu. Dokazana je značajna povezanost većega KV rizika s većom tjelesnom masom i opsegom struka, ITM, s prekomjernom TM i debljinom (kategorijama ITM), stanjem predhipertenzije, koncentracijom glukoze na tašte, LDL – kolesterola i triglicerida.

Kako smo ranije spomenuli mali broj ispitanika je bio svrstan u kategoriju „umjeren KBB rizik“ pa smo KBB rizik izrazili kao eGFR i ACR. Naši rezultati ukazuju na povezanost nižih vrijednosti SAT s višom eGFR, dok je ACR povezan s umjerenim, a ne niskim KV rizikom.

6.5. Povezanost interakcija gen – ostali čimbenici s predhipertenzijom

Odabirom značajnih modela analizirali smo interakcije gen – ostali čimbenici s utjecajem na nastanak predhipertenzije te je rezultat konačni model međusobnih interakcija koji uključuje pro-predhipertenzivni značajan učinak muškoga spola, tjelesne mase, frekvencije srca, koncentracije glukoze na tašte i ukupnoga kolesterola, dok zaštitno djelovanje unutar ovoga modela imaju tjelesna visina i heterozigotni (*G/A*) genotip rs17300539 *ADIPOQ*. Unutar ovoga modela interakcija nalaze se i rizik od razvoja metaboličkih komplikacija debljine, koncentracija LDL-kolesterola i triglicerida, ali bez značajnoga utjecaja na ukupno predviđanje pojave predhipertenzije. Navedeni klinički i biokemijski čimbenici modela su u suglasju s već navedenim epidemiološkim podacima populacije s povišenim AT. Nalaz heterozigotnoga genotipa rs17300539 *ADIPOQ* je povezan s prethodnim nalazom povezanosti *minor* alela istoga polimorfizma s nižom vrijednosti SAT, te potvrđuje svoje mjesto u etiologiji AH (163,180).

6.6. Povezanost interakcija gen – ostali čimbenici s kardiovaskularnim i renalnim rizikom

Analiza interakcija gen – ostali čimbenici na pojavnost KV rizika (izraženog kao %) je rezultirala modelom međusobnoga djelovanja opsega struka, predhipertenzije, koncentracije LDL-kolesterola i triglicerida te eGFR. U ovom modelu svi čimbenici svojim porastom uzrokuju veći KV rizik, izuzev eGFR gdje je odnos obrnut. Unutar ovoga modela se još nalaze i rizik od razvoja metaboličkih komplikacija debljine, koncentracija glukoze na tašte te omjer alfa-1-mikroglobulina u mokraći. Međitim ovi čimbenici nemaju značajan utjecaj na ukupni model KV rizika. Istovjetna analiza interakcija gen – ostali čimbenici na pojavnost KV rizika (izraženom kao kategorije) rezultirala je modelom koji uključuje koncentraciju kreatinina u serumu, glukoze na tašte i LDL-kolesterola uz heterozigotni genotip (*C/T*) rs2004776 *AGT.* Svi čimbenici modela djeluju u smjeru povećavanja KV rizika. Unutar ovoga modela se još nalaze i predhipertenzija i *T/T* genotip rs2004776, ali bez značajnoga utjecaja na model. Naše istraživanje je potvrdilo već dobro opisane rizične čimbenike KV rizika (19-24). Ističemo vrijedan nalaz već spomenutoga polimorfizma *AGT* koji potvrđuje moguću važnost genske predispozicije za KV rizik povezan s RAAS (61). Zbog malog broja ispitanika potrebno je provesti replikacijsko istraživanje.

Istovjetna analiza je učinjena i za KBB rizik te je model rizika prema eGFR značajno povezan s KV rizikom, a uključuje tjelesnu visinu, koncentraciju ukupnoga koleasterola i kreatinina u mokraći. Model za KBB rizik prema ACR uključuje ženski spol koncentraciju ukupnoga kolesterola, dok KBB rizik izražen prema kategorijama uključuje samo *C/G* i *G/G* genotipa rs1801253 *ADRB1* s negativnom povezanosti. S obzirom da u literaturi nismo našli dokumentirane slične korelacije, a i zbog maloga broja ispitanika i u ovom slučaju je potrebno provesti replikacijko istraživanje.

6.7. Povezanost interakcija gen – gen s predhipertenzijom

Naše istraživanje je pokazalo četiri značajne interakcije gen – gen koje su u konačnici pozitivno povezane s predhipertenzijom: dva polimorfizma (rs1799752 *ACE* + rs266729 *ADIPOQ*) s dva značajna genotipa; četiri polimorfizma (rs1799752 *ACE* + rs13333226 *UMOD* + rs17300539 *ADIPOQ* + rs266729 *ADIPOQ*) s jednim značajnim genotipom; pet polimorfizama (rs1799752 *ACE* + rs17300539 *ADIPOQ* + rs266729 *ADIPOQ* + rs5186 *AGTR1* + rs2004776 *AGT)* s dva značajna genotipa; i pet polimorfizama (rs1799752 *ACE* + rs13333226 *UMOD* + rs17300539 *ADIPOQ* + rs266729 *ADIPOQ* + rs5186 AGTR1) s dva značajna genotipa. Nadalje, identificirana su dva haplotipa značajno pozitivno povezana s nastankom predhipertenzije. Prvi značajan haplotip je hIAGC koji nosi 41 % veću vjerojatnost za pojavu predhipertenzije. Taj haplotip je rezultat međusobne interakcije četiri polimorfizma: rs1799752 *ACE* + rs13333226

UMOD + rs17300539 *ADIPOQ* + rs266729 *ADIPOQ*. Učestalost ovoga haplotipa je za 8 % značajno veća u predhipertoničara. Drugi haplotip je hIAGCA i nosi 47 % veću vjerojatnost za predhipertenziju; rezultat je međusobne interakcije pet polimorfizama: *rs1799752 ACE* + rs13333226 *UMOD* + rs17300539 *ADIPOQ* + rs266729 *ADIPOQ* + rs5186 *AGTR1*. Učestalost u skupini normotoničara je 18 %, a granično značajno veća u predhipertoničara i iznosi 23 %. Ovi rezultati potvrđuju dosadašnja saznanja o genskoj predispoziciji povišenih vrijednosti AT te u budućnosti mogu biti dio istraživanja međusobnih interakcija gena u etiologiji AH na puno većoj populaciji (54-69).

Usporedbom pojedinih genotipova rezultati su pokazali da je u većini interakcija prisutan kao genotip visokoga rizika tj. povezanoga s predhipertenzijom heterozigot *I/D ACE*, homozigot *major* alela *C/C* rs266729 *ADIPOQ*, homozigot *major* alela *G/G* rs17300539 *ADIPOQ*, te homozigot *major* alela *A/A* rs13333226 *UMOD*. Ovaj rezultat je u skladu s povezanošću *major* alela *C* varijante *ADIPOQ* rs266729 s povećanim oksidacijskim stresom koji je jedan od etioloških čimbenika AH (220). Zanimljiv je nalaz u svim kombinacijama visokoga rizika homozigota *major* alela *G/G ADIPOQ* rs17300539 koji je povezan s nižim koncentracijama adiponektina u serumu i proturječnim rezultatima istraživanja povezanosti sa šećernom bolesti tipa 2, pretilosti, ali rizikom od infarkta miokarda u mlađoj populaciji (163,182,184,186,191,221-224). Ovaj rezultat je utoliko zanimljiviji jer je poznat nalaz nižih koncentracija adiponektina u hipertoničara te negativna povezanost između koncentracije adiponektina i rizika od nastanka AH (180). Nalaz u kombinacijama visokoga rizika *major* alela *A* je kontradiktoran činjenici da je *minor* alel *C AGTR1* rs5186 povezan s većom reaktivnošću receptora za angiotenzin II tipa 1 i posljedično AH (83,118,119,215). Nalaz homozigota *major* alela *A/A UMOD* rs13333226 je u skladu s objavljenim podacima budući da njegov *minor* alel *G* ima protektivnu ulogu u nastanku AH (60,85,156). Rezultati interakcija gen – gen prema modelu genotipova visokoga i niskoga rizika upućuju na značajne interakcije gen – gen istraživanih gena koje konačno definiraju fenotip, u ovom slučaju predhipertenziju. Naš rezultat o značajno povezanim interakcijama gen – gen svih istraživanih gena kao i određivanje njihovih haplotipova koji povećavaju rizik za predhipertenziju potvrđuje kompleksnost bioloških puteva kontrole AT.

Što se tiče KV i KBB rizika, zbog maloga broja ispitanika u skupini s umjerenim rizikom nije bilo moguće odrediti pojedine povezane haplotipove.

6.8. Povezanost interakcija gen – gen – ostali čimbenici s predhipertenzijom, kardiovaskularnim i renalnim rizikom

Važna analiza multivarijantnoga predviđanja predhipertenzije je obuhvatila međusobne značajne interakcije gen – gen – okoliš. Multivarijantno predviđanje predhipertenzije modelom interakcija gen – gen – ostali čimbenici obuhvaća statistički značajan utjecaj spola, tjelesne visine

i tjelesne mase, koncentracije glukoze na tašte, te polimorfizma rs17300539 tj. *minor* alel *A*. Osim gore navedenih značajnih parametara još su u model uključeni dob, frekvencija srca te interakcija dva polimorfizma (rs1799752 *ACE* + rs266729 *ADIPOQ*), ali oni nemaju značajan utjecaj unutar modela.

Model interakcija gen – gen – ostali čimbenici povezan sa skupnim ishodom predhipertenzije i KV rizika je obuhvatio statistički značajan utjecaj tjelesne mase, koncentracije kreatinina u serumu i glukoze na tašte, interakcije četiri polimorfizma (rs1799752 *ACE* + rs13333226 *UMOD* + rs17300539 *ADIPOQ* + rs266729 *ADIPOQ*) tj. haplotip hIAGC; te interakcije pet polimorfizama (rs1799752 *ACE* + rs17300539 *ADIPOQ* + rs266729 *ADIPOQ* + rs5186 *AGTR1* + rs2004776 *AGT*) tj. dva moguća haplotipa hIGCAC i hDGCAC. Osim navedenoga, još su u model uključeni, ali bez značajnoga utjecaja: rs2004776 *AGT (*alel *T),* interakcija dva polimorfizma (rs1799752 *ACE* + rs266729 *ADIPOQ*); kao i interakcija pet polimorfizama (rs1799752 *ACE* + rs13333226 *UMOD* + rs17300539 *ADIPOQ* + rs266729 *ADIPOQ* + rs5186 AGTR1).

Model interakcija gen – gen – ostali čimbenici povezan sa skupnim ishodom predhipertenzije i KBB rizika je obuhvatio statistički značajan utjecaj tjelesne mase, koncentracije glukoze na tašte i triglicerida te polimorfizam rs17300539 *ADIPOQ* (alel *A*). Nadalje, u model je uključena, ali bez značajnosti, međusobna interakcija dva polimorfizma (rs1799752 *ACE* + rs266729 *ADIPOQ*).

Model interakcija gen – gen – ostali čimbenici povezan sa skupnim ishodom predhipertenzije, KV i KBB rizik je obuhvatio statistički značajan utjecaj tjelesne mase, koncentracije glukoze na tašte, polimorfizam rs17300539 *ADIPOQ* (alel *A*). Bez značajnoga utjecaja u modelu sudjeluju i polimorfizam rs2004776 *AGT* (alel *T*) kao i interakcija dva polimorfizma (rs1799752 *ACE* + rs266729 *ADIPOQ*).

Zaključno, uz već dobro poznate biokemijske rizične čimbenike identificirali smo i genske interakcije kao moguće prediktore razvoja predhipertenzije, kao i KV i KBB rizika.

6.9. Znanstveni i klinički doprinos provedenoga istraživanja

Prema našim saznanjima, naše istraživanje je prvo ovako strukturirano istraživanje međusobnoga djelovanja gena i antropometrijskih, biokemijskih kao i okolišnih čimbenika u mlađoj populaciji predhipertoničara i normotoničara. Nema dostupnih literaturnih podataka s kojima bi se rezultati ovoga istraživanja interakcija gen – gen i interakcija gen – gen – ostali čimbenici mogli usporediti. Usprkos tome, možemo zaključiti da smo putem provedenih sveobuhvatnih statističkih analiza potvrdili i pokazali prisutnost značajnih interakcija gen – gen i gen – ostali određivani parametri (antropometrijski, biokemijski, okolišni čimbenici), ali i

interakcija gen – gen – ostali određivani parametri u etiologiji predhipertenzije. Naše istraživanje je utvrdilo postojanje dva haplotipa koji su značajno povezani s predhipertenzijom. Prvi je hIAGC (rs1799752 *ACE* + rs13333226 *UMOD* + rs17300539 *ADIPOQ* + rs266729 *ADIPOQ*). Drugi haplotip je hIAGCA (*rs1799752 ACE* + rs13333226 *UMOD* + rs17300539 *ADIPOQ* + rs266729 *ADIPOQ* + rs5186 *AGTR1*). Nadalje, značajan je i nalaz modela multivarijantnoga predviđanja predhipertenzije (interakcija gen – gen – ostali određivani parametri) koji uključuje spol, tjelesnu masu, koncentraciju glukoze na tašte te polimorfizam rs17300539 tj. *minor* alel *A*, ali i dob, srčanu frekvenciju te interakciju dva gena (rs1799752 *ACE* + rs266729 *ADIPOQ*). Time smo ukazali na mogući značaj gena koji kodiraju proteine uključene u bitne biološke puteve odgovorne za kontrolu AT. Važno je naglasiti da su isti proteini uključeni i u cijeli kardiorenalni kontinuum.

Iz priloženih rezultata nameće se potreba longitudinalnoga praćenja naših ispitanika s naglaskom na kliničke i biokemijske čimbenike.

6.10. Ograničenja istraživanja

Ograničenja ovog istraživanja su relativno mali broj ispitanika s obzirom na broj istraživanih polimorfizama kao i ograničeni broj ispitivanih polimorfizama. Postoji vjerojatnost da su na fenotip utjecali i neki polimorfizmi gena uključenih u kontrolu AT koje nismo određivali. Osim toga, kreatinin u serumu je određen samo jednom što ne daje dovoljno sigurnu informaciju potrebnu za postavljanje dijagnoze KBB. Za to bi bilo potrebno ponoviti određivanje kreatinina u serumu nakon tri mjeseca.. Međutim i druga epidemiološka istraživanja su koristila često samo jedno mjerenje koncentracije kreatinina u serumu. Ograničenje je i dizajn istraživanja koje jepresječno i opservacijsko, u planu je praćenje ispitanika te prikupljanje novih podataka o njihovim vrijednostima AT, pobolu i smrtnosti.

Uz to, postoji potreba za uključenjem novih ispitanika iste dobne skupine, kako bi mogli potvrditi utvrđen model interakcija na većoj populaciji, ali i u replikacijskim studijama. Nadalje, bilo bi dobro provesti novim metodama molekularne dijagnostike sekvenciranje ovih gena umjesto ciljanoga pretraživanja polimorfizama što bi pružilo bolji uvid u međusobne odnose gena uključenih u kardiorenalni kontinuum te otkrilo i rijetke varijante gena sa značajnim učinkom na fenotip. Sve to bi pridonijelo boljem razumijevanju istraživane problematike i pravovremenom otkrivanju osoba sa sklonošću progresije AT iz predhipertenziju u stabilnu AH. Na taj način mogli bismo poduzimati personalizirane preventivne mjere i time smanjiti KV morbiditet i mortalitet.

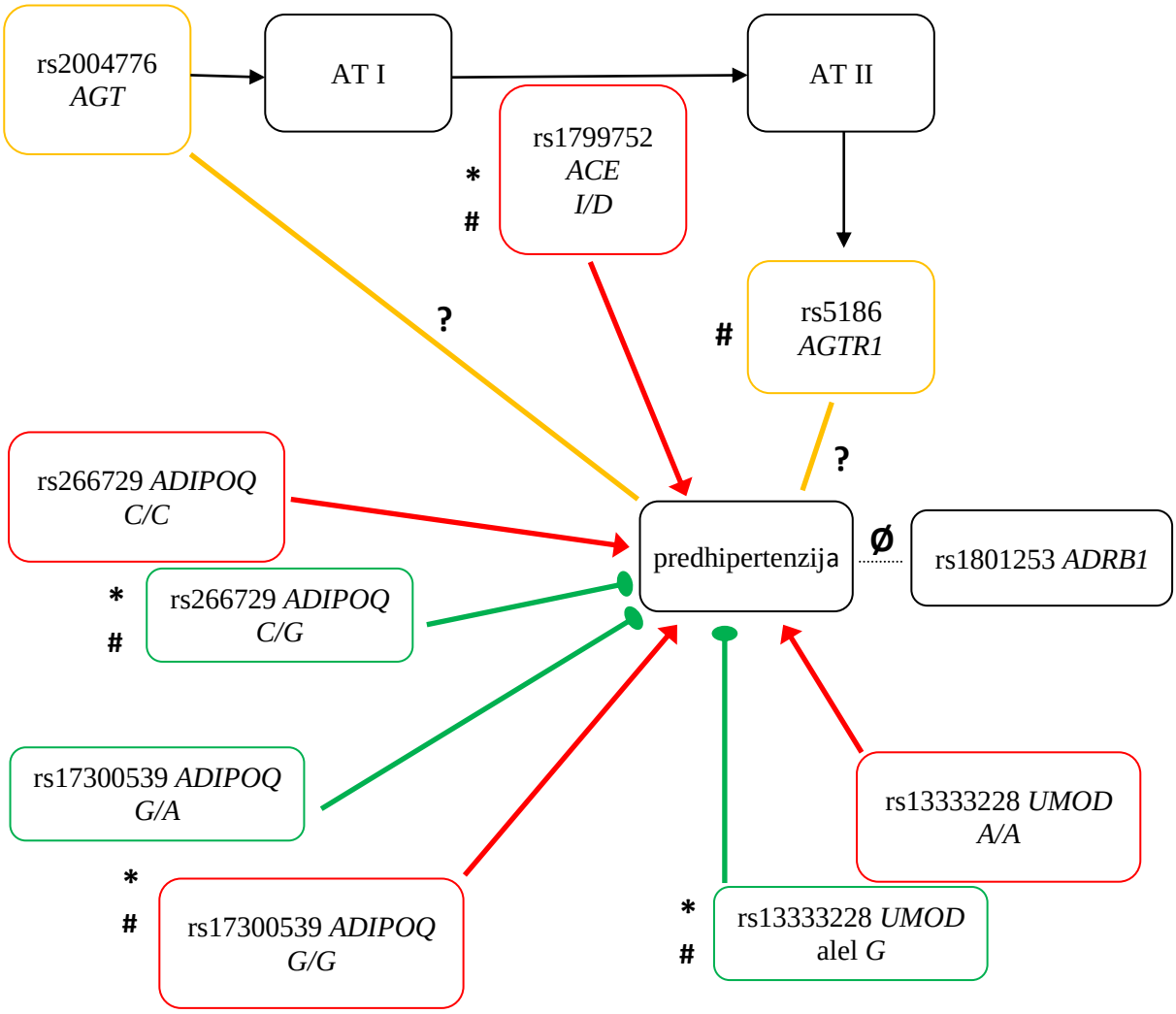
7. ZAKLJUČCI

1. Istraživani polimorfizmi gena *AGT, ACE, AGTR1, ADRB1, UMOD* i *ADIPOQ* nisu učestaliji u predhipertoničara u odnosu na normotoničare.
2. Raspodjela pojedinih genotipova istraživanih polimorfizama između normotoničara i predhipertoničara nije različita osim što su predhipertoničari imali manje heterozigotnih nositelja (*C/G*) rs266729 *ADIPOQ*.
3. Učestalost *minor* alela u našoj istraživanoj populaciji podudarala se s podacima europske populacije unutar projekta *1000 Genome* osim što je učestalost *minor* alela *T* rs2004776 *AGT* veća, a učestalost *minor* alel *G rs13333226 UMOD* manja u naših ispitanika u odnosu na europsku populaciju. Te razlike možda su posljedica maloga broja ispitanika i niske frekvencije ovih *minor* alela, ali moguće je da to odražava stvarne razlike učestalosti genskih varijacija hrvatske populacije u odnosu na druge europske populacije.
4. Heterozigotni model (*CG vs. GG/CC*) rs266729 *ADIPOQ* povezan je s manjim rizikom pojavnosti predhipertenzije što je u skladu s rezultatima drugih autora koji su opazili manju pojavnost arterijske hipertenzije u osoba s ovim polimorfizmom.
5. *Minor* alel *G* rs13333228 *UMOD* i *minor* alel *A* rs17300539 *ADIPOQ* povezani su s nižim vrijednostima sistoličkoga arterijskog tlaka. Dodatno *minor* alel *G* rs13333228 *UMOD* povezan je s nižim vrijednostima dijastoličkoga arterijskog tlaka, a *minor* alel *A* rs17300539 *ADIPOQ* s većom tjelesnom masom, opsegom struka i indeksom tjelesne mase. Ti rezultati su u skladu s rezultatima drugih autora u bjelačkoj populaciji.
6. Muški spol, povećana tjelsna masa, indeks tjelesne mase, opseg struka, srčana frekvencija, veća koncentracija glukoze, ukupnoga kolesterola, LDL-kolesterola i CRP povezani su s većim rizikom za predhipertenziju što je u skladu s rezultatima drugih autora.
7. Analizirajući interakciju gena i ostalih čimbenika rizika za nastanak predhipertenzije dobili smo model u kojem su muški spol, tjelesna masa, srčana frekvencija, koncentracija glukoze i kolesterola pro-predhipertenzivni, dok su tjelesna visina i heterozigotni genotip (*G/A*) rs17300539 *ADIPOQ* protektivni za nastanak predhipertenzije. Protektivni učinak ovoga polimorfizma u skladu je s rezultatima o povezanosti *minor* alela *A* rs17300539 *ADIPOQ* s nižim vrijednostima sistoličkoga arterijskog tlaka.
8. Dokazali smo postojanje četiri značajne interakcije gen – gen s predhipertenzijom u koje su uključeni genotipovi povišenoga rizika za predhipertenziju: *I/D* rs1799752 ACE, *C/C* rs266729ADIPOQ, *G/G* rs17300539 *ADIPOQ* i *A/A* rs13333226 *UMOD*.

Identificirali smo dva haplotipa povezana s nastankom predhipertenzije:

- hIAGC (rs1799752 *ACE* + rs13333226 *UMOD* + rs17300539 *ADIPOQ* + rs266729 *ADIPOQ*) koji nosi 41 % veću vjerojatnost za predhipertenziju
- hIAGCA (rs1799752 *ACE* + rs13333226 *UMOD* + rs17300539 *ADIPOQ* + rs266729 *ADIPOQ* + rs5186 *AGTR1*) i on nosi 47 % veću vjerojatnost za predhipertenziju

9. Prema dobivenim rezultatima povezanosti s predhipertenzijom od sedam istraživanih polimorfizama izdvajaju se oba polimorfizma *ADIPOQ*, te polimorfizmi gena *UMOD* i gena *ACE*. Dodatno se važnim čini podatak da je polimorfizam rs17300539 *ADIPOQ* ušao u model interakcije gena i okoliša što zahtijeva daljnja istraživanja. Dobiveni rezultati za istraživane polimorfizme *AGT* i *AGTR1* su nekonzistentni, dok nismo dokazali nikakvu povezanost istraživanoga polimorfizma *ADRB1* s predhipertenzijom (slika 7.1).
10. Rezultate analiza o povezanosti s kardiovaskularnim i renalnim rizikom treba proširiti na većem broju ispitanika.



Slika 7.1. Povezanost istraživanih polimorfizama gena *AGT, ACE, AGTR1, ADRB1, UMOD* i *ADIPOQ* s predhipertenzijom.

Legenda: žuta linija i obrub, podatci su inkonzistentni; crvena strelica i obrub, utječe na predhipertenziju u smislu povećanja rizika ; zelena linija i obrub, utječe na predhipertenziju, u smislu smanjenja rizika; Ø nije dokazana povezanost; ? povezanost je upitna, rezultati su nekonzistentni; * aleli su dio haplotipa hIAGC; # aleli su dio haplotipa hIAGCA

8. SAŽETAK

Arterijska hipertenzija (AH) je glavni nezavisni čimbenik rizika za kardiovaskularnu (KV) i cerebralnu smrtnost i pobole i jedan je od glavnih čimbenika rizika kronične bubrežne bolesti. Predhipertenzija (PHT) tj. visoko normalan arterijski tlak (AT) također je povezana s KV rizikom i rizikom od progresije u AH. Dosadašnja istraživanja genske podloge predhipertenzije su nedostatno provedena, a rezultati ukazuju na moguću povezanost određenih gena uključenih u etiopatogenezu AH i PHT. Manjkavost i ponekad inkonzistentnost informacija i rezultata o ulozi polimorfizama gena u etiopatogenezi PHT bili su poticaj ovom istraživanju. Naša hipoteza bila je da se polimorfizmi rs2004776 *AGT*, rs1799752 *ACE*, rs5196 *AGTR1*, rs1801253 *ADRB1*, rs13333226 *UMOD* te rs266729 i rs17300539 *ADIPOQ*, koji su povezani s AH i metaboličkim sindromom, učestalije nalaze u osoba s visoko normalnim AT tj. predhipertenzijom nego u osoba s optimalnim i normalnim AT. Odabrali smo ove polimorfizme jer su ti geni uključeni u razne mehanizme koji dovode do porasta AT i metaboličkih komplikacija.

U ovo presječno, opservacijsko istraživanje je uključen 601 ispitanik; 319 s visoko normalnim AT (PHT, 120/80–139/89 mmHg), oba spola, dobi 20 – 45 godina, te 282 ispitanika s normalnim i optimalnim AT kao kontrolna skupina (NT).

Rezultati su pokazali da se istraživani polimorfizmi gena ne nalaze učestalije u skupini PHT nego u NT. Međutim, ustanovljena je značajno manja učestalost heterozigotnoga genotipa rs266729 *ADIPOQ* u PHT (35,1 %), u usporedbi s učestalosti u NT (44,7 %), P= 0,03. Izgled za pojavu PHT je 0,66 puta manji u heterozigotnih (*C/G*) nositelja rs266729 *ADIPOQ*. Dokazali smo značajnu povezanost *minor* alela *G* rs13333228 *UMOD* s nižim vrijednostima sistoličkoga i dijastoličkoga AT i *minor* alela *A* rs17300539 *ADIPOQ* s nižim vrijednostima sistoličkoga AT. Dodatno, naše istraživanje je rezultiralo određivanjem dva haplotipa koji su značajno pozitivno povezani s nastankom PHT. Prvi je hIAGC s 41 % većom vjerojatnosti za pojavu PHT (rs1799752 *ACE* + rs13333226 *UMOD* + rs17300539 *ADIPOQ* + rs266729 *ADIPOQ*). Učestalost ovoga haplotipa za 8 % veća u PHT nego u NT. Drugi haplotip je hIAGCA i ima 47 % veću vjerojatnost za pojavu PHT (*rs1799752 ACE* + rs13333226 *UMOD* + rs17300539 *ADIPOQ* + rs266729 *ADIPOQ* + rs5186 *AGTR1*). Učestalost hIAGCA u NT je 18 %, dok je u PHT 23 %. Nadalje, značajan je i nalaz modela multivarijantnoga predviđanja PHT (interakcija gen – gen – ostali određivani parametri) koji uključuje pro-predhipertenzivni značajan učinak muškoga spola, tjelesne mase, frekvencije srca, koncentracije glukoze na tašte i ukupnoga kolesterola, dok zaštitno djelovanje unutar ovog modela imaju tjelesna visina i heterozigotni (*G/A*) genotip rs17300539 *ADIPOQ*. Ukazali smo na mogući značaj gena koji kodiraju proteine uključene u

bitne biološke puteve odgovorne za kontrolu AT, koji između ostalih obuhvaćaju renin-angiotenzin-aldosteronski sustav, bubreg, središnji živčani sustav, krvožilje kao i masno tkivo.

Zaključno, provedenim analizama potvrdili smo i pokazali prisutnost značajnih interakcija gen – gen i gen – ostali određivani parametri (antropometrijski, biokemijski, okolišni čimbenici), ali i interakcija gen – gen – ostali određivani parametri u etiologiji PHT.

Ključne riječi: predhipertenzija, genski polimorfizam, *AGT, ACE, AGTR1, ADRB1, UMOD, ADIPOQ*

9. SUMMARY

Frequency of *AGT, ACE, AGTR1, ADRB1, UMOD* and *ADIPOQ* Genetic Polymorphisms in Prehypertension

Livija Šimičević, 2020

Arterial hypertension (AH) is a major independent risk factor for cardiovascular (CV) and cerebral mortality and morbidity and is one of the major risk factors for chronic kidney disease. Prehypertension (PHT) i.e. high normal arterial pressure (AP) is also associated with CV risk and risk of progression in AH. Previous studies of the genetic background of PHT have been insufficiently conducted, and the results indicate a possible association of certain genes involved in the etiopathogenesis of AH and PHT. The lack and sometimes inconsistency of information and results on the role of gene polymorphisms in the etiopathogenesis of PHT were the impetus to this research. Our hypothesis was that polymorphisms rs2004776 *AGT*, rs1799752 *ACE*, rs5196 *AGTR1*, rs1801253 *ADRB1*, rs13333226 *UMOD* and rs266729 and rs17300539 *ADIPOQ*, which are associated with AH and metabolic syndrome, are more common in individuals with high normal AP i.e. prehypertension than in individuals with optimal and normal AP. We chose these polymorphisms because these genes are involved in various mechanisms that lead to an increase in AP and metabolic complications.

In this cross-sectional, observational study, 601 subjects were included; 319 with high normal AP (PHT, 120/80–139/89 mmHg), both sexes, aged 20–45 years, and 282 subjects with normal and optimal AP as a control group (NT).

The results showed that the investigated gene polymorphisms are not found more frequently in the PHT group than in the NT. However, a significantly lower frequency of the heterozygous genotype rs266729 *ADIPOQ* was found in PHT (35.1%), compared to the frequency in NT (44.7%), P = 0.03. The incidence of PHT is 0.66-fold lower in heterozygous (*C/G*) carriers of rs266729 *ADIPOQ*. We demonstrated a significant association of the *minor* allele *G* rs13333228 *UMOD* with lower values of systolic and diastolic AP and the *minor* allele *A* rs17300539 *ADIPOQ* with lower values of systolic AP. Additionally, our study resulted in the identification of two haplotypes that were significantly positively associated with PHT formation. The first is hIAGC with a 41% higher probability of developing PHT (rs1799752 *ACE* + rs13333226 *UMOD* + rs17300539 *ADIPOQ* + rs266729 *ADIPOQ*). The frequency of this haplotype is 8% higher in PHT than in NT. The second haplotype is hIAGCA and is 47% more likely to develop PHT (rs1799752 *ACE* + rs13333226 *UMOD* + rs17300539 *ADIPOQ* + rs266729 *ADIPOQ* + rs5186 *AGTR1*). The frequency of hIAGCA in NT is 18%, while in PHT it is 23%.

Furthermore, the finding of a model of multivariate prediction of PHT (gene-gene-other determined parameters interaction) which includes a pro-prehypertensive significant effect of male sex, body weight, heart rate, fasting glucose concentration and total cholesterol is significant, while the protective effect within this model have body height and heterozygous (*G/A*) genotype rs17300539 *ADIPOQ*. We pointed to the possible importance of genes encoding proteins involved in essential biological pathways responsible for AP control, which include, among others, the renin-angiotensin-aldosterone system, the kidney, the central nervous system, blood vessels, and adipose tissue.

In conclusion, the performed analyzes confirmed and showed the presence of significant gene - gene and gene - other determined parameters interactions (anthropometric, biochemical, environmental factors), but also gene - gene - other determined parameters in the etiology of PHT.

Keywords: prehypertension, gene polymorphism, *AGT, ACE, AGTR1, ADRB1, UMOD, ADIPOQ*

10. POPIS LITERATURE

1. Robinson SC. Range of normal blood pressure: a statistical and clinical study of 11,383 persons. Arch Intern Med. 1939;64:409-44.
2. Neaton JD, Kuller L, Stamler J, Wentworth DN. Impact of systolic and diastolic blood pressure on cardiovascular mortality. U: Laragh JH, Brenner BM, ur. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2.izd. New York: Raven Press; 1995. Str.127-44.
3. Lowe LP, Greenland P, Ruth KJ, Dyer AR, Stamler R, Stamler J. Impact of major cardiovascular disease risk factors, particularly in combination, on 22-year mortality in women and men. Arch Intern Med. 1998;158:2007-14.
4. Lloyd-Jones DM, Evans JC, Larson MG, O'Donnell CJ, Wilson PW, Levy D. Cross-classification of JNC VI blood pressure stages and risk groups in the Framingham Heart Study. Arch Intern Med. 1999;159:2206-12.
5. Vasan RS, Larson MG, Leip EP, Evans JC, O'Donnell CJ, Kannel WB i sur. Impact of high normal blood pressure on the risk of cardiovascular disease. N Engl J Med. 2001;345:1291–7.
6. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. Lancet. 2002;360:1903-13.
7. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr i sur; National High Blood Pressure Coordinating Committee. The seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: The JNC 7 report. JAMA. 2003;289:2560-72.
8. Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G i sur. 2007 ESH-ESC Practice Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: ESH-ESC Task Force on the Management of Arterial Hypertension. J Hypertens 2007; 25:1751-62.
9. Guo X, Zhang X, Zheng L, Guo L, Li Z, Yu S i sur. Prehypertension Is Not Associated with All-Cause Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. PLoS ONE. 2013;8(4):e61796. doi:10.1371/journal.pone.0061796
10. Rapsomaniki E, Timmis A, George J, Pujades-Rodriguez M, Shah AD, Denaxas S i sur. Blood pressure and incidence of twelve cardiovascular diseases: lifetime risks, healthy life-years lost, and age-specific associations in 1.25 million people. Lancet. 2014;383:1899-911.

11. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE, Collins KJ, Dennison Himmelfarb C i sur. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. Hypertens Dallas Tex 1979. Hypertension. 2018;71:1269-324.
12. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M i sur. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension. J Hypertens. 2013; 31:1281-357.
13. Williams B, Mancia G, Spiering W, Rosei EA, Azizi M, Burnier M i sur. za the ESC Scientific Document Group. 2018 ESC/ESH guidelines for the management of arterial hypertension. Eur Heart J. 2018;39:3021-104.
14. Egan BM, Stevens-Fabry S. Prehypertension - prevalence, health risks, and management strategies. Nat Rev Cardiol 2015;12:289-300.
15. Haas GM, Bertsch T, Schwandt P. Prehypertension and cardiovascular risk factors in children and adolescents participating in the community-based prevention education program family heart study. Int J Prev Med. 2014;5:S50-56.
16. Vučak J, Katić M, Bielen I, Vrdoljak D, Lalić DI, Kranjčević K i sur. Association between hyperuricemia, prediabetes, and prehypertension in the Croatian adult population – a cross-sectional study. BMC Cardiovasc Disord. 2012;12:117. doi: 10.1186/1471-2261-12-117
17. Jelaković B, Željković-Vrkić T, Pećin I, Dika Z, Jovanović A, Podobnik D i sur. Arterijska hipertenzija u Hrvatskoj. Rezultati EH-UH Studije. Acta Med Croatica. 2008;61:287-92.
18. Pećin I, Samovojska R, Heinrich B, Željković-Vrkić T, Laganović M, Jelaković B. Hypertension, overweight and obesity in adolescents: the CRO-KOP study. Coll Antropol. 2013;37:761-4.
19. Grotto I, Grossman E, Huerta M, Sharabi Y. Prevalence of prehypertension and associated cardiovascular risk profiles among young Israeli adults. Hypertens Dallas Tex 1979. 2006;48:254-9.
20. Greenlund KJ, Croft JB, Mensah GA. Prevalence of heart disease and stroke risk factors in persons with prehypertension in the United States, 1999-2000. Arch Intern Med. 2004;164:2113-8.

21. Hsia J, Margolis KL, Eaton CB, Wenger NK, Allison M, Wu L i sur. Prehypertension and cardiovascular disease risk in the Women's Health Initiative. Circulation. 2007;115:855-60.
22. Chrysohoou C, Pitsavos C, Panagiotakos DB, Skoumas J, Stefanadis C. Association between prehypertension status and inflammatory markers related to atherosclerotic disease: The ATTICA Study. Am J Hypertens. 2004;17:568-73.
23. King DE, Egan BM, Mainous AG, Geesey ME. Elevation of C-reactive protein in people with prehypertension. J Clin Hypertens Greenwich Conn. 2004;6:562-8.
24. Kim BJ, Lee HJ, Sung KC, Kim BS, Kang JH, Lee MH i sur. Comparison of Microalbuminuria in 2 Blood Pressure Categories of Prehypertensive Subjects. Circ J. 2007;71:1283-7.
25. Mohabansi S, Vadke S, Deol DD, Pandey M. Prevalence of Hyperuricemia and Microalbuminuria in Prehypertension. Ann Int Med Dent Res 2016;2:13-7.
26. Shen Y, Chang C, Zhang J, Jiang Y, Ni B, Wang Y. Prevalence and risk factors associated with hypertension and prehypertension in a working population at high altitude in China: A cross-sectional study. Environ Health Prev Med. 2017;22:19. doi: 10.1186/s12199-017-0634-7
27. Lin Y, Lai X, Chen G, Xu Y, Huang B, Chen Z i sur. Prevalence and risk factors associated with prehypertension and hypertension in the Chinese She population. Kidney Blood Press Res. 2012;35:305-13.
28. Qureshi AI, Suri MF, Kirmani JF, Divani AA, Mohammad Y. Is prehypertension a risk factor for cardiovascular diseases? Stroke. 2005;36:1859-63. doi:10.1161/01.STR.0000177495.45580.f1
29. Julius S, Nesbitt SD, Egan BM, Weber MA, Michelson EL, Kaciroti N i sur. Feasibility of treating prehypertension with an angiotensin-receptor blocker. N Engl J Med. 2006;354:1685-97.
30. Gu D, Wildman RP, Wu X, Reynolds K, Huang J, Chen C-S i sur. Incidence and predictors of hypertension over 8 years among Chinese men and women. J Hypertens. 2007;25:517-23.
31. Lüders S, Schrader J, Berger J, Unger T, Zidek W, Böhm M i sur. The PHARAO study: prevention of hypertension with the angiotensin-converting enzyme inhibitor ramipril in patients with high-normal blood pressure: a prospective, randomized, controlled prevention trial of the German Hypertension League. J Hypertens. 2008;26:1487-96.
32. Liszka HA, Mainous AG, King DE, Everett CJ, Egan BM. Prehypertension and cardiovascular morbidity. Ann Fam Med. 2005;3:294-9.

33. Huang Y, Wang S, Cai X, Mai W, Hu Y, Tang H i sur. Prehypertension and incidence of cardiovascular disease: a meta-analysis. BMC Med. 2013;11:177. doi: 10.1186/1741-7015-11-177
34. Guo X, Zhang X, Guo L, Li Z, Zheng L, Yu S i sur. Association between pre-hypertension and cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. Curr Hypertens Rep. 2013;15:703-16.
35. Huang Y, Cai X, Liu C, Zhu D, Hua J, Hu Y i sur. Prehypertension and the risk of coronary heart disease in Asian and Western populations: a meta-analysis. J Am Heart Assoc. 2015;4:e001519. doi: 10.1161/JAHA.114.001519
36. Huang Y, Su L, Cai X, Mai W, Wang S, Hu Y, Wu Y, Tang H, Xu D. Association of all-cause and cardiovascular mortality with prehypertension: a meta-analysis. Am Heart J. 2014;167:160-8.
37. Huang Y, Cai X, Li Y, Su L, Mai W, Wang S i sur. Prehypertension and the risk of stroke: a meta-analysis. Neurology. 2014;82:1153-61.
38. Han M, Li Q, Liu L, Zhang D, Ren Y, Zhao Y i sur. Prehypertension and risk of cardiovascular diseases: a meta-analysis of 47 cohort studies. J Hypertens. 2019;37:2325-32. doi: 10.1097/HJH.0000000000002191
39. Moreira LB, Fuchs SC, Wiehe M, Gus M, Moraes RS, Fuchs FD. Incidence of hypertension in Porto Alegre, Brazil: a population-based study. J Hum Hypertens. 2008;22:48–50.
40. Fuchs SC, Poli-de-Figueiredo CE, Figueiredo Neto JA, Scala LC, Whelton PK, Mosele F i sur. Effectiveness of Chlorthalidone Plus Amiloride for the Prevention of Hypertension: The PREVER-Prevention Randomized Clinical Trial. J Am Heart Assoc. 2016;5:e004248. doi: 10.1161/JAHA.116.004248.
41. Lüders S, Schrader J, Berger J, Unger T, Zidek W, Böhm M i sur. The PHARAO study: prevention of hypertension with the angiotensin-converting enzyme inhibitor ramipril in patients with high-normal blood pressure: a prospective, randomized, controlled prevention trial of the German Hypertension League. J Hypertens. 2008;26:1487-96.
42. Selassie A, Wagner CS, Laken ML, Ferguson ML, Ferdinand KC, Egan BM. Progression is Accelerated from Pre-Hypertension to Hypertension in African Americans. Hypertension. 2011;58:579-87.
43. Ishikawa Y, Ishikawa J, Ishikawa S, Kario K, Kajii E; Jichi Medical School Cohort Investigators Group. Progression from prehypertension to hypertension and risk of cardiovascular disease. J Epidemiol. 2017;27:8-13.

44. Faselis C, Doumas M, Kokkinos JP, Panagiotakos D, Kheirbek R, Sheriff HM i sur. Exercise capacity and progression from prehypertension to hypertension. Hypertension. 2012;60:333-8.
45. Conen D, Ridker PM, Buring JE, Glynn RJ. Risk of cardiovascular events among women with high normal blood pressure or blood pressure progression: prospective cohort study. BMJ. 2007;335:432. doi: 10.1136/bmj.39269.672188.AE
46. Vasan RS, Larson MG, Leip EP, Kannel WB, Levy D. Assessment of frequency of progression to hypertension in non-hypertensive participants in the Framingham Heart Study: a cohort study. Lancet. 2001;358:1682-6.
47. Oldham PD, Pickering G, Roberts JA, Sowry GS. The nature of essential hypertension. Lancet. 1960;1:1085-93.
48. Williams SS. Advances in genetic hypertension. Curr Opin Pediatr. 2007;19:192-198
49. Wang NY, Young JH, Meoni LA, Ford DE, Erlinger TP, Klag MJ. Blood pressure change and risk of hypertension associated with parental hypertension: the Johns Hopkins Precursors Study. Arch Intern Med. 2008;168:643-8.
50. Barlassina C, Lanzani C, Manunta P, Bianchi G. Genetics of essential hypertension: from families to genes. J Am Soc Nephrol. 2002; 13(S3):S155-64.
51. Corvol P, Jeunemaitre X, Charru A, Soubrier F. Can the genetic factors influence the treatment of systemic hypertension? The case of the renin-angiotensin-aldosterone system. Am J Cardiol. 1992;70:14D-20D.
52. 1000 Genomes Project Consortium. A map of human genome variation from population-scale sequencing. Nature. 2010;467:1061-73.
53. Ehret GB, Caulfield MJ. Genes for blood pressure: an opportunity to understand hypertension. Eur Heart J. 2013;34:951-61.
54. Kraja AT, Hunt SC, Rao DC, Dávila-Román VG, Arnett DK, Province MA. Genetics of Hypertension and Cardiovascular Disease and Their Interconnected Pathways: Lessons from Large Studies. Curr Hypertens Rep. 2011;13:46-54.
55. Newton-Cheh C, Johnson T, Gateva V, Tobin MD, Bochud M, Coin L i sur. Eight blood pressure loci identified by genome-wide association study of 34,433 people of European ancestry. Nat Genet. 2009;41:666-76.
56. Sun B, Williams JS, Svetkey LP, Kolatkar NS, Conlin PR. β2-Adrenergic receptor genotype affects the renin-angiotensinaldosterone system response to the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) dietary pattern. Am J Clin Nutr. 2010;92:444-49.

57. Vardeny O, Peppard PE, Finn LA, Faraco JH, Mignot E, Hla KM. β2 adrenergic receptor polymorphisms and nocturnal blood pressure dipping status in the Wisconsin Sleep Cohort Study. Am Soc Hypertens. 2011;5:114-22.
58. Ma H, Sun G, Wang W, Zhou Y, Liu D, Tong Y, Lu Z. Association Between Interleukin-6 -572 C>G and -174 G>C Polymorphisms and Hypertension: A Meta-analysis of Case-control Studies. Medicine (Baltimore). 2016;95(2):e2416. doi: 10.1097/MD.0000000000002416
59. Davis JT, Rao F, Naqshbandi D, Fung MM, Zhang K, Schork AJ i sur. Autonomic and Hemodynamic Origins of Pre-Hypertension Central Role of Heredity. J Am Coll Cardiol. 2012;59:2206-216.
60. Padmanabhan S, Melander O, Johnson T, Di Blasio AM, Lee WK, Gentilini D i sur. Genome-Wide Association Study of Blood Pressure Extremes Identifies Variant near UMOD Associated with Hypertension. PLoS Genet. 2010;6:e1001177. doi: 10.1371/journal.pgen.1001177.
61. Johnson AD, Newton-Cheh C, Chasman DI, Ehret GB, Johnson T, Rose L i sur. Association of hypertension drug target genes with blood pressure and hypertension in 86,588 individuals. Hypertension. 2011;57:903-910.
62. He Q, Fan C, Yu M, Wallar G, Zhang Z-F i sur. Associations of ACE Gene Insertion/Deletion Polymorphism, ACE Activity, and ACE mRNA Expression with Hypertension in a Chinese Population. PLoS ONE. 2013;8:e75870. doi: 10.1371/journal.pone.0075870.
63. Mottl AK, Shoham DA, North KE. Angiotensin II type 1 receptor polymorphisms and susceptibility to hypertension: a HuGE review. Genet Med. 2008;10:560-74.
64. Palatini P, Ceolotto G, Dorigatti F, Mos L, Santonastaso M, Bratti P i sur. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism predicts development of hypertension and metabolic syndrome. Am J Hypertens. 2009;22:208-14.
65. Wu DA, Bu X, Warden CH, Shen DD, Jeng CY, Sheu WH i sur. Quantitative trait locus mapping of human blood pressure to a genetic region at or near the lipoprotein lipase gene locus on chromosome 8p22. J Clin Invest. 1996;97:2111-8.
66. Goodarzi MO, Guo X, Taylor KD, Quiñones MJ, Saad MF, Yang H i sur. Lipoprotein lipase is a gene for insulin resistance in Mexican Americans. Diabetes. 2004;53:214-20.
67. Goodarzi MO, Wong H, Quiñones MJ, Taylor KD, Guo X, Castellani LW i sur. The 3' untranslated region of the lipoprotein lipase gene: haplotype structure and association with post-heparin plasma lipase activity. J Clin Endocrinol Metab. 2005;90:4816-23.

68. Goodarzi MO, Taylor KD, Guo X, Hokanson JE, Haffner SM, Cui J i sur. Haplotypes in the lipoprotein lipase gene influence fasting insulin and discovery of a new risk haplotype. J Clin Endocrinol Metab. 2007;92:293-6.
69. Kraja AT, Vaidya D, Pankow JS, Goodarzi MO, Assimes TL, Kullo IJ i sur. A bivariate genome-wide approach to metabolic syndrome: STAMPEED consortium. Diabetes. 2011;60:1329-39.
70. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. Nature. 2007;447:661-78.
71. Ahn SY, Gupta C. Genetic Programming of Hypertension. Front Pediatr. 2018;5:285. doi: 10.3389/fped.2017.00285
72. International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association Studies, Ehret GB, Munroe PB, Rice KM, Bochud M, Johnson AD, Chasman DI i sur. Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. Nature. 2011;478:103-9.
73. Surendran P, Drenos F, Young R, Warren H, Cook JP, Manning AK i sur. Trans-ancestry meta-analyses identify rare and common variants associated with blood pressure and hypertension. Nat Genet. 2016;48:1151-61.
74. 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;86:1343-6.
75. Corvol P, Jeunemaitre X. Molecular genetics of human hypertension: role of angiotensinogen. Endocr Rev. 1997;18:662-77.
76. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A i sur. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. Cell. 1992;71:169-80.
77. Iwai N, Shimoike H, Ohmichi N, Kinoshita M. Angiotensinogen gene and blood pressure in the Japanese population. Hypertension 1995;25:688-93.
78. Nejatizadeh A, Kumar R, Stobdan T, Goyal A K, Gupta M, Javed S i sur. Significance of angiotensinogen gene haplotypes and genotypes combinations in hypertension. J Hypertens. 2008;26:1094-101.
79. Kretowski A, McFann K, Hokanson JE, Maahs D, Kinney G, Snell-Bergeon JK i sur. Polymorphisms of the renin-angiotensin system genes predict progression of subclinical coronary atherosclerosis. Diabetes. 2007;56:863-71
80. Rasmussen-Torvik LJ, North KE, Gu CC, Lewis CE, Wilk JB, Chakravarti A i sur. A population association study of angiotensinogen polymorphisms and haplotypes with left ventricular phenotypes. Hypertension. 2005;46:1294-9.

81. Schmidt H, Fazekas F, Kostner GM, van Duijn CM, Schmidt R. Angiotensinogen gene promoter haplotype and microangiopathy-related cerebral damage: results of the Austrian Stroke Prevention Study. Stroke. 2001;32:405-12.
82. Schmidt H, Aulchenko YS, Schweighofer N, Schmidt R, Frank S, Kostner GM i sur. Angiotensinogen promoter B-haplotype associated with cerebral small vessel disease enhances basal transcriptional activity. Stroke. 2004;35:2592-7.
83. Ehret GB, Ferreira T, Chasman DI, Jackson AU, Schmidt EM, Johnson T i sur. The genetics of blood pressure regulation and its target organs from association studies in 342,415 individuals. Nat Genet. 2016;48:1171-84.
84. Liu C, Kraja AT, Smith JA, Brody JA, Franceschini N, Bis JC i sur. Meta-analysis identifies common and rare variants influencing blood pressure and overlapping with metabolic trait loci. Nat Genet. 2016;48:1162-70.
85. Hoffmann TJ, Ehret GB, Nandakumar P, Ranatunga D, Schaefer C, Kwok PY i sur. Genome-wide association analyses using electronic health records identify new loci influencing blood pressure variation. Nat Genet. 2017;49:54-64.
86. Wain LV, Vaez A, Jansen R, Joehanes R, van der Most PJ, Erzurumluoglu AM i sur. Novel Blood Pressure Locus and Gene Discovery Using Genome-Wide Association Study and Expression Data Sets From Blood and the Kidney. Hypertension. 2017;70:e4-e19.
87. van der Harst P, Verweij N. Identification of 64 Novel Genetic Loci Provides an Expanded View on the Genetic Architecture of Coronary Artery Disease. Circ Res. 2018;122:433-43.
88. Sung YJ, Winkler TW, de Las Fuentes L, Bentley AR, Brown MR, Kraja AT i sur. A Large-Scale Multi-ancestry Genome-wide Study Accounting for Smoking Behavior Identifies Multiple Significant Loci for Blood Pressure. Am J Hum Genet. 2018;102:375-400.
89. Feitosa MF, Kraja AT, Chasman DI, Sung YJ, Winkler TW, Ntalla i i sur. Novel genetic associations for blood pressure identified via gene-alcohol interaction in up to 570K individuals across multiple ancestries. PLoS One. 2018;13(6):e0198166. doi: 10.1371/journal.pone.0198166
90. Giri A, Hellwege JN, Keaton JM, Park J, Qiu C, Warren HR i sur. Trans-ethnic association study of blood pressure determinants in over 750,000 individuals. Nat Genet. 2019;51:51-62.
91. Kichaev G, Bhatia G, Loh PR, Gazal S, Burch K, Freund MK i sur. Leveraging Polygenic Functional Enrichment to Improve GWAS Power. Am J Hum Genet. 2019;104:65-75.

92. Wu Y, Byrne EM, Zheng Z, Kemper KE, Yengo L, Mallett AJ i sur. Genome-wide association study of medication-use and associated disease in the UK Biobank. Nat Commun. 2019;10:1891. 10.1038/s41467-019-09572-5
93. Johnson T, Gaunt TR, Newhouse SJ, Padmanabhan S, Tomaszewski M, Kumari M i sur. Blood pressure loci identified with a gene-centric array. Am J Hum Genet. 2011;89:688-700.
94. Kayima J, Liang J, Natanzon Y, Nankabirwa J, Ssinabulya I, Nakibuuka J i sur. Association of genetic variation with blood pressure traits among East Africans. Clin Genet. 2017 Nov;92:487-94. doi: 10.1111/cge.12974
95. Simino J, Shi G, Bis JC, Chasman DI, Ehret GB, Gu X i sur. Gene-age interactions in blood pressure regulation: a large-scale investigation with the CHARGE, Global BPgen, and ICBP Consortia. Am J Hum Genet. 2014;95:24-38.
96. Watkins WS, Hunt SC, Williams GH, Tolpinrud W, Jeunemaitre X, Lalouel JM, Jorde LB. Genotype-phenotype analysis of angiotensinogen polymorphisms and essential hypertension: the importance of haplotypes. J Hypertens. 2010;28:65-75.
97. Underwood PC, Sun B, Williams JS, Pojoga LH, Raby B, Lasky-Su J i sur. The association of the angiotensinogen gene with insulin sensitivity in humans: a tagging single nucleotide polymorphism and haplotype approach. Metabolism. 2011;60:1150-7.
98. Reference SNP (rs) Report rs2004776 [Internet]. Current Build 153, Released July 9, 2019 [pristupljeno 11.07.2019.], National Center for Biotechnology Information. U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2004776#frequency_tab
99. Peach MJ. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. Physiol Rev. 1977;57:313-70.
100. Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ i sur. Angiotensin II receptor and angiotensin II receptor antagonists. Pharmacol Rev. 1993;45:205-51.
101. Atlas SA. The renin-angiotensin system revisited: classical and nonclassical pathways of angiotensin formation. Mt Sinai J Med. 1998;65:87-96.
102. Regoli D, Barabe J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. Pharmacol Rev. 1980;32:1-46.
103. Castellon R, Hamdi HK. Demystifying the ACE polymorphism: from genetics to biology. Curr Pharm Des. 2007;13:1191-8.

104. Tiret L, Rigat B, Visvikis S, Breda C, Corvol P, Cambien F i sur. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. Am J Hum Genet. 1992;51:197-205.
105. Costerousse O, Allegrini J, Lopez M, Alhenc-Gelas F. Angiotensin I converting enzyme in human circulating mononuclearcells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. Biochem J. 1993;290(Pt1):33-40.
106. Danser AH, Schalekamp MA, Bax WA, van den Brink AM, Saxena PR, Riegger GA i sur. Angiotensin converting enzyme in the human heart: effect of the deletion/insertion polymorphism. Circulation. 1995;92:1387-8.
107. Montgomery HE, Marshall R, Marshall R, Myerson S, Clarkson P, Dollery C i sur. Human gene for physical performance. Nature. 1998;393:221-2.
108. Martinez E, Puras A, Escribano J, Sanchis C, Carrión L, Artigao M i sur. Angiotensin converting enzyme (ACE) gene polymorphisms, serum ACE activity and blood pressure in a Spanish-Mediterranean population. J Hum Hypertens. 2000;14:131-5.
109. Mattace-Raso FUS, Sie MPS, van der Cammen TJM, Safar ME, Hofman A, van Duijn CM i sur. Insertion/deletion gene polymorphism of the angiotensin-converting enzyme and blood pressure changes in older adults. The Rotterdam study. J Human Hyperten. 2007;21:736-40.
110. Choudhury I, Jothimalar R, Patra AK. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and its association with hypertension in South Indian population. Indian J Clin Biochem. 2012;27:265-9.
111. Singh M, Singh AK, Singh S, Pandey P, Chandra S, Gambhir IS. Angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism increases the susceptibility to hypertension and aDDitive diseases: a study on north Indian patients. Clin Exp Hypertens. 2016;38:305-11.
112. Krishnan R, Sekar D, Subramanium S. Association ofangiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism with essential hypertension in south Indian population. Genes Dis. 2016;3:159-163.
113. Paramasivam R, Nandakumar R, Arumugam D, Krishnan P. Association of ACE DD genotype with hypertension among the tribal populations of South India. ILNS. 2016;52:1-8.
114. Rana G, Yadav S, Joshi S, Saraswathy KN. Association of DD genotype of angiotensin-converting enzyme gene (I/D) polymorphism with hypertension among a North Indian population. J Community Genet. 2018;9:51-5.
115. Clinical Annotation for rs1799752 (ACE); captopril; Diabetes Mellitus, Type 2, Heart Failure and Pulmonary Disease, Chronic Obstructive (level 2A Efficacy) [Internet].

12/20/2017 Update [pristupljeno 09.07.2019.]. Dostupno na: https://www.pharmgkb.org/clinicalAnnotation/982047862

116. Al-Hinai AT, Hassan MO, Simsek M, Al-Barwani H, Bayoumi R. Genotypes and allele frequencies of angiotensin converting enzyme (ACE) insertion/deletion polymorphism among Omanis. J Sci Res Med Sci. 2002;4:25-7.
117. Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI, Fabiani ME. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. Clin Sci (Lond). 2001;100:481-92.
118. Thomas WG, Mendelsohn FA. Angiotensin receptors: form and function and distribution. Int J Biochem Cell Biol. 2003;35:774-9.
119. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. Pharmacol Rev. 2000;52:415-72.
120. Takayanagi R, Ohnaka K, Sakai Y, Nakao R, Yanase T, Haji M i sur. Molecular cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding human type-1 angiotensin II receptor. Biochem Biophys Res Commun. 1992;183:910-6.
121. Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X, Féry I, Charru A, Clauser E i sur. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. Hypertension. 1994;24:63-9.
122. Wang WY, Zee RY, Morris BJ. Association of angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism with essential hypertension. Clin Genet. 1997;51:31-4.
123. Kobashi G, Hata A, Ohta K, Yamada H, Kato EH, Minakami H i sur. A1166C variant of angiotensin II type 1 receptor gene is associated with severehypertension in pregnancy independently of T235 variant of angiotensinogen gene. J Hum Genet. 2004;49:182-6.
124. Sethupathy P, Borel C, Gagnebin M, Grant GR, Deutsch S, Elton TS i sur. Human microRNA-155 on chromosome 21 differentially interacts with its polymorphic target in the AGTR1 3' untranslated region: a mechanism for functional single-nucleotide polymorphisms related to phenotypes. Am J Hum Genet. 2007;81:405-13.
125. Forman JP, Fisher ND, Pollak MR, Cox DG, Tonna S, Curhan GC. Renin-angiotensin system polymorphisms and risk of hypertension: influence of environmental factors. J Clin Hypertens. 2008;10:459-66.
126. Zhang, H, Sun, ML, Peng, J. Association of the angiotensin type 1 receptor gene A1166C polymorphisms with myocardial infarction: a meta-analysis. J Thromb Haemost. 2011;9:1258-60.
127. Zhuang Y, Niu F, Liu D, Sun J, Zhang X, Zhang J, Guo S. Association between AGTR1 A1166C polymorphism and the susceptibility to diabetic nephropathy: Evidence from a

meta-analysis. Medicine (Baltimore). 2018;97:e07689. doi: 10.1097/MD.0000000000007689

128. Aouizerat BE, Vittinghoff E, Musone SL, Pawlikowska L, Kwok PY, Olgin JE i sur. GWAS for discovery and replication of genetic loci associated with sudden cardiac arrest in patients with coronary artery disease. BMC Cardiovasc Disord. 2011;11:29. doi: 10.1186/1471-2261-11-29
129. Osterop AP, Kofflard MJ, Sandkuijl LA, ten Cate FJ, Krams R, Schalekamp MA i sur. AT1 receptor A/C1166 polymorphism contributes to cardiac hypertrophy in subjects with hypertrophic cardiomyopathy. Hypertension. 1998;32:825-30.
130. Smilde TD, Zuurman MW, Hillege HL, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, van der Steege G i sur. Renal function dependent association of AGTR1 polymorphism (A1166C) and electrocardiographic left-ventricular hypertrophy. Am J Hypertens. 2007;20:1097-103.
131. de Denus S, Dubé MP, Fouodjio R, Huynh T, LeBlanc MH, Lepage S i sur; CANDIID II investigators. A prospective study of the impact of AGTR1 A1166C on the effects of candesartan in patients with heart failure. Pharmacogenomics. 2018;19:599-612.
132. Reference SNP (rs) Report rs5186 [Internet]. Current Build 153, Released July 9, 2019 [pristupljeno 11.07.2019.], National Center for Biotechnology Information. U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs5186#frequency_tab
133. Gilman AG. G proteins: transducers of receptor-generated signals. Annu Rev Biochem. 1987;56:615-49.
134. Brodde OE, Bruck H, Leineweber K, Seyfarth T. Presence, distribution and physiological function of adrenergic and muscarinic receptor subtypes in the human heart. Basic Res Cardiol. 2001;96:528-38.
135. Alhayek S, Preuss CV. Beta 1 Receptors. [obnovljeno 2018 Dec 2]. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 Jan-. [pristupljeno 09.07.2019.]; Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532904
136. Gerhardstein BL, Puri TS, Chien AJ, Hosey MM. Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the beta 2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels. Biochemistry. 1999;38:10361-70.
137. Johnson JA, Terra SG. Beta-adrenergic receptor polymorphisms: cardiovascular disease associations and pharmacogenetics. Pharm Res. 2002;19:1779-87.
138. McNamara DM, MacGowan GA, London B. Clinical importance of beta-adrenoceptor polymorphisms in cardiovascular disease. Am J Pharmacogenomics. 2002;2:73-8.

139. Morris BJ. Sympathetic meta-analysis of adrenoceptor gene variants in hypertension. Am J Hypertens. 2010;23(3):225. doi: 10.1038/ajh.2009.267
140. Lima JJ, Feng H, Duckworth L, Wang J, Sylvester JE, Kissoon N i sur. Association analyses of adrenergic receptor polymorphisms with obesity and metabolic alterations. Metabolism. 2007;56:757-65.
141. Wagoner LE, Craft LL, Zengel P, McGuire N, Rathz DA, Dorn GW 2nd i sur. Polymorphisms of the beta1-adrenergic receptor predict exercise capacity in heart failure. Am Heart J. 2002;144:840-6.
142. Stanton T, Inglis GC, Padmanabhan S, Dominiczak AF, Jardine AG, Connell JMC. Variation at the a-1 adrenergic receptor gene locus affects left ventricular mass in renal failure. J Nephrol. 2002;15:512-8.
143. La Rosée K, Huntgeburth M, Rosenkranz S, Böhm M, Schnabel P. The Arg389Gly beta1-adrenoceptor gene polymorphism determines contractile response to catecholamines Pharmacogenetics. 2004;14:711-6.
144. Johnson JA, Zineh I, Puckett BJ, McGorray SP, Yarandi HN, Pauly DF. Beta 1-adrenergic receptor polymorphisms and antihypertensive response to metoprolol. Clin Pharmacol Ther. 2003;74:44-52.
145. Liu J, Liu ZQ, Yu BN, Xu FH, Mo W, Zhou G i sur. beta1-Adrenergic receptor polymorphisms influence the response to metoprolol monotherapy in patients with essential hypertension. Clin Pharmacol Ther. 2006;80:23-32.
146. Reference SNP (rs) Report rs1801253 [Internet]. Current Build 153, Released July 9, 2019 [pristupljeno 11.07.2019.], National Center for Biotechnology Information. U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1801253#frequency_tab
147. Devuyst O, Bochud M. Uromodulin, kidney function, cardiovascular disease, and mortality. Kidney International. 2015;88:944-6.
148. Renigunta A, Renigunta V, Saritas T, Decher N, Mutig K, Waldegger S. Tamm-Horsfall glycoprotein interacts with renal outer medullary potassium channel ROMK2 and regulates its function. J Biol Chem. 2011;286:2224-35.
149. Mutig K, Kahl T, Saritas T, Godes M, Persson P, Bates J i sur. Activation of the bumetanide-sensitive Na+,K+,2Cl- cotransporter (NKCC2) is facilitated by Tamm-Horsfall protein in a chloride-sensitive manner. J Biol Chem. 2011 26;286:30200-10.
150. Kraus D, Wanner C. Uromodulin in the Bloodstream: Old Wine in a New Wineskin. J Am Soc Nephrol. 2017;28:1955-7.

151. Gudbjartsson DF, Holm H, Indridason OS, Thorleifsson G, Edvardsson V, Sulem P i sur. Association of variants at UMOD with chronic kidney disease and kidney stones-role of age and comorbid diseases. PLoS Genet. 2010;6:1-9. doi: 10.1371/journal.pgen.1001039
152. Garimella PS, Bartz TM, Ix JH, Chonchol M, Shlipak MG, Devarajan P i sur. Urinary Uromodulin and Risk of Urinary Tract Infections: The Cardiovascular Health Study. Am J Kidney Dis. 2017;69:744-51.
153. van der Starre WE, van Nieuwkoop C, Thomson U, Zijderveld-Voshart MS, Koopman JP, van der Reijden TJ i sur. Urinary proteins, vitamin D and genetic polymorphisms as risk factors for febrile urinary tract infection and relation with bacteremia: A case control study. PLoS One. 2015;10:1-18. doi: 10.1371/journal.pone.0121302
154. Garimella PS, Jaber BL, Tighiouart H, Liangos O, Bennett MR, Devarajan P i sur. Association of preoperative urinary uromodulin with aki after cardiac surgery. Clin J Am Soc Nephrol. 2017;12:10-8.
155. Köttgen A, Glazer NL, Dehghan A, Hwang SJ, Katz R, Li M i sur. Multiple loci associated with indices of renal function and chronic kidney disease. Nat Genet 2009;41:712-7.
156. Han J, Chen Y, Liu Y, Liang Y, Wang X, Liu L i sur. Common variants of the UMOD promoter associated with blood pressure in a community-based Chinese cohort. Hypertens Res. 2012;35:769-774. doi:10.1038/hr.2012.51
157. Han J, Liu Y, Rao F, Nievergelt CM, O'Connor DT, Wang X i sur. Common genetic variants of the human uromodulin gene regulate transcription and predict plasma uric acid levels. Kidney Int 2013;83:733-40.
158. Pattaro C, Teumer A, Gorski M, Chu AY, Li M, Mijatovic V i sur. Genetic associations at 53 loci highlight cell types and biological pathways relevant for kidney function. Nat Commun. 2016;7:10023. doi: 10.1038/ncomms10023
159. Eckardt KU, Alper SL, Antignac C, Bleyer AJ, Chauveau D, Dahan K i sur. Autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease: Diagnosis, classification, and management - A KDIGO consensus report. Kidney Int. 2015;88:676-83.
160. Reference SNP (rs) Report rs13333226 [Internet]. Current Build 153, Released July 9, 2019 [pristupljeno 11.07.2019.], National Center for Biotechnology Information. U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs13333226#frequency_tab
161. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y i sur. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. Circulation. 1999;100:2473-6.

162. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H i sur. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappa-B signaling through a cAMP-dependent pathway. Circulation. 2000;102:1296-301.
163. Vasseur F, Helbecque N, Dina C, Lobbens S, Delannoy V, Gaget S i sur. Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. Hum Molecul Genet. 2002;11:2607-14.
164. Lindberg S, Jensen JS, Bjerre M, Frystyk J, Flyvbjerg A, Jeppesen J i sur. Low adiponectin levels at baseline and decreasing adiponectin levels over 10 years of follow-up predict risk of the metabolic syndrome. Diabetes Metab. 2017;43:134-9.
165. Hopkins TA, Ouchi N, Shibata R, Walsh K. Adiponectin actions in the cardiovascular system. Cardio Vasc Res. 2007;74:11-8.
166. Papadopoulos DP, Makris TK, Krespi PG, Poulakou M, Stavroulakis G, Hatzizacharias AN i sur. Adiponectin and resistin plasma levels in healthy individuals with prehypertension. J Clin Hypertens (Greenwich). 2005;7:729-33.
167. Wiecek A, Adamczak M, Chudek J. Adiponectin-an adipokine with unique metabolic properties. Nephrol Dial Transplant. 2007;22:981-8.
168. Frankenberg ADV, Reis AF, Gerchman F. Relationships between adiponectin levels, the metabolic syndrome, and type 2 diabetes: a literature review. Arch Endocrinol Metab. 2017;61:614-22. doi:10.1590/2359-3997000000316
169. Snijder MB, Heine RJ, Seidell JC, Bouter LM, Stehouwer CD, Nijpels G i sur. Associations of adiponectin levels with incident impaired glucose metabolism and type 2 diabetes in older men and women: the hoorn study. Diabetes Care. 2006;29:2498-503.
170. Ouchi N, Walsh K. Adiponectin as an anti-inflammatory factor. Clin Chim Acta. 2007;380:24-30.
171. Achari AE, Jain SK. Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. Int J Mol Sci. 2017;18(6):1321. doi: 10.3390/ijms18061321
172. Orlando A, Nava E, Giussani M, Genovesi S. Adiponectin and Cardiovascular Risk. From Pathophysiology to Clinic: Focus on Children and Adolescents. Int J Mol Sci. 2019;20(13):3228. doi: 10.3390/ijms20133228
173. Heid IM, Henneman P, Hicks A, Coassin S, Winkler T, Aulchenko YS i sur. Clear detection of ADIPOQ locus as the major gene for plasma adiponectin: results of genome-wide association analyses including 4659 European individuals. Atherosclerosis. 2010;208:412-20.

174. Ling H, Waterworth DM, Stirnadel HA, Pollin TI, Barter PJ, Kesaniemi YA i sur. Genome-wide linkage and association analyses to identify genes influencing adiponectin levels: the GEMS Study. Obesity (Silver Spring). 2009;17:737-44.
175. Jee SH, Sull JW, Lee JE, Shin C, Park J, Kimm H i sur. Adiponectin concentrations: a genome-wide association study. Am J Hum Genet. 2010;87:545-52.
176. Hivert MF, Manning AK, McAteer JB, Florez JC, Dupuis J, Fox CS, i sur. Common variants in the adiponectin gene (ADIPOQ) associated with plasma adiponectin levels, type 2 diabetes, and diabetes-related quantitative traits: the Framingham Offspring Study. Diabetes. 2008;57:3353-9.
177. Richards JB, Waterworth D, O'Rahilly S, Hivert MF, Loos RJ, Perry JR, i sur; GIANT Consortium. A genome-wide association study reveals variants in ARL15 that influence adiponectin levels. PLoS Genet. 2009;5:e1000768. doi: 10.1371/journal.pgen.1000768
178. Wu Y, Gao H, Li H, Tabara Y, Nakatochi M, Chiu YF i sur. A meta-analysis of genome-wide association studies for adiponectin levels in East Asians identifies a novel locus near WDR11-FGFR2. Hum Mol Genet. 2014;23:1108-19.
179. Dastani Z, Hivert MF, Timpson N, Perry JR, Yuan X, Scott RA i sur. Novel loci for adiponectin levels and their influence on type 2 diabetes and metabolic traits: a multi-ethnic meta-analysis of 45,891 individuals. PLoS Genet.;8:e1002607. doi: 10.1371/journal.pgen.1002607
180. Kim DH, Kim C, Ding EL, Townsend MK, Lipsitz LA. Adiponectin levels and the risk of hypertension: a systematic review and meta-analysis. Hypertension. 2013;62:27-32.
181. Gable DR, Matin J, Whittall R, Cakmak H, Li KW, Cooper J i sur. Common adiponectin gene variants show different effects on risk of cardiovascular disease and type 2 diabetes in European subjects. Ann Hum Genet. 2007;71(Pt 4):453-66.
182. Han LY, Wu QH, Jiao ML, Hao YH, Liang LB, Gao LJ i sur. Associations between single-nucleotide polymorphisms (+45T>G, +276G>T, -11377C>G, -11391G>A) of adiponectin gene and type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. Diabetologia. 2011;54:2303-14.
183. Siitonen N, Pulkkinen L, Lindstrom J, Kolehmainen M, Eriksson JG, Venojarvi M, i sur. Association of ADIPOQ gene variants with body weight, type 2 diabetes and serum adiponectin concentrations: the Finnish Diabetes Prevention Study. BMC Med Genet. 2011];12:5. doi: 10.1186/1471-2350-12-5
184. Lu JF, Zhou Y, Huang GH, Jiang HX, Hu BL, Qin SY. Association of ADIPOQ polymorphisms with obesity risk: a meta-analysis. Hum Immunol. 2014;75:1062-8.

185. Cai Y, Zeng T, Chen L. Association of adiponectin polymorphisms with the risk of diabetic nephropathy in type 2 diabetes: a meta-analysis. J Diabetes. 2015;7):31-40.
186. Kasim NB, Huri HZ, Vethakkan SR, Ibrahim L, Abdullah BM. Genetic polymorphisms associated with overweight and obesity in uncontrolled Type 2 diabetes mellitus. Biomark Med. 2016;10:403-15.
187. Sun P, Liu L, Chen J, Chen Y, Shi L, Imam MU i sur. The polymorphism of rs266729 in adiponectin gene and type 2 diabetes mellitus: A Meta-Analysis. Medicine (Baltimore). 2017;96:e8745. doi: 10.1097/MD.0000000000008745
188. Fan W, Qu X, Li J, Wang X, Bai Y, Cao Q i sur. Associations between polymorphisms of the ADIPOQ gene and hypertension risk: a systematic and meta-analysis. Sci Rep. 2017;7:41683. doi: 10.1038/srep41683
189. Hou H, Ge S, Zhao L, Wang C, Wang W, Zhao X, Sun Z. An Updated Systematic Review and Meta-analysis of Association Between Adiponectin Gene Polymorphisms and Coronary Artery Disease. OMICS. 2017;21:340-351.
190. Kanu JS, Qiu S, Cheng Y, Li R, Kou C, Gu Y i sur. Associations between three common single nucleotide polymorphisms (rs266729, rs2241766, and rs1501299) of ADIPOQ and cardiovascular disease: a meta-analysis. Lipids Health Dis. 2018;17:126. doi: 10.1186/s12944-018-0767-8
191. Ambroziak M, Kolanowska M, Bartoszewicz Z, Budaj A. Adiponectin gene variants and decreased adiponectin plasma levels are associated with the risk of myocardial infarction in young age. Gene. 2018;642:498-504.
192. Wang Z, Diao J, Yue X, Zhong J. Effects of ADIPOQ polymorphisms on individual susceptibility to coronary artery disease: a meta-analysis. Adipocyte. 2019;8:137-143.
193. Reference SNP (rs) Report rs266729 [Internet]. Current Build 153, Released July 9, 2019 [pristupljeno 11.07.2019.], National Center for Biotechnology Information. U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs266729#frequency_tab
194. Reference SNP (rs) Report rs17300539 [Internet]. Current Build 153, Released July 9, 2019 [pristupljeno 11.07.2019.], National Center for Biotechnology Information. U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs17300539#frequency_tab
195. World Health Organization. Waist circumference and waist-hip ratio: report of a WHO consultation: Geneva, 8-11 December 2008 [Internet], 16 May 2011 [pristupljeno 11.07.2019.]. Dostupno na: https://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_report_waistcircumference_and_waisthip_ratio/en/

196. World Health Organization. Global Database on Body Mass Index [Internet], 10 Jul 2010 [pristupljeno 11.07.2019.]. Dostupno na: http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html
197. World Health Organization. Global Health Observatory (GHO) data. Mean Body Mass Index (BMI) [Internet], [pristupljeno 11.07.2019.]. Dostupno na: https://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/bmi_text/en
198. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. Kidney Inter., Suppl. 2013;3:1-150. doi: 10.1038/kisup.2012.73
199. D'Agostino RB Sr, Vasan RS, Pencina MJ, Wolf PA, Cobain M, Massaro JM i sur. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. Circulation. 2008;117:743-53.
200. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 1988;16:1215.
201. Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). Nucleic Acids Res. 1992;20:1433.
202. Davies NM, Holmes MV, Davey SG. Reading Mendelian randomisation studies: a guide, glossary, and checklist for clinicians. BMJ. 2018;362:k601. doi: 10.1136/bmj.k601
203. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria [Internet]. 2015. [pristupljeno 01.08.2019.]. Dostupno na: https://www.R-project.org/
204. Wickham H. Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag, New York. 2016.
205. Graffelman J. Exploring Diallelic Genetic Markers: The HardyWeinberg Package. J Stat Soft 2015;64:1-23.
206. Graffelman J, Morales-Camarena J. Graphical tests for Hardy-Weinberg Equilibrium based on the ternary plot. Hum Hered 2008;65:77-84.
207. Wei T, Simko V. R package "corrplot": Visualization of a Correlation Matrix (Version 0.84). 2017.
208. Venables WN, Ripley BD. Modern Applied Statistics with S. Fourth Edition. Springer, New York. 2002. ISBN 0-387-95457-0
209. Urrea V, Calle M, Van Steen K, Malats N. mbmdr: Model Based Multifactor Dimensionality Reduction. R package version 2.6.2012.

210. Burkett K, McNeney B, Graham J. A note on inference of trait associations with SNP haplotypes and other attributes in generalized linear models. Hum Hered 2004;57:200-6.
211. Burkett K, Graham J, McNeney B. hapassoc: Software for Likelihood Inference of Trait Associations with SNP Haplotypes and Other Attributes. J Stat Soft 2006;16:1-19.
212. Yavorska O. MendelianRandomization: Mendelian Randomization Package. R package version 0.2.2. 2017.
213. Forouzanfar MH, Liu P, Roth GA, Ng M, Biryukov S, Marczak L i sur. Global Burden of Hypertension and Systolic Blood Pressure of at Least 110 to 115 mm Hg, 1990-2015. JAMA. 2017;317:165-82.
214. Cabrera CP, Ng FL, Warren HR, Barnes MR, Munroe PB, Caulfield MJ. Exploring hypertension genome-wide association studies findings and impact on pathophysiology, pathways, and pharmacogenetics. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med. 2015;7:73-90.
215. Wang WY, Zee RY, Morris BJ. Association of angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism with essential hypertension. Clin Genet. 1997;51:31-34. doi: 10.1111/j.1399-0004.1997.tb02410.x
216. Warren HR, Evangelou E, Cabrera CP, Gao H, Ren M, Mifsud B i sur. Genome-wide association analysis identifies novel blood pressure loci and offers biological insights into cardiovascular risk. Nat Genet. 2017;49:403-15.
217. Singh M, Singh AK, Pandey P, Chandra S, Singh KA, Gambhir IS. Molecular genetics of essential hypertension. Clin Exp Hypertens. 2016;38(3):268-277. doi:10.3109/10641963.2015.1116543
218. Evangelou E, Warren HR, Mosen-Ansorena D, Mifsud B, Pazoki R, Gao H i sur. Genetic analysis of over one million people identifies 535 new loci associated with blood pressure traits Nat Genet. 2018;50:1412-25.
219. Havulinna AS, Kettunen J, Ukkola O, Osmond C, Eriksson JG, Kesäniemi YA i sur. A blood pressure genetic risk score is a significant predictor of incident cardiovascular events in 32,669 individuals. Hypertension. 2013;61:987-94.
220. Prior SL, Gable DR, Cooper JA, Bain SC, Hurel SJ, Humphries SE i sur. Association between the adiponectin promoter rs266729 gene variant and oxidative stress in patients with diabetes mellitus. Eur Heart J. 2009;30:1263-9.
221. Hegener HH, Lee IM, Cook NR, Ridker PM, Zee RY. Association of adiponectin gene variations with risk of incident myocardial infarction and ischemic stroke: a nested case-control study. Clin Chem. 2006;52:2021-7.

222. Wu L, Wang CC. Genetic variants in promoter regions associated with type 2 diabetes mellitus: A large-scale meta-analysis and subgroup analysis. J Cell Biochem. 2019;120:13012-25.
223. Prior SL, Jones DA, Gill GV, Bain SC, Stephens JW. Association of the adiponectin rs266729 C>G variant and coronary heart disease in the low risk 'Golden Years' type 1 diabetes cohort. Diabetes Res Clin Pract. 2011;91:e71-4.
224. Smetnev S, Klimushina M, Kutsenko V, Kiseleva A, Gumanova N, Kots A i sur. Associations of SNPs of the ADIPOQ Gene with Serum Adiponectin Levels, Unstable Angina, and Coronary Artery Disease. Biomolecules. 2019;9:537.

11. ŽIVOTOPIS

Livija Šimičević rođena je 1973. godine u Zagrebu. Diplomirala je 1998. godine na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Devet godina radila je u farmaceutskoj industriji, području kliničkih ispitivanja i medicinskih poslova te stekla stručnost u pripremi i provođenju kliničkih ispitivanja, vođenju znanstvenih i medicinskih informacija, pripremi dokumentacije za podnošenje zahtjeva za stavljanje lijeka u promet te u provođenju medicinske edukacije stručnih suradnika. U 2011. godini započela je specijalizaciju iz medicinske biokemije i laboratorijske medicine u KBC Zagreb, a 2016. godine završila poslijediplomski specijalistički studij Medicinske biokemije i laboratorijske medicine na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i položila specijalistički ispit. Znanstveni poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2012. godine. Sudjeluje u izvođenju nastave dodiplomskoga studija na Medicinskom fakultetu. Sudjelovala je aktivno na više nacionalnih i međunarodnih stručnih i znanstvenih skupova. U koautorstvu je objavila 11 znanstvenih radova, više desetaka kongresnih priopćenja, te više tekstova u priručnicima i udžbenicima Sveučilišta u Zagrebu. Preliminarni rezultati ove disertacije su prezentirani na europskim kongresima hipertenzije (*European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection*) 2018, 2019. i 2020. godine. Znanstveni interesi su joj istraživanje genskih čimbenika povezanih s fenotipskim osobinama kardiovaskularnih poremećaja te genskih čimbenika povezanih s varijabilnim odgovorom na farmakoterapiju, pojavom nuspojava i interakcijama kardiovaskularnih lijekova (farmakogenetika/ farmakogenomika). Aktivno sudjeluje u projektima Hrvatskoga društva za hipertenziju „Predhipertenzija – klinička obilježja“ i suradnica je znastveno-istraživačkoga projekta Hrvatske zaklade za znanost „Epidemiologija arterijske hipertenzije i unos kuhinjske soli u Hrvatskoj“ (EH-UH-2).

Članica je Hrvatskoga društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu, Hrvatskoga društva za hipertenziju, Društva za razvitak nefrologije “prof.dr. Milovan Radonić”, Društva za kliničku genetiku Hrvatske i Hrvatskoga društva za farmakogenomiku i personaliziranu terapiju.