

# Polimorfizam gena endotelne sintaze dušikova monoksida i perinatalno hipoksično-ishemično oštećenje mozga

---

**Kuzmanić-Šamija, Radenka**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2011**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:106398>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-28**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Radenka Kuzmanić-Šamija**

**POLIMORFIZAM GENA ENDOTELNE SINTAZE DUŠIKOVA  
MONOKSIDA I PERINATALNO HIPOKSIČNO-ISHEMIČNO  
OŠTEĆENJE MOZGA**

**Doktorska disertacija**

**Rijeka, 2011.**

Mentor rada: Prof. dr. sc. Biserka Rešić

Komentor rada: Prof. dr. sc. Tatijana Zemunik

Doktorska disertacija obranjena je dana \_\_\_\_\_ na Medicinskom fakultetu  
Sveučilišta u Rijeci, pred Povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Igor Prpić
2. Prof. dr. sc. Vlatka Mejaški Bošnjak
3. Prof. dr. sc. Blaženka Grahovac
4. Prof. dr. sc. Biserka Rešić
5. Prof. dr. sc. Tatijana Zemunik

Rad ima \_\_\_\_\_ listova.

UDK : \_\_\_\_\_

# **PREDGOVOR**

Ovaj rad je u cijelosti izrađen u laboratoriju za medicinsku biologiju Katedre za medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu pod vodstvom prof.dr.sc. Tatijane Zemunik.

Istraživanja su dio znanstvenog projekta: „Genetska epidemiologija šećerne bolesti tip 1 u populaciji Hrvatske“ (216-1080315-0293)“ i projekta „Genske, kliničke i populacijske osobitosti deficita G-6-PD u Hrvatskoj“ (216-0000000-3464).

Za ovo istraživanje dobivena je privola Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Split i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Zahvalnost dugujem ljudima koji su mi pomagali dok sam pisala ovu disertaciju.

*Prof. dr. sc. Biserki Rešić* i *prof.dr. sc. Tatijani Zemunik*, mojim mentoricama, iskreno se zahvaljujem na njihovom stručnom vođenju, savjetima i svesrdnoj pomoći tijekom izrade ove doktorske disertacije.

Veliko hvala svim kolegama i posebno medicinskim sestrama Klinike za dječje bolesti KBC Split na susretljivosti, strpljenju i velikoj podršci tijekom izrade rada i pomoći pri prikupljanju uzoraka.

Zahvaljujem svim članovima Laboratorija Katedre za biologiju, posebice *dr. med. Marini Pehlić* na pomoći u radu.

Hvala svim mojim malim, strpljivim pacijentima i njihovim roditeljima.

Veliko hvala mojoj prijateljici, kolegici *mr.sc. Bernardi Lozić* na ideji, savjetima, pomoći i na konstruktivnim raspravama.

Naposljetku hvala mojoj obitelji na beskrajnom strpljenju, bezgraničnoj ljubavi i beskompromisnoj podršci. Posebno hvala mom dragom suprugu *Marinku* i mojoj djeci *Filipu* i *Miji*, jer su me podnosili kada sam više pozornosti posvećivala računalu, nego njima.

Doista ne bih uspjela napisati ovu disertaciju da nije bilo njih.

## SAŽETAK

**Cilj:** Hipoksično-ishemična encefalopatija (HIE) je oštećenje mozga, koja se razvija zbog manjka kisika i poremećaja cirkulacije. Kod hipoksije i ishemije u mozgu dolazi do niza biokemijskih događaja, između ostalog i pojačana aktivnost sintaze dušikova monoksida (NOS). Aktivacija endotelne NOS (eNOS) ima neuroprotektivnu ulogu. Cilj istraživanja je utvrditi povezanost mutacija polimorfizama gena za *NOS3* s HIE.

**Ispitanici i metode:** Ova studija uključila je 110 djece (69 dječaka i 41 djevojčica) s hipoksično-ishemičnim (HI) oštećenjem mozga i kontrolnu skupinu od 128 djece (60 dječaka i 68 djevojčica) rođenih u 16-godišnjem periodu na području Dalmacije – Hrvatska. Djeca s HI oštećenjem mozga ispunjavala su dijagnostičke kriterije za perinatalnu asfiksiju. Analizirali smo 6 tag SNP-ova *NOS3* gena (rs3918186, rs3918188, rs1800783, rs1808593, rs3918227, rs1799983), i dva funkcionalna polimorfizma istog gena SNP rs1800779 i rs2070744. Polimorfizmi su analizirani metodom real-time PCR. Asocijacijska analiza napravljena je na razini alelske i genotipske distribucije.

**Rezultati:** Genotipiziranjem je utvrđena je povezanost rs1808593 tag SNP-a s hipoksično-ishemičnim oštećenjem mozga ( $p=0.03$ ). Analizom omjera izgleda (engl. *odd ratio* – OR) genotipova osam polimorfizama uočena je veća učestalost TT genotipa polimorfizma rs1808593 (-10G/T u intronu 23) u djece s hipoksično-ishemičnim oštećenjem mozga [OR 1.06 (95% CI 1.0-1.1)  $p=0.025$ ]. Utvrđena je povezanost TGT haplotipa polimorfizama rs1800783 (-1474T/A), rs1800779 (-922 A/G) i rs2070744 (-786T/C) s hipoksično-ishemičnim oštećenjem mozga ( $p=0.001$ ). Distribucijom genotipova ispitivanih polimorfizma s obzirom na kliničke parametre utvrđena je povezanost TT genotipa polimorfizma rs1808593 s patološkim nalazom magnetske rezonancije. Uočena je veća učestalost AA genotipa polimorfizma rs3918186 u ispitanika s urednim Apgar indeksom. Analizom povezanosti alelske distribucije svih osam ispitivanih polimorfizama nije dobivena statistički značajna povezanost s HIE. Analizom distribucije alela ispitivanih polimorfizama s obzirom na kliničke parametre utvrdili smo da je T alel SNP-a rs1808593 učestaliji u djece s niskim AS ( $p=0.015$ ). Drugi polimorfizmi nisu pokazali povezanost distribucije alela i genotipova s kliničkim parametrima.

**Zaključak:** Usprkos ograničenom broju ispitanika s HIE što umanjuje statističku snagu studije, utvrdili smo genotipsku i haplotipsku povezanost polimorfizma *NOS3* gena s hipoksično-ishemičnim oštećenjem mozga.

**Ključne riječi:** Dojenčad, Endotelijalna sintaza dušikova monoksida (eNOS), Hipoksično-ishemična encefalopatija, Dušikov monoksid (NO), Tag polimorfizam

## SUMMARY

**Aim:** Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) is characterized with impaired cerebral circulation and increased activity of nitric oxide synthase (NOS). Activation of the eNOS in endothelial cells has a neuroprotective role. Aim of this study was to test the association of *NOS3* gene with HIE.

**Patients and Methods:** The study included 110 unrelated term or preterm born children (69 boys and 41 girls) with HIE and 128 term and preterm born children (60 boys and 68 girls) without any neurological problems after two years. Children with perinatal HIE fulfilled the diagnostic criteria for perinatal asphyxia. All children were admitted to the Clinical Hospital Split between 1992 and 2008. We analyzed 6 tagging SNPs within *NOS3* gene (rs3918186, rs3918188, rs1800783, rs1808593, rs3918227, rs1799983), in addition to previously confirmed *NOS3*-associated SNP rs1800779 and rs2070744. Genotyping was conducted using real-time polymerase chain reaction (PCR). Association analyses were performed according to allelic and genotypic distribution.

**Results:** Genotypic test detected association of rs1808593 tag SNP with HIE ( $p=0.03$ ). We found that TT genotype SNP rs1808593 (-10G/T intron 23) was more common in HIE [OR 1.06 (95% CI 1.0-1.1)  $p=0.025$ ]. We found that the TT genotype of SNP rs1808593 is more frequent in children with brain damage confirmed by MRI ( $p=0.015$ ). We also found that the genotype AA of SNP rs3918186 is more frequent in children with normal Apgar score ( $p=0.025$ ). We also observed rs1800783-rs1800779-rs2070744 TGT haplotype association with HIE ( $p=0.001$ ). Allelic test did not observe any SNP association with HIE. We found that the T allele of SNP rs1808593 is more frequent in children with low Apgar score ( $p=0.015$ ).

**Conclusion:** Despite the limited number of HIE patients that reduced the statistical power of this study, we observed genotypic and haplotype associations of *NOS3* polymorphisms with HIE.

**Key words:** Children, Endothelial nitric oxide synthase (NOS3), Hypoxic-ischemic encephalopathy, Nitric oxide, Tagging polymorphisms



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA</b> .....	1
1.1. Hipoksično-ishemična encefalopatija: biokemijski i fiziološki aspekti .....	2
1.1.1. <i>Biokemijski mehanizmi stanične smrti kod hipoksije i ishemije</i> .....	2
1.1.2. <i>Uloga slobodnih radikala dušika i kisika u hipoksično-ishemičnom inzultu</i> .....	7
1.2. Hipoksično-ishemična encefalopatija: neuropatologija i patogeneza .....	11
1.2.1. <i>Periventrikularna leukomalacija</i> .....	11
1.2.2. <i>Intraventrikularno krvarenje i periventrikularni hemoragični infark</i> .....	14
1.2.3. <i>Hipoksično-ishemična oštećenja sive i subkortikalne bijele tvari mozga</i> .....	15
1.3. Klinički znakovi hipoksično-ishemične encefalopatije novorođenčeta.....	16
1.4. Dijagnostičke metode hipoksično-ishemične encefalopatije.....	18
1.5. Genetički čimbenici u razvoju perinatalnog hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga.....	22
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	26
<b>3. ISPITANICI I METODE</b> .....	28
3.1. Ispitanici.....	28
3.2. Metode .....	30
3.2.1. <i>Genotipizacija uzoraka</i> .....	30
3.2.2. <i>Izolacija genomske DNA</i> .....	30
3.2.3. <i>Genotipizacija osam polimorfizama pomoću TaqMan real-time PCR metode</i> ...	31
3.3. Statistička obrada podataka .....	33
3.3.1. <i>Analiza kvalitete</i> .....	33

3.3.2. Analiza povezanosti .....	35
<b>4. REZULTATI....</b> .....	<b>37</b>
4.1. Rezultati analize kvalitete dobivenih podataka .....	38
4.2. Rezultati analize povezanosti .....	38
4.2.1. Rezultati analize povezanosti distribucije alela .....	38
4.2.2. Mapa neravnoteže vezanosti (LD mapa) .....	39
4.2.3. Rezultati analize povezanosti haplotipova .....	40
4.2.4. Rezultati analize povezanosti distribucije genotipova .....	41
4.2.5. Rezultati analize distribucije genotipova prema kliničkim parametrima i nalazu magnetske rezonancije.....	42
4.2.6. Rezultati analize distribucije alela prema kliničkim parametrima i nalazu magnetske rezonancije.....	44
4.2.7. Rezultati analize povezanosti distribucije genotipova i alela prema kliničkim parametrima zasebno za svaku ispitivanu skupinu.....	45
4.2.8. Rezultati analize povezanosti genotipova i kliničkih parametara s izgledom za nastanak hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga.....	46
4.2.9. Rezultati usporedbe stupnja oštećenja mozga i kliničkih parametara .....	48
<b>5. RASPRAVA</b> .....	<b>51</b>
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>62</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>64</b>

## **TUMAČ ZNAKOVA I KRATICA**

## **ŽIVOTOPIS**

# 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Hipoksično-ishemično oštećenje mozga u perinatalnom periodu najčešći je uzrok blažih ili težih neurorazvojnih odstupanja u djece kao što su cerebralna paraliza, epilepsija, određeni oblici duševne zaostalosti te kognitivni i senzorni poremećaji itd (1, 2). Neurorizični čimbenici u perinatalnom razdoblju koji najčešće dovode do hipoksično-ishemičnog i/ili hemoragičnog oštećenja mozga su asfiksija, intrauterini zastoj rasta, nedonošenost, respiracijski distresni sindrom, apneja, perinatalna infekcija, novorođenče majke dijabetičarke i majke s gestacijskim dijabetesom, hemoragijska dijateza, traumatski porođaj (3, 4). Nedonoščad je posebno ugrožena skupina novorođenčadi za nastanak hipoksično-ishemičnog i hemoragičnog oštećenja mozga, a incidencija navedenih ozljeda to je veća što je niža gestacijska dob, tj. što je nedonoščad nezrelija (5, 6).

Za razumijevanje hipoksično-ishemičnih procesa i njihovih posljedica, neophodno je poznavanje biokemijskih i fizioloških procesa koji dovode do perinatalnog oštećenja mozga. Većina saznanja dobivena su eksperimentalnim istraživanjima na animalnim modelima, međutim, razvoj tehnologije, posebno slikovnih pretraga, magnetske rezonancije (MR) i magnetske spektroskopije (MS) omogućio nam je *in vivo* prikazati stanje zrelosti mozga i otkriti strukturalna i funkcionalna oštećenja (7).

Samo dobro razumijevanje patogeneze hipoksično-ishemične encefalopatije (HIE) razjasniti će djelovanje mogućih etioloških čimbenika, a sve veći broj istraživanja u tom smjeru, nudi nadu u otkriće efikasnih preventivnih postupaka (8, 9).

## **1.1. Hipoksično-ishemična encefalopatija: biokemijski i fiziološki aspekti**

HIE nastaje kod nedonešene i donošene djece nakon intrauterine infekcije i/ili horioamnionitisa, prijevremenog prsnuća vodenjaka, traume i šoka majke. Sve su to stanja gdje hipotenzija - hipoperfuzija dovodi do ishemije, smanjenog protoka krvi kroz mozak i hipoksije smanjene količine kisika u krvi te započinje kaskada biokemijskih događanja, koji teško i trajno oštećuju mozak. Nedostatak kisika ali i smanjena količina glukoze su ključni u genezi oštećenja (9). Period restitucije moždane cirkulacije (reperfuzija), također može pridonijeti daljnjem oštećenju moždanog tkiva koje je započeto hipoksijom/ishemijom. Nakon reperfuzije ishemičnog tkiva, dolazi do stvaranja slobodnih radikala kisika i dušika, koji naknadno oštete stanične lipide, proteine i nukleinske kiseline (10).

### ***1.1.1. Biokemijski mehanizmi stanične smrti kod hipoksije i ishemije***

Osnovni biokemijski mehanizmi stanične smrti kod hipoksije i ishemije su veoma slični (11). Razlikujemo dva osnovna modela stanične smrti živčanog sustava: nekroza i apoptoza. Zadnjih godina pokušavaju se razjasniti molekularni mehanizmi uključeni u apoptozu i nekrozu tijekom perinatalne hipoksije i ishemije. Hipoksično-ishemični inzul, može dovesti do nekroze i/ili apoptoze, ovisno o težini inzulata i maturaciji same stanice (12, 13).

Stanična smrt kod hipoksije i ishemije započinje nedovoljnom opskrbom tkiva kisikom (i glukozom), te nedovoljnim stvaranjem energije. Međutim, procesi koji se pri tome aktiviraju nadilaze samo manjak glukoze i energije, te uključuju daleko veći broj molekularnih mehanizama koji dovode do smrti stanice (14). Odmah nakon hipoksično-ishemičnog inzulata, dolazi do početnog poremećaja stvaranja energije zbog nedostatka kisika i poremećaja oksidativne fosforilacije (smanjenje proizvodnje visoko-energetskih spojeva kao što su adenzin trifosfat (ATP) i fosfokreatinin). Posljedica toga je promjena aerobnog metabolizma u anaerobni i nakupljanje laktata i vodikovih iona. Njihovo nakupljanje je adaptacijski mehanizam prilagodbe na manjak kisika, ali kasnije, s daljnjom akumulacijom

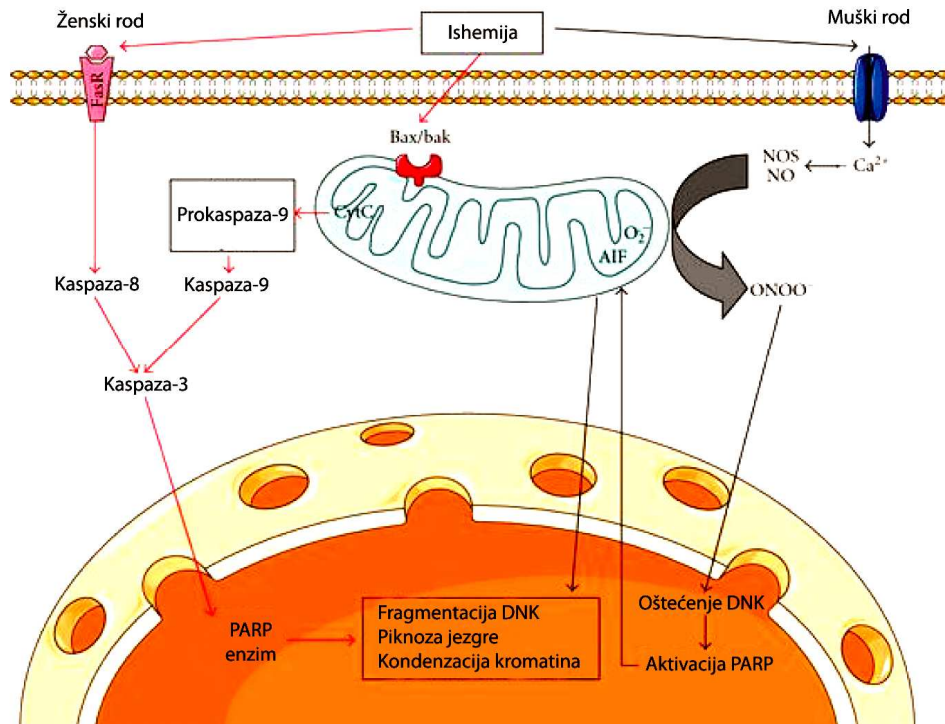
laktata dolazi do 1. poremećaja vaskularne autoregulacije i pogoršanja ishemije, 2. inhibicije aktivnosti fosfofruktokinaze niskim pH koja je ključni enzim u procesu glikolize, 3. te početka biokemijske kaskade koja dovodi do staničnog oštećenja (15).

Početno smanjenje visoko-energetskih fosfata aktivira daljnje procese, smanjena je aktivnost ATP-aza-ovisne  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  pumpe. U stanici se nakuplja  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  i voda, nastaje citotoksični edem praćen depolarizacijom membrane s pretjeranim otpuštanjem ekscitatornih neurotransmitera, posebno glutamata. Zadnja dva desetljeća brojne studije su pokazale veliku važnost glutamata kao medijatora smrti neurona i pre-oligodendrocita u hipoksično-ishemičnom procesu (16, 17).

Glutamat je najvažnija ekscitatorna amino kiselina u mozgu, djeluje preko tri glavna tipa inotropnih receptora: N-metil-D-aspartat receptora (engl. *N-methyl-D-aspartate* – NMDA) i alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionske kiseline (engl. *alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid* – AMPA), kainatnog receptora (engl. *kainate receptor* – KA), te preko metabotropnih glutamatnih receptora, koji se nalaze u većini neurona i glija stanica (17). U normalnim uvjetima, glutamatni inotropni receptori sudjeluju u stabilizaciji sinapsa, pridonose plasticitetu mozga i ekscitaciji neurona i odgovorni su za procese učenja i memorije (18). Ta vitalna uloga, čini neurone i oligodendrocite posebno osjetljivim na ekscitotoksičnost glutamata čime pridonosi i prolazno povećana ekspresija NMDA receptora u perinatalnom periodu (17, 19).

Ekstracelularna koncentracija glutamata povećava se višestruko u hipoksiji i ishemiji. Povećanje koncentracije ekstracelularnog glutamata i aktivacija glutamatnih receptora poslije hipoksije-ishemije započinje, ekscitotoksičnu kaskadu (20). Dolazi do povećanog ulaska  $\text{Ca}^{2+}$  kroz NMDA i AMPA kanale, te se nastavlja razarajući kaskadni put sve do same apoptoze stanice. Postoje dva puta aktivacije apoptoze. Receptorski (vanjski) put apoptoze, ide putem aktivacije već spomenutih vanjskih glutamatnih receptora, NMDA i AMPA, i aktivacijom kaspaze-8. Unutarnji put apoptoze ide preko mitohondrija i kaspaze-9. U konačnosti, oba puta dovode do aktivacije kaspaze-3, što rezultira aktivacijom poli-ADP-riboza polimeraze (PARP) i nukleosomalne deoksiribonukleinske kiseline (DNA) te konačno njenom fragmentacijom. Kaspaza-3 je aktivirana u roku 1-3 sata nakon hipoksično-ishemičnog inzulta.

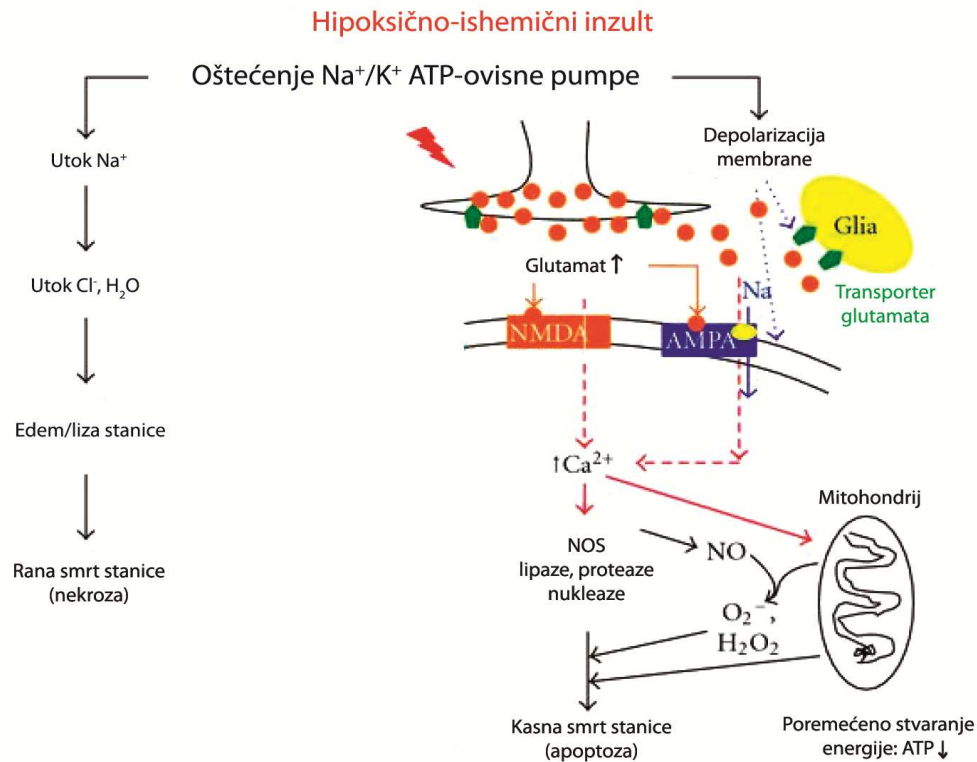
Osim što zajednički završavaju aktivacijom kaspaze, unutrašnji i vanjski put apoptoze isprepleću se i na drugim razinama (Slika 1) (21).



**Slika 1.** Mehanizam stanične smrti aktivacijom poli-ADP-riboza polimeraze (PARP) i apoptoza inducirajućeg faktora (AIF) i citokrom C-kaspaze u mozgu nakon ishemiije.

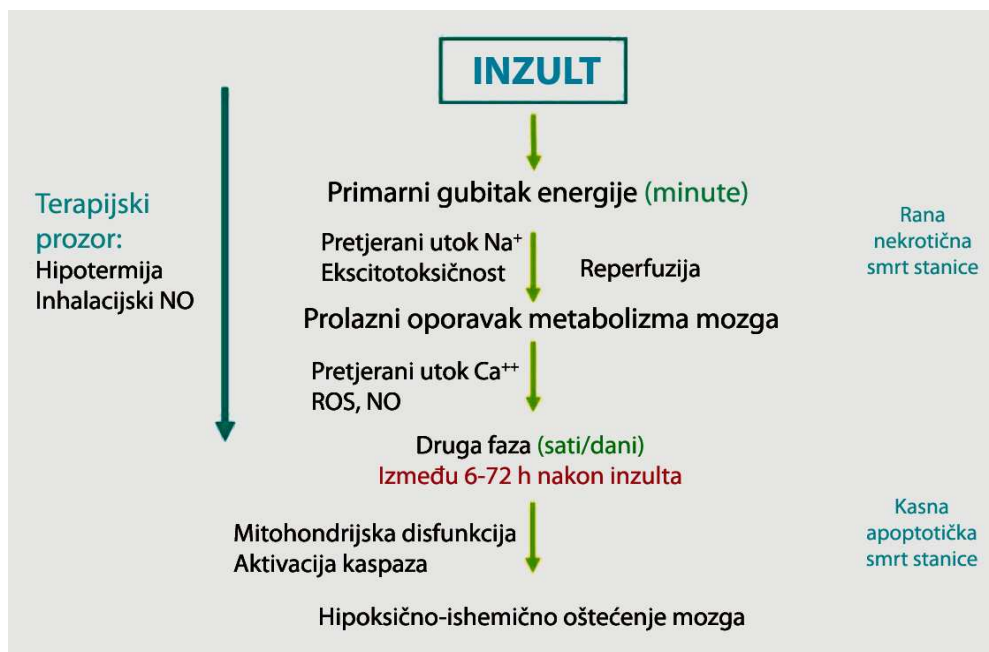
Prilagođeno prema referenci (22).

Nedostatno stvaranje energije dovodi do ulaska Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> i vode u stanicu s posljedičnom nekrozom, ranom smrti stanice. U stanicu ulazi i Ca<sup>2+</sup> koji osim aktivacije kaspaznog puta, direktno aktivira fosfolipaze s posljedičnom degradacijom lipida, proteaze koje razgrađuju stanične proteine, posebno citoskeletne elemente. Kalcij aktivacijom nukleaza razgrađuje staničnu DNA, a daljnji mehanizam razgradnje dijelova stanice posredovan je aktivacijom sintaze dušikova monoksida (engl. *nitric oxide synthase* – NOS) te stvaranjem slobodnih radikala kisika i dušika koji dovode do apoptoze, kasne smrti stanice (Slika 2) (14, 23).



**Slika 2.** Patogeneza hipoksično-ishemične encefalopatije (AMPA-  $\alpha$ -amino-3-hidroksil-5-metil-4-isoksazole-propionat; ER- endoplazmatski retikulum; NMDA - N-metil-D-aspartična kiselina; NOS- sintaza dušikova monoksida; VDCC- voltažno-ovisni kalcijevi kanali; NO - dušikov monoksid; ATP - adenzin trifosfat). Prilagođeno prema referenci (24).

Nekrotična smrt stanice tipično se javlja nakon intenzivnog i kratkog inzulta, dok se apoptoza javlja nakon manje intenzivnog inzulta, dužeg je trajanja i specifična je za nezrelu bijelu tvar mozga (Slika 3) (25).



**Slika 3.** Shema patogeneze hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga te period mogućeg terapijskog djelovanja. Prilagođeno prema referencama (1, 15).

Kompleks molekularnih kaskadnih događaja uključenih u nekrozu i apoptozu traje nekoliko sati do nekoliko dana, čime nam se pruža mogućnost terapijskog prekidanja tih kaskadnih događaja tijekom tog relativno dugog perioda (26).

Hipotermija s posljedičnim usporavanjem metabolizma mozga, magnezij kao blokator NMDA receptorskih kanala, blokatori kalcijevih kanala, NOS inhibitori, inhibitori kaspaza, alopurinol kao blokator ksantin oksidaze, indometacin koji sprječava stvaranje slobodnih radikala mogući su neuroprotektivni lijekovi i zadnjih godina su predmet sve većeg broja istraživanja (27).

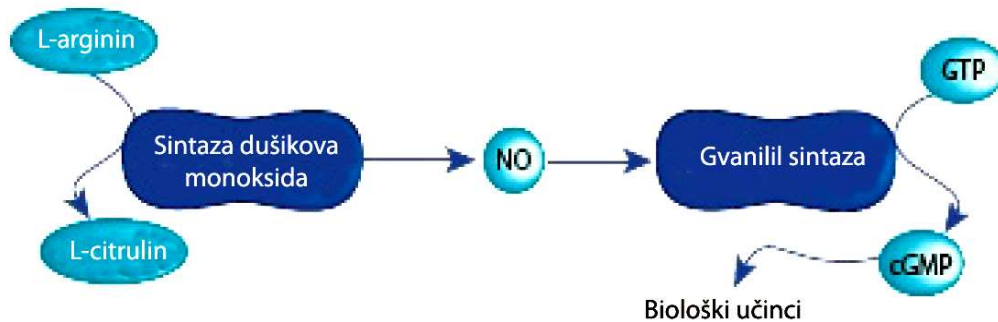


### ***1.1.2. Uloga slobodnih radikala dušika i kisika u hipoksično-ishemičnom inzultu***

Zbog nezrelih zaštitnih mehanizama, visoke koncentracije visoko zasićenih masnih kiselina u membranama moždanih stanica, visoke koncentracije slobodnog željeza u tkivu, mozak u razvoju osjetljiviji je na slobodne radikale. Neuronu su osjetljiviji od glija stanica, ali i prekursori oligodendrocita i nezreli oligodendrociti također pokazuju izuzetnu osjetljivost na antioksidanse i slobodne radikale. Slobodni radikali, reaktivni metaboliti kisika (engl. *reactive oxygen species* – ROS) i dušika (engl. *reactive nitrogen species* – RNS) igraju važnu ulogu u pokretanju mehanizma apoptoze i mitohondrijske propusnosti. Izloženost stanjima koja dovode do pojačane produkcije ROS (npr. hipoksija-ishemija-reperfuzija) uz prisustvo slobodnog željeza dovodi do oksidativnih oštećenja stanica. Teža se oksidativna oštećenja dešavaju tijekom reperfuzije, nego u samom početku hipoksije-ishemije. Najčešći slobodni radikal kisika je superoksidni anion  $O_2^-$ , koji se konvertira u vodikov peroksid pomoću superoksid dismutaze (28, 29).

Slobodni radikali kisika (superoksidni -  $O_2^-$  i hidroksilni –  $OH^\cdot$ ) su veoma reaktivne molekule koje zbog slobodnog elektrona na vanjskoj elektronskoj ljusci brzo ulaze u lančane reakcije. Kod novorođenčeta izvori ROS-a su hipoksantin-ksantin oksidaza, arahidonska kiselina, slobodno željezo, metaboliti kateholamina i aktivirani fagociti. Oni induciraju apoptozu stanica, direktno ili indirektno depolarizacijom mitohondrijskih membrana. Brojni enzimi su uključeni u stvaranje ROS-a: nikotin amid adenin dinukleotid i nikotin amid adenin dinukleotid fosfat (NADH/NADPH), oksidaza, ksantin oksidaza, lipooksigenaza, ciklooksigenaza, P-450 monooksigenaza, enzimi mitohondrijske oksidativne fosforilacije i NOS- a (28).

NOS-a uključena je u stvaranje i reaktivnih metabolita dušika, time i dušikova monoksida (NO), a sintetizira ga iz aminokiseline L-arginin (Slika 4).



**Slika 4.** Sinteza dušik monoksida (NO) iz L-arginina uz pomoć enzima sintaze dušikova monoksida. (GTP – gvanozin trifosfat, cGMP – ciklički gvanozin monofosfat).

Prilagođeno prema referenci (30).

Postoje dva oblika NOS: inducibilna (iNOS) i konstitutivna (cNOS). Konstitutivna NOS koja je aktivna u vaskularnim endotelnim stanicama naziva se endotelna sintaza dušikova monoksida (engl. *endothelial nitric oxide synthase* – eNOS), dok ona koja je aktivna u centralnom i perifernom živčanom sustavu naziva se neuralna sintaza dušikova monoksida (engl. *neuronal nitric oxide synthase* - nNOS). Mitohondrijalna NOS (engl. *mitochondrial NOS* - mtNOS) je izoforma nNOS i djeluje na unutarnjoj strani mitohondrijalne membrane (31, 32).

nNOS i eNOS su  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin-ovisni enzimi koji stvaraju NO, što traje do nekoliko minuta. Nasuprot tome, iNOS je  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin-neovisan enzim, stvara se pod utjecajem imunoloških ili upalnih procesa u makrofazima, astrocitima, mikrogliji i stvara velike količine NO koje traju satima i danima (33).

NO ima višestruki učinak na stanice. Neka od tih djelovanja su aktivirana gvanilat ciklazom, s posljedičnim stvaranjem gvanozin monofosfata i proteinskom fosforilacijom. Drugi biološki učinci su nitracija proteina preko nitro spoja ( $\text{NO}_2$ ), zatim nitrozilacija, te stvaranje peroksinitrita,  $\text{ONOO}^-$  i drugih reaktivnih međuprodukata koji vrše oksidaciju aminokiselina. Biološki učinci takvih metaboličkih reakcija NO su proliferacija stanica, apoptoza, sudjelovanje u energetske metabolizmu mitohondrija i signalnom provođenju (34).

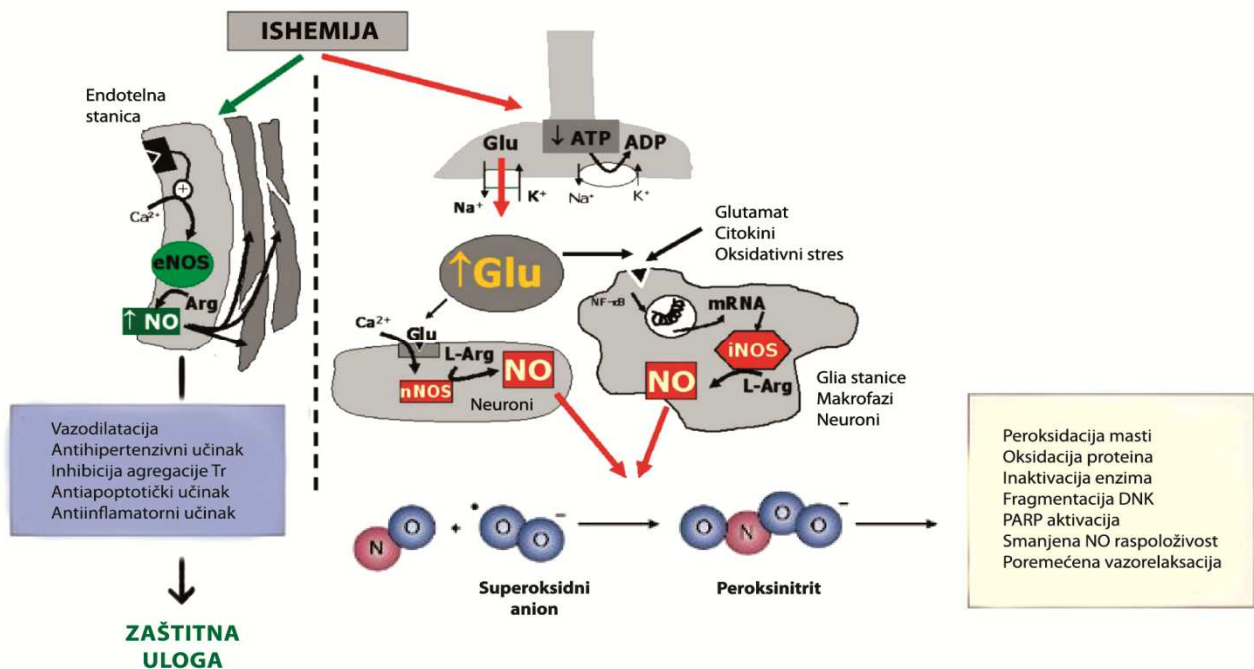
Aktivnost NOS je ovisna o stupnju zrelosti mozga, što ukazuje na mogućnost da NO ima i značajnu ulogu tijekom razvoja mozga, najvjerojatnije tijekom sinaptogeneze i mijelinizacije (35). eNOS katalizira stvaranje NO u endotelnim stanicama, trombocitima, glatkim mišićnim stanicama, miocitima srca, stanicama kosti i neuronima (36). U endotelnim stanicama proizveden NO ima zaštitnu ulogu. Prvih nekoliko minuta, nakon inzulta, blago izlaganje ishemiji aktivira eNOS,  $\text{Ca}^{2+}$  ovisni enzim i stvaraju se male količine NO. NO reagira s čitavim nizom molekula, između ostalog, aktivira već spomenutu gvanilat ciklazu, povećava ciklički gvanozin monofosfat (cGMP) s posljedičnim proširenjem krvnih žila i regulacijom tlaka. NO može direktno aktivirati kalcij ovisne kalijeve kanale i na taj način proširiti krvne žile. Također, NO kataliziran od eNOS utječe i na druge procese: agregaciju trombocita, adheziju trombocita i leukocita na endotel, stvaranje endothelina-1, inhibiciju proliferacije glatkih mišićnih stanica krvnih žila, stimulaciju angiogeneze, protuupalno djelovanje, sprječavanje oksidativnih oštećenja (36). Potičući S-nitrozilaciju NMDA receptora smanjuje utok  $\text{Ca}^{2+}$  u stanicu, djelujući protektivno na same neurone (37, 38). Svi ti procesi zajednički pridonose zaštitnoj ulozi NO i eNOS-a. Zbog važne uloge NO u tim procesima, poremećena sinteza NO od strane eNOS u vaskularnim endotelnim stanicama, može pridonijeti razvoju ishemičnih oštećenja (39).

U situaciji intenzivnije hipoksije-ishemije, aktivira se nNOS, stvarajući velike količine NO koji reagira sa superoksidnim anionom  $\text{O}_2^-$  i stvara peroksinitrit. Peroksinitrit dovodi do smrti neurona uzrokujući oštećenje mitohondrija, gubitak energije te daljnji poremećaj homeostaze kalcija (26, 40).

U kasnijem tijeku hipoksije-ishemije-reperfuzije, u astrocitima i makrofazima, dolazi do aktivacije iNOS, stvaraju se još veće količine NO kroz duži period. Aktivacija iNOS javlja se usporedo s upalnim odgovorom, kao odgovor na aktivaciju citokina: tumor-nekrotskog faktora-alfa ( $\text{TNF-}\alpha$ ), interleukina beta ( $\text{IL-1}\beta$ ) i interferona- $\gamma$ . Oštećenje stanica nastavlja se stvaranjem peroksinitrita, dolazi do nitracije proteina, neurotoksičnosti i smrti neurona (41).

Smatra se da je NO jedan od najvažnijih čimbenika smrti pre-oligodendrocita (pre-OL) u periventrikularnoj leukomalaciji. Toksičnost NO prema oligodendrocitima ovisi o stupnju njihove zrelosti, pre-OL su daleko osjetljiviji nego zreli mijelin bazični protein oligodendrociti. Do smrti pre-OL dolazi zbog stvaranja peroksinitrita ili aktiviranjem apoptoza inducirajućeg čimbenik (engl. *apoptosis inducing factor* - AIF) koji iz mitohondrija ulazi u jezgru i dovodi do kaspaza neovisne smrti stanice (Slika 1) (42, 43).

NO dakle utječe na aktivnost različitih organa, kako u normalnim tako i u patološkim situacijama. U mozgu ima ulogu neurotransmitera i relaksirajući učinak na stijenku krvnih žila. Veoma je važan za razvojne i regenerirajuće procese tkiva, u niskim koncentracijama potiče oporavak, dok u visokim izaziva oštećenje stanica. Točna uloga NO u patogenezi ishemičnog oštećenja mozga još je uvijek izvor brojnih dvojbi. Potičući cirkulaciju kroz ishemično tkivo i smanjujući utjecaj hipoksije, djeluje neuroprotektivno, a stvaranjem RNS, djeluje neurotoksično dovodeći do smrti neurona i oštećenja mozga (Slika 5). Razumijevanje uloge NOS-a i NO može nas dovesti do prevencije i/ili liječenja ishemičnih oštećenja (26, 41).



**Slika 5.** Neuroprotektivna i neurotoksična uloga dušikova monoksida tijekom ishemiije. (eNOS – endotelijana sintaza dušikova monoksida, nNOS – neuralna sintaza dušikova monoksida, iNOS – inducibilna sintaza dušikova monoksida, NO – dušikov monoksid, ATP – adenzin trifosfat, ADT – adenzin difosfat, mRNA - prijenosnička ribonukleinska kiselina, DNA – deoksiribonukleinska kiselina, Glu – glukoza, L- Arg – L- arginin). Prilagođeno prema referenci (44).

Eksperimentalne studije pokazuju da su prve promjene nakon izlaganja hipoksiji promjene u neuronima, koje se javljaju 5-30 minuta nakon pojave hipoksije. U zrelom i nezrelom mozgu redosljed osjetljivosti stanica na hipoksiju-ishemiju je isti: neuron > oligodendroglia > astrocit > mikroglia. Apoptotička smrt stanica dominira u nezrelim neurona, dok je nekroza karakteristična za zrele neurone (45).

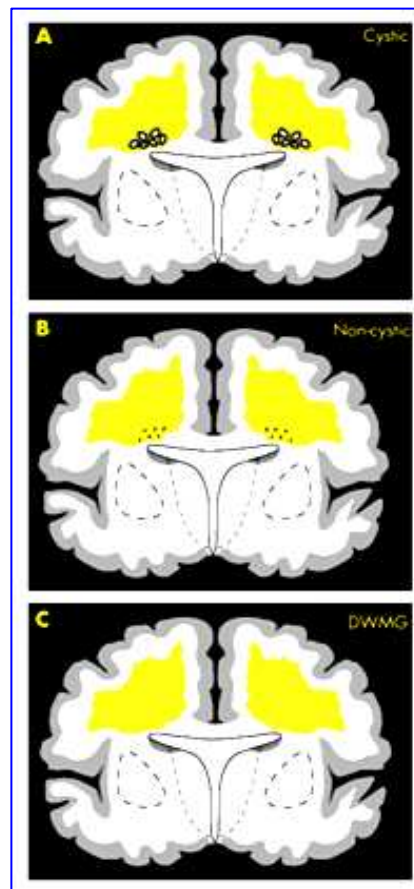
## **1.2. Hipoksično-ishemična encefalopatija: neuropatologija i patogeneza**

Neuropatološke osobine neonatalne HIE ovise o stupnju zrelosti mozga, gestacijskoj dobi, trajanju i težini inzulta, terapijskim postupcima.

### ***1.2.1. Periventrikularna leukomalacija***

Periventrikularna leukomalacija (PVL) je nekroza bijele tvari mozga karakteristične distribucije: straga i postranično od vanjskih kutova lateralnih komora, područje centruma semiovale (frontalni rog i tijelo lateralne komore) i područje optičke radijacije (trigonum i okcipitalni rog) (46). PVL se najčešće javlja u (a) nedonoščadi; (b) novorođenčadi koja imaju i intraventrikularno krvarenje; (c) novorođenčadi s kardiorespiratornim poremećajem; (d) novorođenčadi sa subklinički ili klinički manifestnom intrauterinom infekcijom (46).

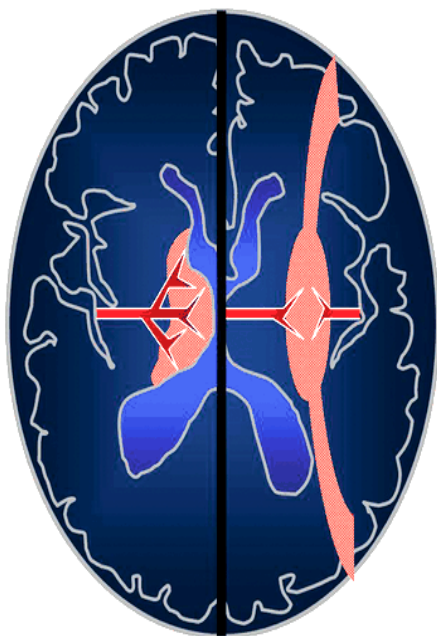
PVL može biti fokalna i difuzna. Fokalna nekroza duboke bijele tvari ima dva oblika, može ići s gubitkom svih staničnih elemenata i razvojem makroskopski vidljivih cista, glijalnih ožiljaka uz hipomijelinizaciju i smanjenje volumena centruma semiovale, te više rašireni ne-cistični oblik s zahvaćanjem centralne bijele tvari i gubitkom pre-mijelinizirajućih oligodendrocita, astrogliazom i mikroglijalnom infiltracijom. Difuzna glijoza bijele tvari (engl. *diffuse white matter gliosis* - DWMG) bez fokalne nekroze predstavlja najblaži stupanj oštećenja periventrikularne bijele tvari (Slika 6). Oštećenje bijele tvari nije izolirani supstrat te je najčešće udružen krvarenjem u germinativni matriks, s ili bez intraventrikularnog krvarenja, a u nekim slučajevima javlja se zajedno sa kortikalnim i talamičkim oštećenjem (23).



**Slika 6.** Shematski prikaz tri glavna oblika oštećenja bijele tvari u nedonoščeta. Cistična (A) i necistična (B) fokalna periventrikularna nekroza duboke bijele tvari te više difuznije oštećenje s gubitkom pre-oligodendrocita i razvojem astroglioze (C). U cističnoj periventrikularnoj leukomalaciji (A) fokalna nekrotička lezija je makroskopska i razvijaju se ciste, dok u necističnoj fokalnoj nekrozi (B) lezije su mikroskopske i nastaje glijoza. Difuzna glijoza bijele tvari (DWMG) bez fokalne nekroze (C) je najblaži oblik oštećenja bijele tvari. Prilagođeno prema referenci (23).

Patofiziološki procesi koji dovode do PVL-a su nedostatni mehanizmi regulacije cerebralne cirkulacije, nezrelost cerebralnih vaskularnih struktura i selektivna maturacijska vulnerabilnost periventrikularne bijele tvari (47). Duboka fokalna nekroza bijele tvari nastaje u tzv. „graničnoj“ hipovaskularizacijskoj zoni. Zbog nedovoljno razvijenih „duboko penetrirajućih“ krvnih žila nastaje područje nedostatne vaskularizacije u području duboke periventrikularne bijele tvari, koje je posebno osjetljivo na hipotenziju i vazodilataciju i to

postaje predilekcijsko mjesto za razvoj nekroze u nedonoščadi. Od 32. tjedna gestacije, postepeno se razvijaju „kratko penetrirajuće“ krvne žile, raste broj anastomoza s duboko penetrirajućim krvnim žilama, te granične, distalne zone središnje bijele tvari postaju manje osjetljive (48). Nasuprot tome, kod terminske novorođenčadi „granična“ hipovaskularizacijska zona je područje dna sulkusa, što odgovara razvoju subkortikalne leukomalacije nakon hipoksično-ishemičnog infarkta (Slika 7) (49).



**Slika 7.** Shematski prikaz mozga nedonoščeta (lijevo) i donošenog novorođenčeta (desno) prikazuje kako se opskrba krvlju mijenja procesom maturacije. Mozak nedonoščeta (lijevo) ima ventrikulopetalni vaskularni obrazac i hipoperfuzija oštećuje periventrikularno područje bijele tvari (crveno zasjenjeno područje). U donošenog novorođenčeta (desno), razvijen je ventrikulofugalni vaskularni obrazac i granična zona tijekom hipoperfuzije je više periferno smještena (crveno zasjenjeno područje) nastaje oštećenje subkortikalne bijele tvari i parasagitalno kortikalno oštećenje. Preuzeto iz reference (50)

Oštećenju pogoduje nezrelost krvnih žila i slabija autoregulacija, zbog nedostatka koncentričnog sloja glatkih mišićnih stanica u stijenci krvnih žila i neznatne promjene sistemskog tlaka remete perfuziju mozga (51).

Razdoblje najveće osjetljivosti za nastanak PVL-a je postkonceptijska dob 24 - 34 tjedna. U periventrikularnom području tijekom navedenog razdoblja dominiraju razvojni „nezreli“ premijelinizirajući oligodendrociti koji su osjetljivi na djelovanje slobodnih radikala (41, 52). Ova osjetljivost ovisna o maturaciji najvjerojatnije je posljedica nedovoljno razvijenih antioksidativnih enzima, kao što su superoksid dismutaza, glutation peroksidaza i katalaza, koji štite oligodendrocite od ROS i RNS (53). Pored nedovoljno razvijene antioksidantne obrane, nezreli mozak je podložan oštećenju i zbog povećane ekspresije glutamatnih receptora, NMDA i AMPA/kainat, u periodu od 24. do 32. tj. gestacije, koji su odgovorni za prekomjeran ulazak  $Ca^{2+}$  u stanicu (54, 55).



### **1.2.2. Intraventrikularno krvarenje i periventrikularni hemoragični infarkt**

Anatomsko mjesto nastanka krvarenja je germinativni matriks, embrionalna struktura koja prema kraju gestacije postupno nestaje, ali još uvijek postoji između 26. i 32. tjedna gestacije, a nalazi se ispod prednjih rogova lateralnih komora, periventrikularne zone smještene između nukleusa kaudatusa i talamusa u razini foramena Monro. Iz tog mjesta krvarenje se može širiti prema okolnim peri- i intraventrikularnim strukturama, pa se iz periventrikularnog (PVK) često razvije intraventrikularno krvarenje (IVK) (56). Germinativni matriks i pridružena ventrikularna germinativna zona su mjesto proliferacije kortikalnih neurona i preteča glijalnih stanica u fetalnom mozgu. Nakon toga perioda, iza 34. tjedna gestacije, ventrikularna germinativna zona s matriksom nestaje tako da se krvarenje u germinativnom matriksu zajedno sa IVK u pravilu javlja kod nedonoščadi. Krvarenje iz pleksusa korioideusa u pravilu se javlja kod terminske novorođenčadi (57).

Krvne žila germinativnog matriksa predstavljaju graničnu zonu ventrikulofugalnih i ventrikulopetalnih žila nezrelog mozga i lako pucaju, zbog vrlo tankog zida, nedostatka adventicije, relativno širokog lumena i slabe mogućnosti autoregulacije. Također, intravaskularni čimbenici kao što su porast i smanjenje protoka krvi u stanjima hipoksije-ishemije; porast krvnih tlakova u trenutku reperfuzije te poremećaj trombocita i koagulacije pridonose PV-IVK, a dijelom su uvjetovani neadekvatnom aktivnosti pojedinih izoformi NOS-a. Nadalje, pojačana aktivnost germinativne zone zbog proliferacije stanica i time veća potreba za kisikom čine ovo područje izuzetno osjetljivim u stanjima hipoksije i ishemije (58, 59).

Periventrikularni hemoragični infarkt predstavlja hemoragičnu nekrozu bijele tvari koja je uglavnom opsežna i asimetrična, najčešće je povezana sa IVK. Istraživanja Takashima i sur. te Golud i sur. naglašavaju da se periventrikularni hemoragični infarkt dešava u području ventrikularnih kutova gdje se medularne vene bijele tvari mozga spajaju s terminalnim venama subependimalne regije (51, 60).

Ta topografija je razlog što se periventrikularna hemoragična nekroza javlja zajedno sa velikim IVK. IVK izaziva periventrikularnu vensku kongestiju pritiskom na terminalne vene, poremeti se cirkulacija u medularnim venama bijele tvari, dolazi do periventrikularne ishemije i posljedično do periventrikularnog venskog hemoragičnog infarkta (61).



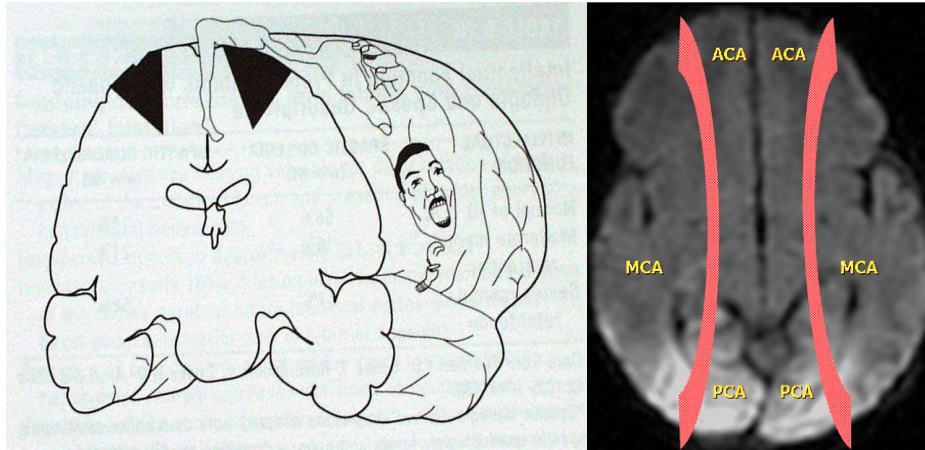
Periventrikularni hemoragični infarkt se ne smije zamijeniti sa hemoragičnom PVL-om koja se razvija u području arterijskih graničnih zona, u blizini trigonuma lateralnih komora, na mjestu već razvijene PVL, simetrično (51).

### ***1.2.3. Hipoksično-ishemična oštećenja sive i subkortikalne bijele tvari mozga***

Hipoksično-ishemično oštećenje mozga u terminu rođene novorođenčadi pokazuje značajne razlike u pogledu zastupljenosti i razmještaja u odnosu na istovrsno perinatalno oštećenje mozga nedonoščadi. Razmještaj hipoksično-ishemičnih oštećenja mozga terminske novorođenčadi pokazuje izrazitu predilekciju za područje korteksa – parasagitalno područje i subkortikalnu bijelu tvar tzv. "subkortikalna leukomalacija", dok u težim slučajevima oštećenjem može biti zahvaćena duboka subkortikalna siva tvar, bazalni gangliji i talamus, putamen, hipokampus, kortikospinalni put i senzornomotorni korteks i moždano deblo što je u vezi s aktivnom mijelinizacijom u tom razdoblju razvoja mozga (62, 63).

Najčešće perinatalno oštećenje donošenog novorođenčeta je „selektivna neuronalna nekroza“ koja zahvaća koru mozga i duboke (subkortikalne) jezgre mozga i produženu moždinu (64).

Parasagitalno oštećenje mozga se javlja u donošenog novorođenčeta, zahvaća koru mozga i subkortikalnu bijelu tvar. Oštećenje je simetrično i bilateralno. Nastaje kao posljedica cerebralne ishemije, koju prati poremećena cerebrovaskularna autoregulacija i sistemska hipotenzija (Slika 8) (64). Krajnja smrt stanica, ide preko ekscitatornih (glutamatnih) receptora i pogađa neurone kore mozga ali i preOLs subkortikalne bijele tvari (65).



**Slika 8.** Parasagitalno oštećenje. Moždani parenhim između glavnih arterija (između prednje moždane arterije (engl. *anterior cerebral arteries* - ACA) i srednje moždane arterije (engl. *middle cerebral arteries* - MCA) i između srednje i stražnje moždane arterije (engl. *posterior cerebral arteries* - PCA) je posebno osjetljivo na hipoperfuziju. Preuzeto iz reference (50).

### 1.3. Klinički znakovi hipoksično-ishemične encefalopatije novorođenčeta

Radi adekvatnog i pravovremenog liječenja novorođenčadi i nedonoščadi s oštećenjem mozga potrebno ih je što ranije i što preciznije otkriti. „Terapeutski prozor“, vremenski period koji nastupa iza hipoksije-ishemije, a u kojem rana intervencija može polučiti uspjeh, vrlo je kratak, 6-12 sati (66). Simptomi perinatalne ozljede mozga mogu se pojaviti neposredno nakon rođenja ili mogu nastupiti vrlo naglo gotovo neočekivano 12, 24 ili više sati ili pak nekoliko dana poslije rođenja, kada se već čini da je novorođenče prebrodilo najopasnije vrijeme prilagođavanja na ekstrauterini život. Simptomi se mogu svrstati u nekoliko skupina od općih cerebralnih simptoma, kao što su poremećaji stanja svijesti ili ekscitabilnost, poremećaji tonusa muskulature, cerebralni napadi, znakovi zatajenja vitalnih funkcija. Nema niti jednog pojedinačnog simptoma, laboratorijskog nalaza ili patofiziološkog mjerila na temelju kojeg bi se mogla postaviti dijagnoza perinatalnog hipoksičnog-ishemičnog oštećenja mozga. Naprotiv dijagnoza se temelji na više kliničkih,

laboratorijskih i funkcionalnih pojava koje se nadovezuju jedna na drugu, tako da se potvrda dijagnoze u pravilu utvrdi tek pri kraju zbiljanja (67).

Prepoznavanje i praćenje takvog novorođenčeta osniva se na anamnestičkim podacima povećanog rizika, zatim nadzor samog tijeka poroda i praćenje fetalne srčane akcije kardiografijom, ultrazvučnim nadzorom ploda, te po porodu bodovanje po Apgarovoj. Prognoističku vrijednost ocjene prema Apgarovoj prvi su istakli već Nelson i Ellenberg. Ustanovili su lošiju prognozu za nedonoščad i nedostaščad kod nižih vrijednosti Apgar indeksa (engl. *Apgar score* – AS) (68). Novorođenčad s HIE nerijetko se po porodu oživljava (intubacija, masaža srca, primjena epinefrina), a znak HIE je i teška fetalna acidemia (pH umbilikalne arterije <7,1, i/ili deficit baza >12mEq/L) (69).

U kliničkoj praksi za ocjenu težine HIE kod novorođenčeta s navršenih 34 tj. gestacije još uvijek se najviše upotrebljava ocjena po Sarnatu i Sarnatu (Tablica 1), koja uzima u obzir smetnje svijesti, mišićnog tonusa i položaja, kompleksnih refleksa, autonomnog živčanog sustava i prisutnost konvulzija (70). Važno je i trajanje promjena, kod blage HIE trajanje je manje od 24 sata, kod teških oblika više tjedana pa čak i mjeseci (67, 70).

**Tablica 1.** Stupnjevi hipoksično-ishemične encefalopatije (HIE) po Sarnatu i Sarnatu (70)

	I stupanj	II stupanj	III stupanj
Svijest	Hiperaktivnost	Letargija	Stupor
Mišićni tonus	Normalan	Blaga hipotonija	Teška hipotonija
Položaj	Blaga distalna fleksija	Izrazita distal. fleksija	Decerebracija povremeno
Refleksi	Življi	Veoma naglašeni	Odsutni
Neonatalni refleksi			
- sisanje	Slabo	Veoma slabo	Odsutno
- Moro	Veoma pojačan	Slabije izražen	Odsutan
- tonični vratni refleks	Abnormalan	Naglašen	Odsutan
Autonomno živčevlje	Hiperaktivn. simpatikus	Hiperaktivn. parasimpati.	Neaktivno
Konvulzije	Bez	Česte	Decerebracija
Trajanje	<24 sata	2 do 14 dana	Više tjedana

## 1.4. Dijagnostičke metode hipoksično-ishemične encefalopatije

Prepoznavanje HIE, pored dobro uzetih anamnestičkih podataka, uočavanja kliničkih znakova i simptoma, te neurološkog pregleda počiva i na analizi metaboličkih parametara koji su odraz patofizioloških procesa koji se dešavaju u mozgu (71).

Povećane vrijednosti laktata u krvi i likvoru, povećani omjer laktat/kreatinin u urinu upućuje nas na poremećaje stvaranja energije. U likvoru novorođenčadi s HIE povišene su vrijednosti ekscitatornih aminokiselina: glutamat, aspartat, glicin. Povećane su vrijednosti metabolita slobodnih radikala, hipoksantina, urične kiseline, slobodnog željeza, NO, antioksidantnih enzima što ukazuje na njihovu značajnu ulogu u hipoksično-ishemičnom oštećenju mozga. Upalni markeri - citokini - interleukini: IL-6, IL-10, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  su prisutni u biološkim tekućinama kod novorođenčeta s HIE. Pojedinačno određivanje svakog parametra može nas uputiti na razvoj HIE (72). Specifični proteini mozga koji su sastavni dio neurona (neuron specifična enolaza, neurofilament, kreatin kinaza – BB) i astrocita (S-100, gljalni fibrilarni protein) su povišeni u likvoru i krvi prvih nekoliko sati nakon početka hipoksije-ishemije i pokazuju jasnu korelaciju s težinom kliničke slike i opsežnošću oštećenja na slikovnim pretragama mozga, te su rani biomarkeri hipoksično-ishemičnog oštećenja (66).

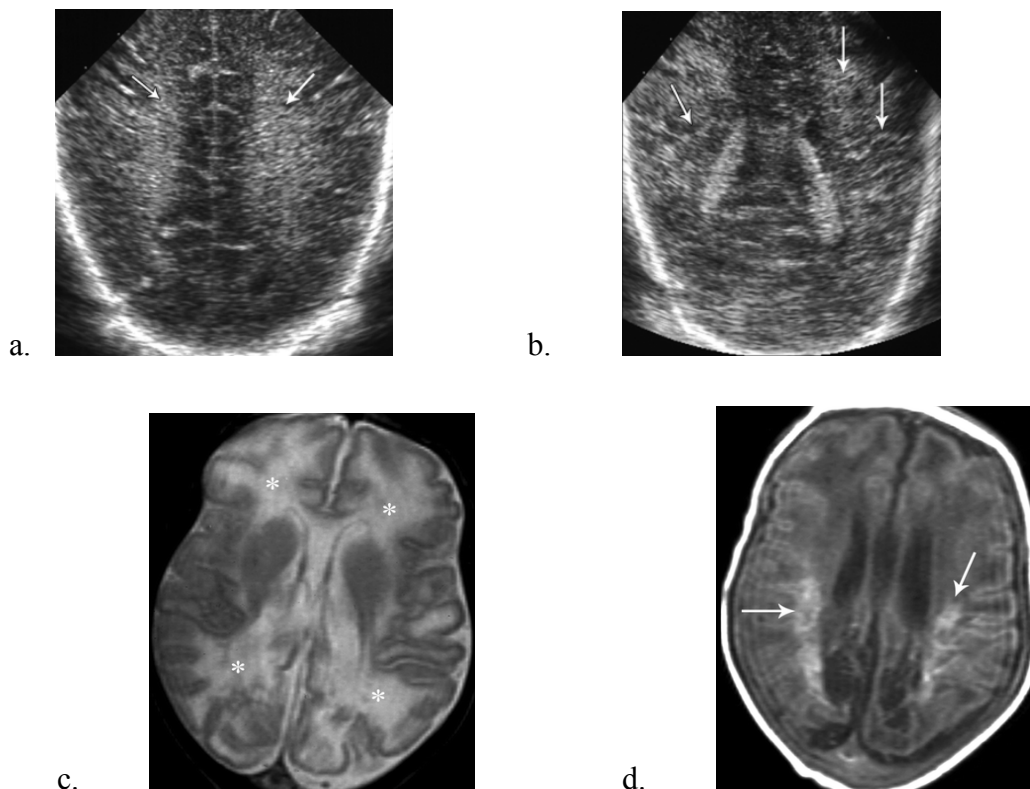
Ovisno o stupnju maturacije mozga u vrijeme inzulta, težine hipotenzije i dužine trajanja inzulta razviti će se i različita neuropatološka oštećenja. Dijagnostika HIE između ostalog uključuje i slikovne pretrage mozga. Najviše se upotrebljava ultrazvuk kojim se može dijagnosticirati PVL, PV-IVK i posljedični hidrocefalus (73).

Intrakranijska ultrasonografija (UZV) je posljednjih 20 godina postala metoda izbora u dijagnostici i praćenju ishoda strukturnih promjena nakon perinatalnog oštećenja mozga s pouzdanim prikazom vrste, lokalizacije i opsega oštećenja kako hipoksično-ishemičnog tako i peri-intraventrikularnog krvarenja. Zahvaljujući ovoj metodi još intrauterino, a posebno postnatalno mogu se dijagnosticirati perinatalna oštećenja mozga, prije svega PVL te PV-IVK koji su najčešće povezani s razvojem cerebralne paralize (Slika 9a, 9b, 10, 11a). Blaži stupnjevi PVL koji ne podliježu cističnoj transformaciji infarkta imaju bolju prognozu, ali dijagnostika UZV-om je često nepouzdana (62, 74).

Pored UZV slikovnog prikaza, od pomoći je UZV s obojenim dopplerom kojim mjerimo brzinu protoka krvi kroz veće arterije mozga čime dobivamo uvid u moždanu perfuziju. Prognostički loš čimbenik su niske (<0,55) ili visoke (>0,85) vrijednosti rezistentnog indeksa što upućuje na poremećenu cerebrovaskularnu autoregulaciju (75). Zbog

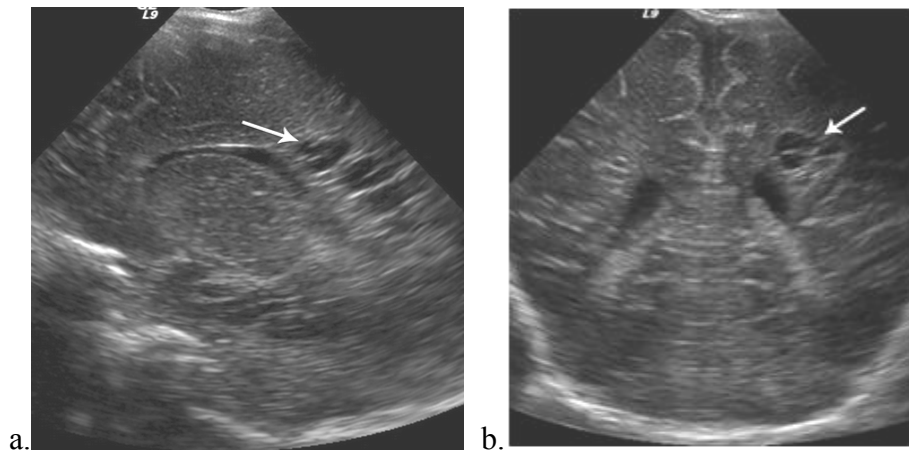
ograničenosti ultrasonografije u dijagnostici prvenstveno otvorenošću velike fontanele, u praćenju ishodnih promjena perinatalnog oštećenja mozga, koriste se druge slikovne pretrage – MR mozga i MS (62, 76).

MR mozga omogućuje vrlo dobar i pregledan prikaz strukture parenhima mozga kao i oštećenja. Ta metoda slikovnog prikaza naročito je prikladna za pouzdanu dijagnostiku PVL, uključujući i blaže, necistične oblike (Slika 9c, 9d, 11b, 12, 13) (50, 77, 78). Nove MR-tehnike omogućuju mjerenja volumena mijelizirane bijele tvari. Dokazano je da smanjeni volumen bijele tvari izravno korelira s nepovoljnim ishodom. Također, dokazano je da djeca s PVL-om imaju smanjeni volumen sive tvari moždane kore, što objašnjava njihov intelektualni deficit (79, 80).



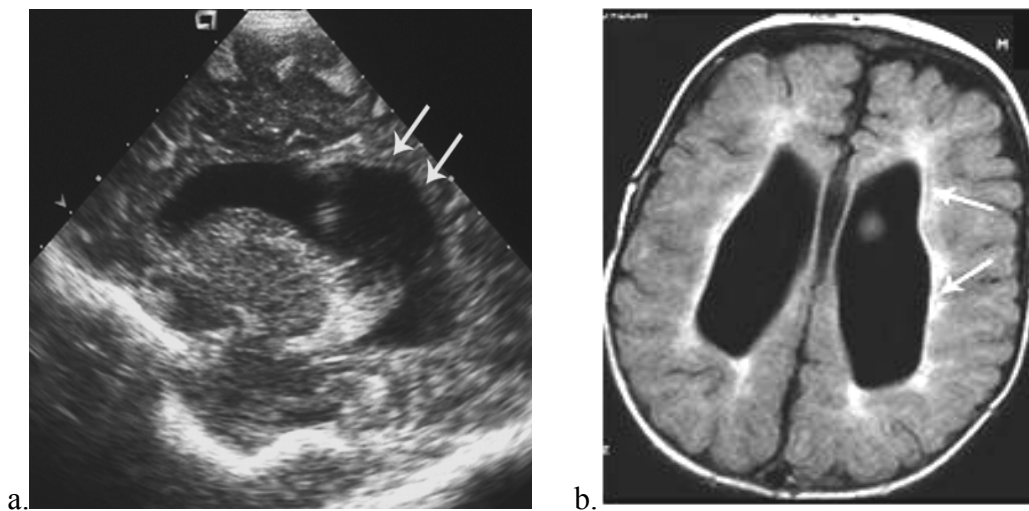
**Slika 9.** Periventrikularna leukomalacija nedonoščeta (30 tjedana gestacije) s kliničkom slikom respiratornog distres sindroma, hipotenzijom i nekrotizirajućim enterokolitisom. (a)

Početni ultrazvuk mozga pokazuje difuznu simetričnu periventrikularnu hiperehogenost (strelice). (b) Linearne hiperehogene promjene (strelice), upućuju na pridruženo krvarenje. (c) Magnetska rezonancija mozga u T2 vremenu, napravljen u 36 tj. postkonceptijski pokazuje hiperintenzivni signal periventrikularne bijele tvari (\*). (d) Magnetska rezonancija mozga u T1 vremenu pokazuje hiperintenzivni signal (strelice) periventrikularne bijele tvari kao odraz krvarenja. Iz reference (50).



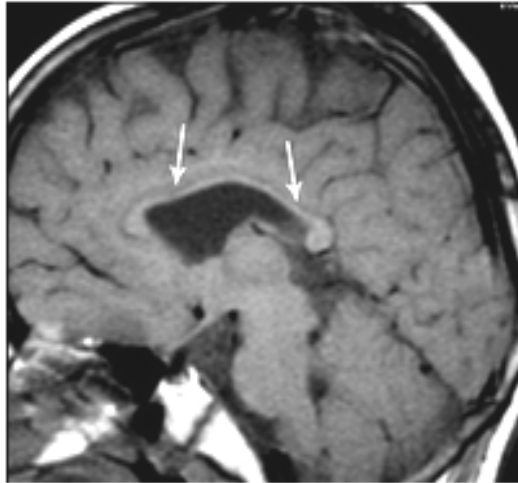
**Slika 10.** Cistična periventrikularna leukomalacija u nedonoščeta (28 tj. gestacije). Koronarni (a) i sagitalni (b) prikaz ultrazvuka mozga s multiplim periventrikularnim cistama (strelice).

Iz reference (50).



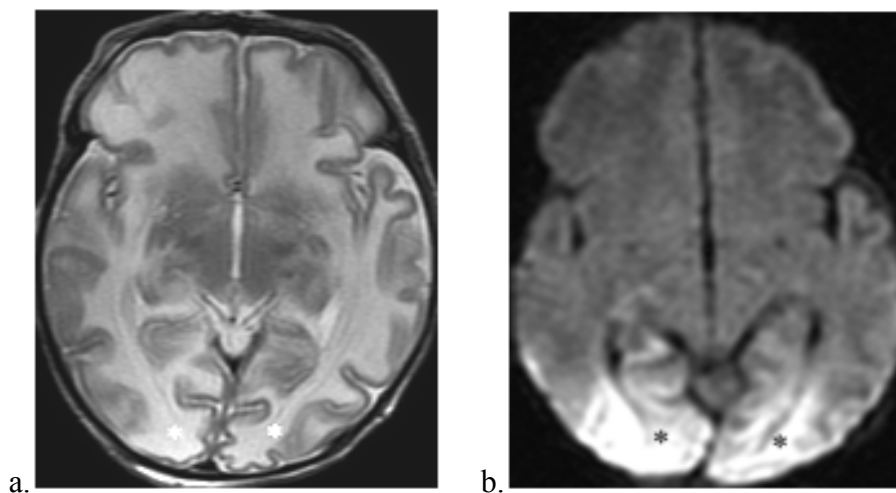
**Slika 11.** Kronična periventrikularna leukomalacija u nedonoščeta (28 tjedana gestacije). (a) ultrazvuk mozga – sagitalni presjek u dobi od 7 mj pokazuje proširene lateralne ventrikule neravnih kontura (strelice). (b) Magnetska rezonancija mozga u FLAIR ( engl. *Fluid attenuation inversion recovery*) tehnici u dobi od 1 godine pokazuje uski pojas hiperintezivnog signala periventrikularno (strelice) kao rezultat glioze. Duboki sulkusi, gotovo idu do ventrikula kao odraz gubitka volumena bijele tvari. Iz reference (50).





**Slika 12.** Kronična periventrikularna leukomalacija u devetogodišnjeg dječaka koji je rođen kao nedonošče. Magnetska rezonancija mozga u T1 vremenu pokazuje stanjeno tijelo korpusa kalozuma (strelice) što upućuje na kroničnu leukomalaciju. Iz reference (50).

U terminske novorođenčadi oštećenja mozga uglavnom su lokalizirana dubokoj sivoj tvari te kortikalnim i subkortikalnim regijama (63, 64).



**Slika 13.** Oštećenje parasagitalnog dijela kore mozga i subkortikalne bijele tvari mozga u donošenog novorođenčeta (38 tj. gestacije) s perinatalnom asfiksijom, niskim Apgar indeksom i hipotenzijom. MR mozga u T2 vremenu (a) i DWI (engl. – *diffusion weighted images*) tehnici (b) pokazuje hiperintenzivni signal u T2 i restrikciju difuzije u DWI tehnici (\*) u području parasagitalnog korteksa i subkortikalne bijele tvari oba okcipitalna režnja. Iz reference (50).

Konvencionalnom magnetskom rezonancijom promjene na mozgu u terminske asfiktčne novorođenčadi uočavaju se sa zakašnjenjem od 2 tjedna. Stoga se u otkrivanju ranih oštećenja mozga preporučuje primjena naprednih MR-tehnika poput difuzijske MR ili MS, koje pružaju podatke o metabolizmu moždanih stanica tijekom anaerobnih uvijeta, kada dolazi do promjena koncentracije laktata, kolina, kreatina, N-acetilaspata i glutamina. Povišeni laktat i smanjena koncentracija N-acetilaspata često se nalazi u dojenčadi s kasnijim neurološkim posljedicama (81).

## **1.5. Genetički čimbenici u razvoju perinatalnog hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga**

50 je godina prošlo od trenutka kada su Watson i Crick objavili model dvolančane uzvojnice DNA do vremena kada je u potpunosti pročitan kompletan DNA zapis naše vrste, odnosno, humani genom. Sekvenciranje humanog genoma završeno je 2003. godine, što je omogućilo odmak od klasičnih genetičkih metoda i razvoj novih znanstvenih disciplina koje su trebale dati odgovore na pitanja na koja nije mogla odgovoriti klasična genetika.

Istraživanja koja govore o povezanosti određenih DNA polimorfizama s većom pojavnošću neke bolesti predstavljaju važan izvor informacija o kandidatnim genima (82). Polimorfizam nekog gena znači postojanje dvaju ili više varijanti gena, a da bi se neki genski lokus smatrao polimorfnim potrebno je da je učestalost pojavljivanja rjeđeg alela veća ili jednaka 1%. Vezna analiza korištenjem DNA polimorfizama predstavlja epidemiološku podlogu istraživanja genetske osnove humanih bolesti, kao što su predispozicije za određene bolesti, učinkovitost medikamentozne terapije te starenje (82). Najveći broj polimorfizama humanog genoma javlja se kao polimorfizam u jednom nukleotidu ( engl. *single nucleotide polymorphisms* - SNP). Do danas je otkriveno 1,8 milijuna SNP-ova koji su pohranjeni u baze podataka dostupne javnosti (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>; <http://snp.cshl.org>) .

Drugi polimorfizmi, insercijsko-delecijski polimorfizmi koji sadrže promjene većih segmenata DNA, su rjeđi. Prisutno je preko 3 milijuna SNP-ova u humanom genomu, međutim svaka promjena neće rezultirati funkcionalnim poremećajem (83).

Napredak znanosti i tehnologije omogućio je da se istraživanju kompleksnih bolesti pristupi na razini analize čitavog genoma. Kompleksne bolesti rezultat su kombinacije



nasljednih mutacija i/ili polimorfizama u više gena kao i izloženosti čimbenicima okoliša, koji zajedno utječu na podložnost obolijevanju, na klinički tijek te krajnji ishod bolesti. Više uključenih gena upućuje na to da svaki gen pojedinačno ima mali, ali značajan učinak, odnosno nužan je, ali ne i dovoljan za nastanak bolesti, pa je stoga riječ o genima koji daju predispoziciju za obolijevanje od određene bolesti (engl. *susceptibility genes*). Klinička heterogenost upućuje na gene modifikatore (engl. *modifier genes*), koji mijenjaju obilježja bolesti. Geni važni za podložnost obolijevanju daju predispoziciju za razvoj određenog fenotipa, dok geni modifikatori mijenjaju fenotip (klinički tijek i ishod bolesti) (84). Sa završetkom projekta humanog genoma u fokus znanstvenog istraživanja došlo je istraživanje genetičke varijabilnosti. Projekt humanog genoma omogućio je da se sustavno identificiraju različiti oblici gena u različitim populacijama, da se utvrdi utjecaj ovih varijacija na funkciju proteina te njihova prisutnost poveže s pojedinim fenotipovima, uključujući i podložnost obolijevanju od pojedinih bolesti (85).

Dakle, brojna istraživanja dokazala su da genetički čimbenici mogu uzrokovati brojne patološke procese, modificirati njihov tijek, uključujući perinatalno hipoksično-ishemično oštećenje mozga i razvoj cerebralne paralize (86-88).

Od nedavno, najviše pažnje pobuđuju SNP-ovi, u kojem je jedan od četiri nukleotida (A, T, C ili G) zamijenjen drugim. SNP-ovi uzrokuju promjenu sekvencije DNA i na taj način mijenjaju funkciju ili izražaj gena. Pretpostavlja se da broj takvih SNP-ova u genomu čovjeka iznosi 50 000 - 250 000. Taj broj predstavlja samo mali postotak od ukupnog broja SNP-ova od kojih većina ne mijenja fenotip. S obzirom na visoku učestalost u genomu, za pretpostaviti je da bi SNP-ovi mogli biti usko povezani s određenim bolestima. Da li će osoba oboljeti, ovisi o udruženom učinku nekoliko SNP-ova gena ključnih za razvoj bolesti i čimbenika okoliša (89).

Dosad je objavljeno nekoliko radova u kojima se pokušala dokazati povezanost polimorfizama gena za sa razvojem hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga i posljedične cerebralne paralize (88, 90). Dördelmann i sur. u svojoj su pilot studiji došli do zaključka da djeca homozigoti za alel -1082G gena za IL - 10 imaju manji rizik za nastanak ultrazvučno dijagnosticirane periventrikularne ehogenosti te neznačajan, ali ipak značajno smanjen rizik za razvoj bolesti vezanih za nedonošenost, kao što su bronhopulmonalna displazija, retinopatija visokog stupnja, usporen neuromotorni razvoj te cerebralna paraliza (90).

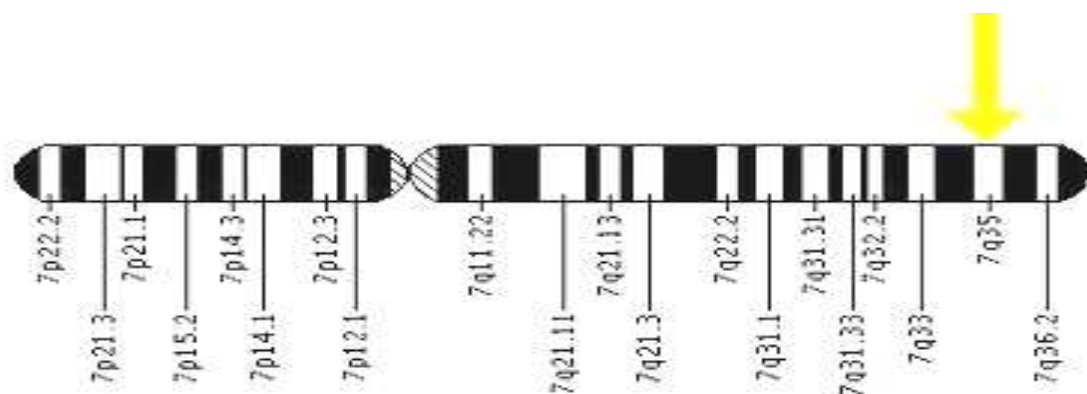
Nelson i sur. u svojim istraživanjima nisu dokazali statistički značajnu povezanost između regulatornih polimorfizama gena za TNF $\alpha$  (-376G/A, -308G/A, -238G/A) i

cerebralne paralize, ali su našli statistički značajnu povezanost između cerebralne paralize i limfotoksin  $\alpha$  thr26asn, kao i da heterozigoti za eNOS -922A/G i Faktor VII arg353gln i del(-323)10bp-ins su značajno povezani s razvojem cerebralne paralize (88). Gibson i sur. u svom su istraživanju pokazali da nosioci polimorfizama gena za TNF $\alpha$  (-308G/A) i IL 8 (-251A/T) imaju povećani rizik za razvoj kliničke slike cerebralne paralize. Dok Yanamandra i sur. nisu našli povezanost između IL-10-1082G/A SNP-a s incidencijom ili težinom IVK ili PVL (91, 92).

Rezultati dosadašnjih istraživanja su kontradiktorni i nejedinstveni u povezivanju polimorfizama gena i razvoja kliničke slike cerebralne paralize.

Također i drugi SNP-ovi mogu imati određenu ulogu u razvoju perinatalnog oštećenja mozga, između ostalog i polimorfizmi gena za eNOS: *NOS3* -922, *NOS3* -690, *NOS3* Glu298Asp, *NOS2A*, bilo da utječu na tonus krvnih žila mozga ili mijenjaju metaboličke procese tijekom infekcije, hipoksije ili koagulacije. Već je prethodno naglašena uloga NO u patofiziologiji hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga. Poznato je njegovo dvojno djelovanje, neurotoksično i neuroprotektivno, ovisno o vrsti enzima i vrsti stanica koje ga proizvode (neuron – nNOS, glijalne - iNOS i endotelijalne stanice - eNOS ) kao i jačini inzulta. Količina produkcije NO u endotelnim stanicama krvnih žila usko je povezana ekspresijom *NOS3* i kontrolirana je genima za *NOS3* (41, 93).

Gen za *NOS3* nalazi na kromosomu 7q35-36 i sadrži 26 egzona dužine 21 kb (Slika 14).



**Slika 14.** Kromosom 7, lokacija gena za *NOS3*. Prema referenci (94).

Polimorfizmi gena mogu dovesti do poremećaja transkripcije, mijenjajući enzimsku funkciju, stoga istraživanje varijabilnosti polimorfizama gena za *NOS3* može rasvijetliti genetsku povezanost s vaskularnim bolestima (95).

Među funkcionalnim polimorfizmima gena za eNOS, kao npr. rs1799983 (Glu298Asp -894G/T) u egzonu 7, promjenjiv broj 27-parova baza (engl. *base pairs* – bp) uzastopno ponavljajućih sljedova nukleotida (VNTR, 27pb) u intronu 4, te polimorfizam rs2070744 (-786T/C) u 5' regiji gena za *NOS3*, nađena je povezanost s cerebrovaskularnim bolestima (96, 97).

Prethodno izneseno otvara pitanje kolika je stvarna važnost polimorfizma gena za *NOS3*, za kojeg je dokazano da modulira produkciju NO. Međutim ti podaci još uvijek su dvosmisleni, nesigurni i funkcionalne posljedice tih polimorfizama nisu do kraja razjašnjene (41, 93).

Težina krajnjeg neuromotornog oštećenja ne ovisi isključivo o težini hipoksično-ishemičnog oštećenja, odnosno nakon djelovanja naizgled jednakog stupnja hipoksije-ishemije razvijaju se različiti stupnjevi hipoksično-ishemičnog oštećenja i neuromotornog odstupanja. Ove različitosti mogu biti rezultat kompliciranih interakcija većeg broja etioloških čimbenika i genetske predispozicije pojedinca na osnovi genotipa polimorfizama gena.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Tijekom hipoksično-ishemičnog inzulata, između ostalog, povećana je sinteza NO u moždanim stanicama, što je fiziološki odgovor na nedostatnu opskrbu stanica kisikom. Uloga NO može biti neuroprotektivna, ali i neurotoksična, ovisno o vrsti stanica koje oslobađaju NO (neuralne, glijalne ili endotelne) te trajanju i intenzitetu ishemičnog inzulata. Aktivacijom nNOS-e u neuronima dolazi do smrti neurona, a aktivacija eNOS-e u endotelnim stanicama ima neuroprotektivnu ulogu (44). Proizvodnja NO od strane različitih oblika NOS-a genetski je uvjetovana.

Do sada je dokazano nekoliko genetskih biljega koji utječu na razinu proizvodnje NO (93, 98, 99). Iz navedenog za pretpostaviti je da polimorfizmi unutar gena za *NOS3* mogu mijenjati djelovanje proteinskih produkata spomenutog gena, dakle enzima eNOS, što se može odraziti na tijek i ishod hipoksije/ishemije. Kao i kod drugih bolesti i kod perinatalnog hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga postoji interindividualna varijabilnost u podložnosti bolesti i ovisi o kompleksnom utjecaju genetskih i okolišnih čimbenika. Velika se pažnja pridaje studijama povezanosti gena i polimorfizmama s nekom bolešću jer mogu služiti kao markeri za tu bolest, u dijagnostici i u liječenju. No, preduvjet za to je da rezultati studija budu dosljedni, da su jasni funkcionalni učinci tih gena na proteinske produkte i da je poznato djelovanje samih proteina u organizmu.

Budući da polimorfizmi gena za *NOS3* mogu mijenjati aktivnost enzima eNOS-e u prijedlogu ovog doktorskog rada postavila sam hipotezu da postoji povezanost tag-SNP-ova kao i funkcionalnih SNP-a rs1800779 i rs2070744 gena za *NOS3* i/ili njihovih haploidnih kombinacija s nastankom i intenzitetom perinatalnog hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga.

U svrhu testiranja prethodno navedene hipoteze postavila sam 5 ciljeva istraživanja:

1. Utvrditi povezanost šest tag SNP-ova gena za *NOS3* (rs3918186, rs3918188, rs1800783, rs1808593, rs3918227, rs1799983) kao i SNP-a rs1800779 i rs2070744 s nastankom i stupnjem perinatalnog hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga.
2. Utvrditi povezanost haplotipova gena za *NOS3* s nastankom perinatalnog hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga.
3. Utvrditi zaštitnu ili rizičnu ulogu istraživanih SNP-ova gena za *NOS3* u nastanku perinatalnog hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga.
4. Utvrditi LD odnose između istraživanih SNP-ova gena za *NOS3* da bi se utvrdila srodnost sa srednjoeuropskom populacijom.
5. Utvrditi genotipsku i alelsku distribuciju ispitanika oboljele i kontrolne skupine prema kliničkim parametrima; gestacijskoj dobi, spolu, Apgar indeksu, porođajnoj masi i nalazu magnetske rezonancije.

## 3. ISPITANICI I METODE

### 3.1. Ispitanici

Svi ispitanici koji su uključeni u istraživanje su praćeni pri Klinici za dječje bolesti, KBC Split, u periodu od 1992-2008. god.

1. Oboljela skupina – 110 bolesnika, djeca s hipoksično-ishemičnim perinatalnim oštećenjem mozga.
2. Kontrolna skupina – 128 djece, bez hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga.

U oboljelu skupinu uključena su djeca koja su imala barem jedan od slijedećih navedenih kriterija: fetalnu srčanu akciju tijekom poroda  $<100$  ili  $>160$  otkucaja u minuti, Apgar indeks  $\leq 7$  u 5 minuti, arterijski pH  $\leq 7,1$ ; ili su u prvih 72 sata života imala odstupanje u neurološkom statusu (prema klasifikaciji po Sarnat i Sarnat) (70) i koja imaju hipoksično-ishemično oštećenje mozga, koje smo utvrdili ponavljanim, u točno određenim vremenskim terminima, ultrazvučnim pretragama mozga. Hipoksično-ishemično perinatalno oštećenje mozga novorođenčadi detektirali smo ultrazvučnom pretragom jer ultrazvuk pokazuje visoku specifičnost (95%), senzitivnost (76%) i pozitivnu prediktivnu vrijednost u utvrđivanju hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga (100).

Ultrazvučnom pretragom smo utvrdili, odnosno pratili više razvojnih stadija PVL-a; prema Weisglas-Kuperus: PVL 1 “flares” (nekavitirajuća manja trokutasta periventrikularna hiperehogenost); PVL 2 “flares” s ventrikulomegalijom; PVL 3 opsežna periventrikularna hiperehogenost koju slijedi policistična transformacija (101).

Hipoksično-ishemično oštećenje mozga u terminu rođene novorođenčadi također je postavljeno ultrazvučnom pretragom mozga. Ultrazvučne pretrage su rađene 3., 7., 14. te 21. dan nakon poroda i jedanput mjesečno do zatvaranje velike fontanele od strane dva neovisna stručnjaka.

Dijagnoza krajnjeg neuroanatomskog ishoda i stupnjevanje hipoksično-ishemičnog oštećenja u ispitivanoj skupini utvrđena je pomoću MR mozga s navršenih dvije godine života, kada su završeni procesi proliferacije, migracije, organizacije i mijelinizacije. Djeca su se snimala MR uređajem: Siemens AG, Erlangen, Germany Magnetom Symphony, 1.5 T. Pratila se promijenjena signala bijele tvari, pojava cističnih promjena, promjene veličine prednjih rogova lateralnih komora, proširenost subarahnoidalnih prostora te stanjenost korpusa kalozuma (102, 103).

Bodovanje oštećenja je prilagođeno prema već prije objavljenim istraživanjima (104, 105). Svaki parametar koji se promatra bodovan je od 1-3 boda, tako da ispitanici do 5 bodova imaju *uredan nalaz ili stupanj 1, stupanj 2 ili srednje teško oštećenje* od 6-10 bodova, a *stupanj 3 ili vrlo teško oštećenje* od 11 do 15 bodova.

Stupnjevanje oštećenja s obzirom na navedene parametre prikazano je u Tablici 2.

**Tablica 2.** Stupnjevanje perinatalnog hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga prema nalazu magnetske rezonancije

	Stupanj 1 - uredan nalaz	Stupanj 2 – srednje teško oštećenje	Stupanj 3 – vrlo teško oštećenje
Promjena signala bijele tvari mozga	Uredan signal	Žarišno promijenjen signal (jedna regija)	Promijenjen signal na 2 i više regija
Veličina frontalnih rogova lat. komora	Uredna do 8 mm	Blaga do srednja dilatacija, 8-10 mm	Značajna dilatacija >10 mm
Cistične promjene	Nema	Fokalne cistične promjene	Opsežne cistične promjene bijele tvari
Debljina korpus kalozuma	Uredna	Stanjena < 3mm fokalno	Stanjena < 3 mm multifokalno
Subarahnoidalni prostor	Uredan do 4 mm	Blago proširen, 4-8 mm	Srednje do jako proširen ≥8 mm

Iz medicinske dokumentacije za obje istraživane skupine prikupljeni su podaci o demografskim karakteristikama kao što je spol, gestacijska dob (gestacijska dob 37 i više; 32 do 36 tjedana; gestacijska dob manja od 32 tjedna) i porođajna masa. Iz ispitivanja su

isključeni bolesnici s kongenitalnim malformacijama središnjeg živčanog sustava, metaboličkim bolestima, kromosomskim abnormalnostima, infekcijama središnjeg živčanog sustava te bolesnici s traumama. Također, isključena je novorođenčad iz multiplih gestacija, novorođenčad majki koje su imale preeklampsiju te abrupciju placente.

Tijekom bolničkog liječenja ispitanicima se vadila venska krv radi standardne dijagnostičke obrade. Iz venske krvi, uzete za procjenu hematoloških i biokemijskih parametara potrebnih za nadzor i liječenje njihove bolesti, izdvojena je epruveta presvučena EDTA-om, s 2 ml krvi potrebne za ispitivanje i pohranjena je na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Kontrolnu skupinu predstavljala su djeca u dobi od 2. do 16. godine s urednim ultrazvučnim nalazom mozga i/ili urednim neurološkim statusom u trenutku uzimanja uzorka krvi.

Zbog procjene njihovog zdravstvenog stanja svim ispitanicima uzorak krvi uzeta je na isti način kao i kod oboljele skupine.

## **3.2. Metode**

### ***3.2.1. Genotipizacija uzoraka***

Svi postupci izveli su se u Laboratoriju za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Genotipiziranje je metoda molekularne biologije kojom se utvrđuje genotip pojedinca tj. kojom se nastoje utvrditi nukleotidi, odnosno aleli, koji se nalaze na mjestu istraživanog SNP-a u oba gena za *NOS3* na paru homolognih kromosoma ispitanika.

### ***3.2.2. Izolacija genomske DNA***

Genomska DNA je izolirana iz leukocita periferne krvi pomoću QIAamp DNA Blood Mini Kit-ova (Qiagen, Hilden, Njemačka). Svoj djeci vađena je periferna krv. Uzorci krvi (5-7mL) bili su izvađeni u Vacutainer® epruvete (Becton Dickinson, Meylan Cedex, Francuska) s EDTA antikoagulansom i do izolacije DNA čuvani su na  $-20^{\circ}\text{C}$ .



Metoda izolacije se sastojala od nekoliko faza: razbijanja stanica i jezgra, uništavanja svih staničnih proteina, ribonukleinske kiseline i ostalih makromolekula, oslobađanja i čišćenja DNA od preostalih proteina i skladištenja DNA. Protokol za izolaciju DNA molekule je napisan u nastavku:

1. 20 µl PROTEAZE K se ispipetira u dno 1.5 ml tubice u koju se dolije 200 µl krvi i 200 µl PUFERA AL. Smjesa se inkubira na 56°C/10 minuta.
2. Kratko se centrifugira (~5 s) da bi se odstranile kapljice s unutrašnje stijenke tubice. U smjesu se doda 200 µl ETANOLA, izmiješa i ponovo kratko centrifugira.
3. Pipetom se prebaci čitava smjesa (~650 µl) u filter-tubicu (engl. *spin column*) i centrifugira na 8000 rpm (okretaja u minuti) kroz 1 minutu.
4. Filter-tubica se prebaci u tubicu za sakupljanje (engl. *collection tube*). U filter-tubicu se doda 500µl PUFERA AW1. Centrifugira se na 8000 rpm/1 minutu.
5. Filter-tubica se ponovo prebaci u novu tubicu za sakupljanje, a prethodna s filtratom se baci. Doda se 500 µl PUFERA AW2 i centrifugira na 13 200 rpm/3 minute.
6. Filter-tubica se prebaci u prethodno obilježenu čistu 2 ml tubicu, tubica za sakupljanje s filtratom se baci. Doda se 200 µl PUFERA AE, inkubira se na sobnoj temperaturi kroz 1 minutu i centrifugira na 8000 rpm/1 minutu.
7. U 2 ml tubici se nakon centrifugiranja isfiltrira genomska DNA koja je otopljena u AE puferu. Ovaj pufer služi i za čuvanje DNA.

Koncentracija izolirane DNA se odredila mjerenjem na Nanodrop spektrofotometru (Thermo Scientific, Langensel Bold, Germany). Prosječna koncentracija je bila oko 30 µg/ml. Za metodu genotipiziranja uzorak je bio razrjeđen do koncentracije od 10 ng/µl.

### **3.2.3. Genotipizacija osam polimorfizama pomoću TaqMan real-time PCR metode**

Polimorfizmi su analizirani metodom polimeraza lančane reakcije u stvarnom vremenu (engl. *Real Time Polymerase Chain Reaction* - RT PCR) pomoću ABI 7900 (real-time) (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Real-time PCR je kvantitativna metoda kojom se u svakom trenutku reakcije može vidjeti povećanje u količini DNA produkta. Najpreciznija tehnologija real-time PCR je TaqMan real-time PCR.

Za određivanje alela ova metoda koristi alel-specifične fluorescentne oligonukleotidne probe. Probe na svojim krajevima sadrže dvije fluorescentne boje, reportere. U ovoj metodi se koriste dvije vrste fluorescentnih proba koje se razlikuju u jednoj bazi i boji kojom fluorescira reporter. Boje koje se najčešće koriste su VIC (zelena) i FAM (plava). Na drugom kraju probe se nalazi suzbijajuća boja, „quencher“ koja ometa signal s boje reportera kada su kratko udaljene jedne od druge. TaqMan probe, koje sadrže molekulu koja se veže za 3' kraj novorastućeg lanca (engl. *minor groove binder* - MGB), pružaju vrhunske rezultate u određivanju alela. MGB molekula veže za manji utor DNA uzvojnice čime stabilizira kompleks MGB-probe i lanca kalupa. Daljnju stabilizaciju osigurava duljina probe do 13 baza, što dodatno osiguravaju nemogućnost sparivanja neusklađenih baza (engl. *mismatch*). Dok je proba prihvaćena za kalup DNA prije nego polimeraza započne svoju aktivnost, „quencher“ onemogućava fluorescenciju s reportera. Kada se proba veže za specifično mjesto na DNA kalupu nakon denaturacije, reakcija se hladi i početnice se vezuju za DNA. Započinje djelovanje Taq Gold DNA polimeraze koja dodaje nukleotide. Detekcija se postiže pomoću egzonukleaznog cijepanja 5' alel-specifičnih boja probe. Tada se razdvajaju „quencher“ od reportera što dozvoljava reporteru da emitira svoju energiju odnosno da fluorescira. Suzbijajuća boja „quencher“ gotovo da eliminira pozadinsku fluorescenciju povezanu s klasičnim „quencherom“ i pruža jači signal i vrhunsku osjetljivost eseja. Uz pomoć računala to se može kvantificirati i odrediti genotip osobe. Fluorescentni signal daje proba koja se vezala, čitač fluorescencije bilježi količinu fluorescencije i automatski određuje genotip: homozigoti za jedan alel pokazuju samo zelenu fluorescenciju, homozigoti za drugi alel samo plavu fluorescenciju dok heterozigoti pokazuju obje fluorescencije.

### 3.3. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka je podijeljena u dva dijela od kojih se svaki sastoji od nekoliko analiza.

#### 3.3.1. Analiza kvalitete

U prvom dijelu analizirala se kvaliteta dobivenih podataka o genotipovima (engl. *quality control analysis*). Analizom kvalitete genotipova zaključuje se o uspješnosti genotipiziranja i o eventualnim pogreškama koje su mogle nastati u procesu genotipizacije. Provjere kvalitete su nužne jer omogućavaju otkrivanje pogrešaka kod genotipova koje mogu imati utjecaj na rezultat tj. koje mogu dovesti do lažno pozitivnog ili lažno negativnog rezultata. Postoji više metoda kojima se analizira kvaliteta genotipova. U ovoj doktorskoj disertaciji je napravljena provjera uspješnosti genotipiziranja (engl. *missing genotype rate*), provjera Hardy-Weinberg-ove ravnoteže (HW), računanje učestalosti rjeđeg alela (engl. *minor allele frequency*, MAF) i usporedba s MAF učestalostima za europsku populaciju te je izračunata neravnoteža vezanosti (engl. *linkage disequilibrium* – LD) između SNP-ova.

#### Uspješnost genotipiziranja

Uspješnost genotipiziranja se najčešće prikazuje kao postotak neuspješnosti genotipiziranja koji je izračunat koristeći program Haploview 4,1. Prilikom genotipiziranja mogu nastati pogreške bilo nepažnjom i slučajnom pogreškom samog istraživača, ali posebno su značajne pogreške koje ne nastaju slučajno i koje se teško otkrivaju. Do takvih pogrešaka može doći prilikom genotipiziranja samo jednog određenog genotipa (npr. AA) koji se onda slabije genotipizira od ostala dva (npr. AG i GG). U tom slučaju genotip AA je manje zastupljen u istraživanoj skupini i dovodi do pozitivnog, ali lažnog rezultata povezanosti. Analiza uspješnosti genotipiziranja jako je bitna i smatra se da neuspješnost genotipiziranja

veća od 5% može utjecati na rezultat pa bi se svi SNP-ovi s tim postotkom neuspješnosti trebali isključiti iz analize povezanosti.

### **Provjera Hardy-Weinberg ravnoteže**

HW pravilo kaže da je učestalost genotipova strogo definirana učestalošću alela u nekoj populaciji i da se ravnotežni udjeli pojedinih alela u populaciji ne mijenjaju iz generacije u generaciju. Postoji nekoliko uvjeta bitnih za održavanje HW ravnoteže, populacija treba biti dovoljno velika da u njoj ne postoji preferiranje pri izboru partnera za stvaranje potomstva, da se ne događaju mutacije, odnosno promjene u strukturi DNA, da nema migracija, da nema slučajnih promjena u genetičkoj strukturi uzrokovanih vanjskim utjecajem i da nema prirodne selekcije. HW pravilo povezuje učestalost pojedinog alela s učestalošću pripadajućeg genotipa u populaciji diploidnih jedinki i može se izračunati za svaki alel (106). Koristeći program Haploview 4,1 provjereno je da li genotipovi osam istraživanih SNP-ova kod oboljele i ispitivane skupine podliježu HW pravilu (107). Odstupanje od HW ravnoteže kod zdravih jedinki može značiti da je došlo do nepravilnosti prilikom genotipiziranja ili ukazati na populacijsku stratifikaciju u uzorku. Odstupanje od HW ravnoteže kod oboljelih može ukazivati na povezanost istraživanog SNP-a s bolesti.

### **Učestalosti rjeđeg alela istraživanih SNP-ova, MAF**

Kao što je naglašeno definicija HW ravnoteže kaže da su udjeli pojedinih alela u populaciji stalni i da se ne mijenjaju iz generacije u generaciju. Stoga učestalost istih alela može se međusobno uspoređivati unutar iste ili između bliskih populacija i trebali bi imati vrlo slične vrijednosti. Kao jedna od mogućih analiza kvalitete je provjera učestalosti alela između kontrolne skupine tj. skupine zdravih ispitanika i opće populacije. S obzirom da za hrvatsku populaciju ne postoje službeni podaci za učestalosti alela osam polimorfizama gena za *NOS3*, one su uspoređene s učestalostima alela za srednjeeuropsku populaciju koje su dostupne preko HapMap baze podataka ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)) (108). Najčešće se računaju i uspoređuju učestalosti rjeđeg alela. Veliko odstupanje MAF kod zdravih ispitanika od MAF za srednjeeuropsku populaciju može ukazivati na pogreške kod genotipiziranja ili populacijsku stratifikaciju.

### Izrada LD mape

Polimorfizmi koji se nalaze u blizini jedan drugoga nasljeđuju se zajedno češće nego bi se to očekivalo slučajnim nasljeđivanjem. To znači da su oni međusobno „vezani“ tj. da se nalaze u LD-u. Korištenjem programa Haploview 4,1 izračunate su međusobne LD vrijednosti za sve istraživane polimorfizme unutar gena za *NOS3* i dobivene vrijednosti su uspoređene s LD vrijednostima iz HapMap baze podataka ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)) za srednjoeuropsku populaciju (108). Postoje dvije standardne jedinice za prikaz LD odnosa,  $r^2$  i  $D'$  (Lewontin koeficijent), a njihove vrijednosti se kreću od 0 do 1. Što je vrijednost veća to je jači LD tj. povezanost između alela. Za sve polimorfizme čija je međusobna LD vrijednost veća od 0.8 se smatra da su u potpunom LD-u i da se gotovo uvijek nasljeđuju zajedno.  $r^2$  mjeri LD vrijednosti između dva polimorfizma ovisno o učestalostima oba alela i općenito se smatra da  $r^2$  vrijednosti pokazuju veću podudarnost pri uspoređivanju različitih populacija (109).

### 3.3.2. Analiza povezanosti

Drugi dio statističke obrade je analizom povezanosti (engl. *association analysis*), primjenom Haploview 4,1 programa analizirao povezanost alelske distribucije pojedinačnih polimorfizama s pojavom perinatalnog oštećenja mozga, također je učinjena analiza povezanosti genotipova ispitivanih osam istraživanih polimorfizama s hipoksično-ishemičnim oštećenjem mozga. Osim povezanosti pojedinačnih SNP-ova analizirali smo i povezanost haplotipova, odnosno, kombinacije alela na jednom kromosomu s hipoksično-ishemičnim oštećenjem. Primjenom  $\chi^2$ -hi kvadrat testa ( $\chi^2$ ) i logističke regresije (program Statistika 7,0) analizirali smo genotipsku i alelsku distribuciju za svaki ispitivani polimorfizam prema gestacijskoj dobi, spolu, Apgar indeksu, porođajnoj masi te nalazu magnetske rezonancije. Utvrdili smo zaštitnu ili rizičnu ulogu istraživanih SNP-ova gena za *NOS3* u nastanku perinatalnog hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga.

Logističkom regresijom izračunat je omjer izgleda (engl. *odds ratio*, OR) za pojavnost hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga u odnosu na genotipove istraživanih polimorfizama. Izračunali smo OR za pojavnost hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga s obzirom na gestacijsku dob, spol, Apgar indeks i porođajnu masu. Također je  $\chi^2$ -testom uspoređivan

stupanj oštećenja mozga prema MR s obzirom na spol, gestacijsku dob, porođajnu masu i Apgar indeks.

Za svaki istraživani SNP izračunata je snaga studije koristeći program Quanto (110). Rezultate smo interpretirali na razini značajnosti  $p < 0.05$ .

### 3. REZULTATI

U istraživanje je uključeno ukupno 238 djece, od toga 110 djece s hipoksično-ishemičnim perinatalnim oštećenjem mozga (oboljela skupina), i 128 zdrave djece, bez hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga (kontrolna skupina).

Kliničke karakteristike istraživane djece prikazane su u Tablici 3.

**Tablica 3.** Prikaz ispitanika prema broju, spolu, gestacijskoj dobi i porođajnoj masi u oboljeloj i kontrolnoj skupini

Kliničke karakteristike	Oboljela skupina	Kontrolna skupina
Broj ispitanika	110	128
Muško/Žensko (No)	70/40	60/68
GD* (tjedni)	32,3±4,4	34,4±4,9
PM** (grami)	1700 (580-3990)	2799 (750-4450)

\*Gestacijska dob (GD) prikazana je kao srednja vrijednost ±SD, \*porođajna masa (PM) prikazana je kao mediana (minimalna-maksimalna vrijednost)

Ova studija ima 80% statističke snage da bi mogla utvrditi učinak za polimorfizme rs3918186, [OR]=1,69, za rs3918188, [OR]=1,70 za rs1800783, [OR]=1,80 za rs1808593, [OR]=2,1 za rs3918227, [OR]=1,68 za rs1800779, [OR]=1,76 za rs1799983, [OR]=2,07 i za rs2070744, [OR]=1,76 podrazumijevajući aditivni model i standardnu pogrešku od  $\alpha=0.05$ .

## 4.1. Rezultati analize kvalitete dobivenih podataka (engl. quality control analysis)

Uspješnost genotipiziranja svih ispitivanih polimorfizama (engl. *missing genotype rate*) rs1800783, rs1800779, rs2070744, rs1799983, rs3918227, rs3918186, rs3918188, rs1808593 za svaki uzorak bila je 100%, te su svi uključeni u daljnje istraživanje.

Genotipovi sedam od osam ispitivanih SNP-ova bili su u HW ravnoteži. Međutim genotipovi kontrolne skupine *rs1808593* SNP-a su neznatno odstupali od HW ravnoteže, te smo zbog toga povećali skupinu za 55 ispitanika (128+55). Odstupanje od HW ravnoteže i dalje se zadržalo, ali s graničnom statističkom značajnosti ( $p=0.0342$ ).

## 4.2. Rezultati analize povezanosti (engl. association analysis)

### 4.2.1. Rezultati analize povezanosti distribucije alela

Analizirana je razlika u učestalosti rjeđeg alela između skupine oboljelih i kontrolne skupine za osam istraživanih SNP-ova. Nije utvrđena razlika u učestalosti između te dvije skupine za niti jedan od ispitivanih SNP-ova, rezultati su prikazani u Tablici 4.

**Tablica 4:** Usporedba učestalost rjeđeg alela između oboljele i kontrolne skupine za istraživane polimorfizme

Polimorfizam	Rjeđi Alel	MAF* oboljele skupine	MAF* kontrolne skupine	$\chi^2$	p vrijednost
rs1800783	A	0.368	0.406	0,722	0,3956
rs1800779	G	0.405	0.398	0,018	0,8922
rs2070744	C	0,368	0,395	0,348	0,5553
rs1799983	T	0.290	0.300	0,055	0,8141
rs3918227	A	0.081	0.082	0,0	0,9933
rs3918186	T	0.113	0.117	0,015	0,9038
rs3918188	A	0.377	0.340	0,722	0,3955
rs1808593	G	0.227	0.281	1,809	0,1787

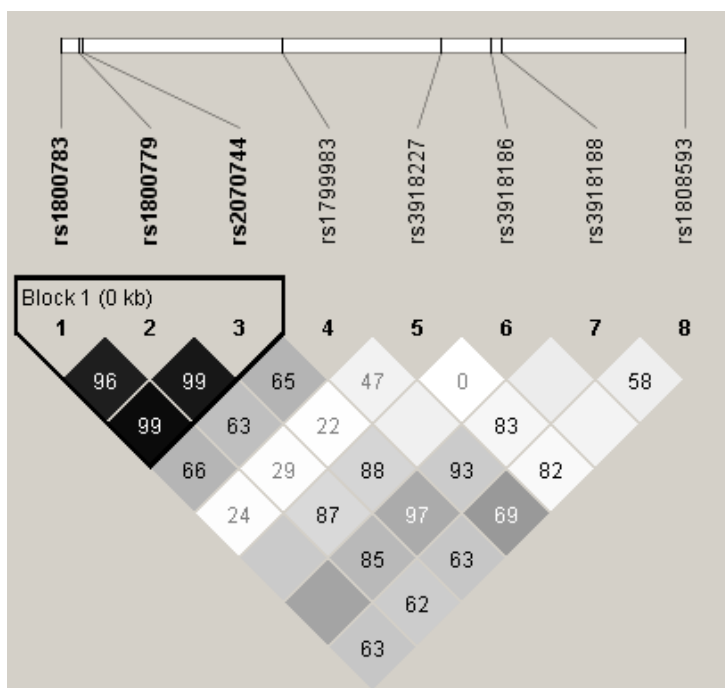
\*MAF učestalost rjeđeg alela (engl. *minor allele frequency*);  $\chi^2$ - hi kvadrat test; p vrijednost



#### 4.2.2. Mapa neravnoteže vezanosti (LD mapa)

Uz pomoć programa Haploview 4,1 na osnovu HapMap genotipskih podataka izračunate su LD vrijednosti za osam polimorfizama gena za *NOS3* koji se mogu pronaći u HapMap bazi podataka za srednjoeuropsku populaciju (rs1800783, rs1800779, rs2070744, rs1799983, rs3918227, rs3918186, rs3918188, rs1808593).

Na Slici 15. su prikazane  $r^2$  vrijednosti. Kvadrati bijele boje znače da su  $r^2$  vrijednosti vrlo malene, a prelazak u sve tamnije kvadratiće označava rast  $r^2$  vrijednosti, odnosno povećanje LD-a među polimorfizmima. Crni kvadratić označava potpuni LD tj.  $r^2$  vrijednosti od 1. LD mapa ukazuje na izrazitu međusobnu „vezanost“ tri polimorfizma rs1800783, rs1800779 i rs2070744 koji se nasljeđuju zajedno češće nego bi se to očekivalo slučajnim nasljeđivanjem, te za njih kažemo da su snažnom LD-u.



**Slika 15:** Mapa neravnoteže vezanosti (LD mapa) - pokazuje neravnotežu vezanosti izraženu  $r^2$  vrijednostima za osam polimorfizama gena za *NOS3* u oboljeloj skupini djece s hipoksično-ishemičnim oštećenjem mozga (izračunato korištenjem programa Haploview 4,1)

### 4.2.3. Rezultati analize povezanosti haplotipova

U poligenkim oboljenjima (oboljenjima na koja utječe više gena), informacija o haplotipu daje više uvida nego ona o genotipu. Iscrpna haplotipska analiza pokazala je povezanost haplotipa TGT polimorfizama rs1800783, rs1800779, rs2070744 gena za *NOS3* s hipoksično-ishemičnim oštećenjem mozga ( $p=0,001$ ). Ostale haplotipske kombinacije nisu pokazale razliku između oboljele i kontrolne skupine. Rezultati haplotipske analize za polimorfizme rs1800783, rs1800779, rs2070744 prikazani su u Tablici 5.

**Tablica 5:** Analiza povezanosti haplotipova za polimorfizme rs1800783, rs1800779, rs2070744 gena za *NOS3* sa hipoksično-ishemičnim oštećenjem mozga

Haplotipovi	Frekvencija u oboljeloj skupini	Frekvencija u kontrolnoj skupini	$\chi^2$	p vrijednost
TAT	0,586	0,593	0,024	0,8771
AGC	0,359	0,394	0,632	0,4266
TGT	0,041	0,000	10,332	0,001

Nadalje, analizom djece, kod kojih je dokazan haplotip TGT polimorfizama rs1800783, rs1800779, rs2070744 gena za *NOS3*, utvrđeno je da su djeca s navedenim haplotipom prijevremeno rođena djeca, i to gestacijske dobi ispod 32. tj. i da imaju najteži stupanj oštećenja mozga (Stupanj 3) s obzirom na nalaz MR.

#### 4.2.4. Rezultati analize povezanosti distribucije genotipova

Distribucija genotipova osam ispitivanih polimorfizama prikazana je u Tablici 6.

**Tablica 6:** Distribucija genotipova osam ispitivanih polimorfizma gena za *NOS3* između oboljele skupine sa hipoksično-ishemičnim oštećenjem i kontrolne skupine.

SNP*	Genotip	Oboljela skupina No (%)	Kontrolna skupina No (%)	$\chi^2$	p vrijednost
rs1800783	TT	43 (39,1)	43 (33,6)	0,821	0,6633
	TA	53 (48,2)	66 (51,6)		
	AA	14 (12,7)	19 (14,8)		
rs1800779	GG	17 (15,5)	18 (14,0)	0,063	0,968
	GA	55 (50,0)	66 (51,6)		
	AA	38 (34,5)	44 (34,4)		
rs2070744	TT	42 (38,2)	45 (35,2)	0,357	0,8365
	TC	55 (50,0)	65 (50,8)		
	CC	13 (12,8)	18 (14,0)		
rs1799983	GG	52 (47,3)	60 (46,9)	0,28	0,869
	GT	52 (47,3)	59 (46,1)		
	TT	6 (5,4)	9 (7,0)		
rs3918227	CC	93 (84,5)	108 (84,4)	0,0159	0,9924
	CA	16 (14,5)	19 (14,8)		
	AA	1 (1,0)	1 (0,8)		
rs3918186	AA	87 (79,1)	101(78,9)	0,081	0,96
	AT	21 (19,1)	24(18,8)		
	TT	2 (1,8)	3 (2,3)		
rs3918188	CC	42 (38,2)	53 (41,4)	1,14	0,5729
	CA	53 (48,2)	63 (49,2)		
	AA	15 (13,6)	12 (9,4)		
rs1808593	TT	67 (60,9)	86 (47,0)	6,640	<b>0,03</b>
	TG	36 (32,7)	88 (48,0)		
	GG	7 (6,4)	9 (5,0)		

\* SNP – polimorfizam (engl. – *single nucleotide polymorphisms*),  $\chi^2$ - hi kvadrat test, p-vrijednost

Pokazana je statistički značajna razlika u distribuciji genotipova rs1808593 između oboljele i kontrolne skupine (p=0,03) kojoj doprinosi veća učestalost TT genotipa, a manja TG genotipa u oboljeloj skupini.

#### 4.2.5. Rezultati analize distribucije genotipova prema kliničkim parametrima i nalazu magnetske rezonancije

Hi-kvadrat testom smo analizirali genotipsku distribuciju ispitivanih polimorfizama za oboljelu i kontrolnu skupinu zajedno prema kliničkim parametrima: gestacijskoj dobi, spolu, Apgar indeksu, porođajnoj masi i nalazima magnetske rezonancije. U tablicama 7, 8 i 9. su prikazani oni rezultati koji su pokazali statističku značajnu povezanost s ispitivanim parametrima.

**Tablica 7:** Distribucija genotipova polimorfizma rs1808593 prema kliničkim parametrima i nalazu magnetske rezonancije

Genotipovi		TT No (%)	TG No (%)	GG No (%)	p vrijednost
<b>GD*</b>	<32	54 (42,8)	39 (38,2)	4 (40)	0,860
	33-36	35 (27,8)	33 (32,4)	4 (40)	
	>37	37 (29,4)	30 (29,4)	2 (20)	
<b>Spol</b>	M	66 (52,4)	57 (55,9)	7 (70)	0,529
	Ž	60 (47,6)	45 (44,1)	3 (30)	
<b>AS**</b>	≤5	50 (39,7)	30 (29,4)	3 (30)	0,191
	6-7	36 (28,6)	33 (32,3)	2 (20)	
	8-9	14 (11,1)	17 (16,7)	4 (40)	
	10	26 (20,6)	22 (21,6)	1 (10)	
<b>PM***</b>	≤1000	12 (9,5)	13 (12,7)	1 (10)	0,563
	1001-1499	33 (26,2)	23 (22,5)	1 (10)	
	1500-2499	39 (31,0)	31 (30,5)	6 (60)	
	≥2500	42 (33,3)	35 (34,3)	2 (20)	
<b>MR****</b>	1	59 (46,8)	66 (64,7)	3 (30)	<b>0,015</b>
	2	26 (20,6)	11 (10,8)	1 (10)	
	3	41 (32,6)	25 (24,5)	6 (60)	

\* GD - Gestacijska dob u tjednima, \*\*AS - Apgar indeks, \*\*\*PM - porođajna masa u gramima, \*\*\*\*MR - magnetska rezonancija, p-vrijednost

Distribucijom genotipova za polimorfizam rs1808593 pokazano je da je zastupljenost TT genotipa više od dva puta veća u skupini djece sa srednje teškim oštećenjem mozga (Stupanj 2), te gotovo dva puta veća u skupini djece s vrlo teškim stupnjem oštećenja mozga (Stupanj 3), ( $p=0,015$ ). Kod djece s urednim nalazom MR mozga (Stupanj 1), prevladava TG genotip (Tablica 7). Nalaz magnetske rezonancije stupnjevan je prema težini i opsežnosti oštećenja (Tablica 2).

Uspoređujući distribuciju genotipova istog polimorfizma rs1808593 između urednog nalaza MR (Stupanj 1) i patološkog nalaza MR bez obzira na težinu oštećenja (Stupanj 2 i

Stupanj 3), također je nađena statistički značajna povezanost ( $p=0,0104$ ), kojoj doprinosi veća učestalost TT genotipa u skupini s patološkim nalazom MR.

**Tablica 8:** Distribucija genotipova za polimorfizam rs3918186 prema kliničkim parametrima i nalazu magnetske rezonancije

Genotipovi		AA No (%)	AT No (%)	TT No (%)	p
<b>GD*</b>	<32	76 (40,4)	21 (46,7)	0	0,099
	33-36	57 (30,3)	14 (31,1)	1 (20,0)	
	>37	55 (29,3)	10 (22,2)	4 (80,0)	
<b>Spol</b>	M	101(53,7)	25 (55,6)	4 (80,0)	0,503
	Ž	87 (46,3)	20 (44,4)	1 (20,0)	
<b>AS**</b>	≤5	65 (34,6)	18 (40,0)	0	<b>0,025</b>
	6-7	56 (29,7)	15 (33,3)	0	
	8-9	27 (14,4)	7 (15,6)	1 (20,0)	
	10	40 (21,3)	5 (11,1)	4 (80,0)	
<b>PM***</b>	≤1000	20 (10,6)	6 (13,4)	0	0,930
	1001-1499	46 (24,5)	11 (24,4)	0	
	1500-2499	60 (31,9)	15 (33,3)	1 (20,0)	
	≥2500	62 (33,0)	13 (28,9)	4 (80,0)	
<b>MR****</b>	1	101(53,7)	24 (53,4)	3 (60,0)	0,449
	2	28 (14,9)	8 (17,8)	2 (40,0)	
	3	59 (31,4)	13 (28,8)	0	

\* GD - Gestacijska dob u tjednima, \*\*AS – Apgar indeks, \*\*\*PM – porođajna masa u gramima, \*\*\*\* MR – magnetska rezonancija, p-vrijednost

Analizom genotipova za polimorfizma rs 3918186  $\chi^2$  – testom dobili smo dvostruko veću učestalost genotipa AA u odnosu na AT u skupini djece s urednim Apgar indeksom (AS10),  $p=0,025$  (Tablica 8).

#### 4.2.6. Rezultati analize distribucije alela prema kliničkim parametrima i nalazu magnetske rezonancije

Usporedbom distribucije alela svih osam ispitivanih polimorfizama  $\chi^2$  – testom kod oboljele i kontrolne skupine zajedno prema kliničkim parametrima: gestacijskoj dobi, spolu, Apgar indeksu, porođajnoj masi i nalazu magnetske rezonancije, dobivena je statistički značajna povezanost polimorfizma rs1808593 s Apgar indeksom.

**Tablica 9:** Distribucija alela polimorfizma rs1808593 prema kliničkim parametrima i nalazu magnetske rezonancije

	No*	No Alela	T alel	G alel	$\chi^2$	p vrijednost
<b>GD**</b>	< 32	97	194	147	0,731	0,705
	33-36	72	144	105		
	< 37	69	138	104		
<b>Spol</b>	M	130	260	189	0,85	0,358
	Ž	108	216	165		
<b>AS***</b>	≤ 5	83	166	130	10,4	<b>0,015</b>
	6-7	71	142	105		
	8-9	35	70	45		
	10	49	98	74		
<b>PM****</b>	≤ 1000	26	52	37	1,71	0,628
	1001-1499	57	114	89		
	1500-2500	76	152	109		
	≥ 2500	79	158	119		
<b>MR*****</b>	1	128	256	184	3,7	0,157
	2	38	76	63		
	3	72	144	107		

\*No broj ispitanika, \*\* GD - Gestacijska dob u tjednima, \*\*\*AS – Apgar indeks, \*\*\*\*PM – porođajna masa u gramima, \*\*\*\*\*MR – magnetska rezonancija,  $\chi^2$ - hi kvadrat test, p-vrijednost

$\chi^2$  – testom distribucije alela pojedinih polimorfizama ustanovljeno je statistički značajno učestalija pojavnost T alela u polimorfizmu rs1808593 kod ispitanika s nižim AS, T alel je učestaliji u svim skupinama, što je i za očekivati, a razlika između T i G alela je značajnija što je AS niži (p=0,015) (Tablica 9).

#### ***4.2.7. Rezultati analize povezanosti distribucije genotipova i alela prema kliničkim parametrima zasebno za svaku ispitivanu skupinu***

Napravljena je distribucija genotipova i alela prema kliničkim parametrima, gestacijskoj dobi, spolu, Apgar indeksu, porođajnoj masi posebno za svaku ispitivanu skupinu, oboljelu i kontrolnu, kako bi utvrdili da li postoji razlika unutar skupina ponaosob s obzirom na praćene kliničke parametre, te genotipsku i alelsku distribuciju.

Analiza distribucije genotipova kao i analiza distribucije alela osam polimorfizama unutar oboljele skupine prema kliničkim parametrima nije pokazala značajnu statističku povezanost ispitivanih varijabli, što upućuje da unutar oboljele skupine ne postoji razlika u razdiobi genotipova i alela ispitivanih polimorfizama prema kliničkim parametrima.

Također, analiza distribucije genotipova kao i analiza distribucije alela osam polimorfizama unutar kontrolne skupine prema kliničkim parametrima nije pokazala značajnu statističku povezanost ispitivanih varijabli, što upućuje da ispitivanjem kontrolne skupine nismo dobili razliku u razdiobi genotipova i alela ispitivanih polimorfizama prema kliničkim parametrima.

#### 4.2.8. Rezultati analize povezanosti genotipova i kliničkih parametara s izgledom za nastanak hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga

Napravljena je logistička regresijska analiza za svaku varijablu (genotipovi ispitivanih polimorfizama, gestacijska dob, spol, Apgar indeks, porođajna masa) u cilju povezanosti ispitivane varijable s izgledom za nastanak hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga. Rezultate smo interpretirali na razini značajnosti  $p < 0,05$ .

**Tablica 10:** Omjer izgleda (engl. *odd ratio* - OR) za pojavnost perinatalnog hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga prema genotipovima ispitivanih polimorfizama

Polimorfizmi	Genotipovi	Wald	Omjer izgleda	95%CI	p
rs1800783	TT TA AA	0,138	1,0	0,95-1,1	0,573
rs1800779	AA AG GG	0,081	0,99	0,925-1,1	0,776
rs2070744	TT TC CC	0,306	1,02	0,95-1,1	0,58
rs1799983	GG GT TT	0,228	1,03	0,93-1,13	0,633
rs3918227	CC CA AA	0,007	0,99	0,78-1,3	0,935
rs3918186	AA AT TT	0,068	1,0	0,869-1,2	0,794
rs3918188	CC CA AA	0,315	0,985	0,94-1,04	0,574
rs1808593	TT TG GG*	5,0	1,06	1,0-1,1	<b>0,025</b>

\*Parametar najniže statističke vjerojatnosti

Logističkom regresijskom analizom pokazali smo da je statistički značajno veća pojava razvoja hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga u djece s TT genotipom polimorfizma rs1808593 ( $p=0,025$ ) (Tablica 10).



Iz gore navedenog GG genotip ima najmanju vjerojatnost da će se javiti u oboljeloj skupini te smo usporedili učestalost TT i TG genotipa polimorfizma rs1808593 s pojavom hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga i dobili smo rezultate prikazane u Tablici 11.

**Tablica 11:** Omjer izgleda za pojavu hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga između genotipova TT i TG polimorfizma rs1808593

Polimorfizam	Genotipovi	Wald	Izgled omjera	95%CI	p vrijednost
rs1808593	TT TG	6,3	1,9	1,15-3,1	<b>0,012</b>

Omjer izgleda za nastanak hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga je 1,9x veći u djece s TT nego s TG genotipom. Ovom analizom isključen je vrlo rijetki genotip GG.

**Tablica 12.** Omjer izgleda za pojavnost perinatalnog hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga prema kliničkim parametrima: spol, Apgar indeks, porođajna masa i gestacijska dob.

Klinički parametri	Wald	Omjer izgleda	95%CI	p vrijednost
Spol m Ž <sup>®</sup>	6,6	1,98	1,18-3,34	0,01
AS* <5 6-7 8-9 10 <sup>®</sup>	24,8	1,92	1,36-2,5	<0,001
PM** <1000 do 1499 1500-2499 >2500 <sup>®</sup>	7,1	1,38	1,1-1,75	0,008
GD*** <32 32-36 >37 <sup>®</sup>	11,3	1,51	1,19-1,93	0,001

\*AS – Apgar indeks, \*\*PM – Porođajna masa u gramima, \*\*\* GD - Gestacijska dob u tjednima,® Parametar najniže statističke vjerojatnosti

Logističkom regresijskom analizom dobili smo da je omjer izgleda za pojavnost hipoksično-ishemičnog oštećenja dva puta veći u djece muškog spola (p=0,01).

Omjer izgleda za nastanak bolesti u odnosu na AS, raste prelaskom iz više u nižu vrijednost AS za 1,92 puta ( $p < 0,001$ ) i to od AS 10 do AS <5.

Također omjer izgleda za nastanak bolesti je 1,38 puta veći u djece s nižom porođajnom masom ( $p = 0,008$ ).

Nađena je povezanost između gestacijske dobi i omjera izgleda za nastanak bolesti, gdje je vjerojatnost 1,5 puta veća da će novorođenče niže gestacijske dobi imati hipoksično-ishemično oštećenje ( $p = 0,001$ ).

#### 4.2.9. Rezultati usporedbe stupnja oštećenja mozga i kliničkih parametara

**Tablica 17:** Povezanost težine patološkog nalaza magnetske rezonancije s obzirom na spol u oboljeloj skupini

Stupanj oštećenja	Muški spol No (%)	Ženski spol No (%)	Ukupno No (%)	$\chi^2$	p vrijednost
MR* St. 2	24 (63,2)	14 (36,8)	38 (100)	0,06	0,94
MR* St. 3	46 (63,9)	26 (36,1)	72 (100)		
Ukupno	70 (63,6)	40 (36,4)	110 (100)		

\* MR – magnetska rezonancija,  $\chi^2$ - hi kvadrat test, p-vrijednost

Nismo uočili razlike među spolovima s obzirom na težinu hipoksično-ishemičnog oštećenja, potvrđenog nalazom MR.

**Tablica 18:** Povezanost težine patološkog nalaza magnetske rezonancije s obzirom na gestacijsku dob u oboljeloj skupini

Stupanj oštećenja	GD <32 No (%)	GD 32-36 No (%)	GD ≥37 No (%)	Ukupno No (%)	$\chi^2$	p vrijednost
MR* St.2	13 (34,2)	15 (39,5)	10 (26,3)	38 (100)		
MR* St.3	39 (54,2)	23 (31,9)	10 (13,9)	72 (100)		
<b>Ukupno</b>	52 (47,3)	38 (34,5)	20 (18,2)	110 (100)		

\* MR – magnetska rezonancija,  $\chi^2$ - hi kvadrat test, p-vrijednost

Postoji 90% vjerojatnost da će djeca niže gestacijske dobi imati vrlo teška oštećenja mozga (MR Stupanj 3). A djeca veće gestacijske dobi ≥37 tjedana, imaju 90% vjerojatnost da će taj oblik oštećenja biti blaži (stupanj 2).

**Tablica 19:** Povezanost težine patološkog nalaza magnetske rezonancije s obzirom na porođajnu masu u oboljeloj skupini

PM *	≤1000 No (%)	do 1499 No (%)	1500-2499 No (%)	>2500 No (%)	Ukupno No (%)	$\chi^2$	p
MR** St.2	4 (10,5)	8 (21,1)	12 (31,6)	14 (36,8)	38 (100)		
MR* St.3	10 (13,8)	20 (27,8)	30 (41,7)	12 (16,7)	72 (100)		
<b>Ukupno</b>	14 (12,7)	28 (25,5)	42 (38,2)	26 (23,6)	110 (100)		

\* PM – porođajna masa u gramima, \*\*MR – magnetska rezonancija,  $\chi^2$ - hi kvadrat test, p-vrijednost

Postoji 90% vjerojatnost da će djeca niže porođajne mase imati vrlo teška oštećenja mozga (Stupanj 3). Također, postoji gotovo 90% vjerojatnost da kod djece s porođajnom masom >2500 g, a koja imaju hipoksično-ishemično oštećenje mozga, oštećenje bude blažeg stupnja (Stupanj 2).

**Tablica 20:** Povezanost težine patološkog nalaza magnetske rezonancije s obzirom na Apgar indeks u oboljeloj skupini

AS*	≤5 No (%)	6-7 No (%)	8-9 No (%)	10 No (%)	Ukupno No (%)	$\chi^2$	p
MR** St.2	14 (36,8)	15 (39,5)	5 (13,2)	4 (10,5)	38 (100)	2,801	0,423
MR** St.3	36 (50,0)	24 (33,3)	9 (12,5)	3 (4,2)	72 (100)		
Ukupno	50 (45,5)	39 (35,5)	14 (12,7)	7 (6,3)	110 (100)		

\* AS – Apgar indeks, \*\*MR – magnetska rezonancija,  $\chi^2$ - hi kvadrat test, p-vrijednost

Nismo našli povezanost između stupnja oštećenja mozga, dijagnosticirano MR, i vrijednosti AS. Ali kad smo izdvojili dvije kategorije AS<5 i AS 10 uočili smo da postoji 90% vjerojatnost da djeca s AS≤5 kod kojih je dijagnosticirano hipoksično-ishemično oštećenje mozga (ukupno je bilo 45,5% djece) imaju teži stupanj oštećenja mozga, Stupanj 3. Djeca kod kojih je dijagnosticirano hipoksično-ishemično oštećenje mozga, ali su pri porodu imala Apgar indeks 10 (ukupno smo imali 6,4% takve djece), imaju 90% vjerojatnost da je njihov nalaz MR pokaže blaži stupanj oštećenja.

## 5. RASPRAVA

Tek se od nedavno otkrila važnost NO u reguliranju nekih značajnih fizioloških procesa, među ostalim u komunikaciji među živčanim stanicama, u procesima obrane imunostava, u proširenju žila, a s time u smanjenju krvnog tlaka. U organizmu se neprestano stvaraju minimalne količine NO, ali u stanjima hipoksije-ishemije dolazi do pojačane produkcije NO zbog povećanog ulaska  $\text{Ca}^{2+}$  kroz NMDA i AMPA receptorske kanale u endotelne stanice krvnih žila i aktivacije enzima eNOS-a, s posljedičnom vazodilatacijom. Na taj način se regulira protok krvi kroz tkiva, uključujući i moždani protok te se umanjuju štetni učinci hipoksije i ishemije. Pored direktne i indirektno vazodilatacije krvnih žila, NO inhibirajući adheziju trombocita ima i antitrombotički učinak, antinflamatorni sprječavajući adheziju leukocita za endotel krvnih žila, te antiproliferativni učinak sprječavajući hiperplaziju glatkih mišićnih stanica čime se njegova protektivna uloga još više potencira (44, 111, 112).

Promjene u genu za *NOS3* (polimorfizmi gena) koji kodira enzim eNOS, povezane su sa promjenom koncentracije NO u plazmi i promijenjenom vaskularnom reaktivnošću (113). Do danas su otkriveni brojni polimorfizmi u promotorskoj regiji, u egzonima i intronima gena za *NOS3*. Istraživanja su uglavnom posvećena funkcionalnim varijantama npr. rs2070744 (-786T/C), intron 4 VNTR i rs1799983 (Glu298Asp). Za funkcionalne polimorfizme se smatra da imaju jednaki učinak u svim populacijama jer svugdje na isti način mijenjaju protein, a općenito vrijedi mišljenje da se fiziološka uloga proteina ne razlikuje bitno među populacijama. Tako je rs1799983 (Glu298Asp) polimorfizam gena za *NOS3* najčešća varijanta kodirajuće regije gena za *NOS3*, koja mijenja funkciju gena i smanjuje stvaranje NO u krvnim žilama te dovodi do endotelne disfunkcije (114).

Nadalje, otkriven je funkcionalni polimorfizam rs2070744 (-786T/C), u promotoru gena za *NOS3* koji smanjuje aktivnost promotora za 50% te na taj način mijenja proteinsku ekspresiju, razinu mRNA i koncentraciju nitrita/nitrata u serumu. Kroz brojne studije također je povezan mutirani C alel polimorfizma -786T/C s razvojem vaskularnih bolesti kao što je ishemična bolest srca i mozga (96, 115-119).

Nedavna istraživanja polimorfizama gena za *NOS3* upućuju na mogući utjecaj genetskih mutacija kao rizičnih čimbenika za prijevremeni porod, razvoj HIE, IVK i bronhopulmonalne displazije te retinopatije nedonoščeta (120-122).

Temeljem tih istraživanja pretpostavili smo da na perinatalno hipoksično-ishemično oštećenje mozga i intraventrikularno krvarenje može utjecati aktivnost enzima eNOS i promijenjena produkcija NO, te da postoje genetske mutacije gena za *NOS3*, koji kodira eNOS i koje povećavaju rizik perinatalnog oštećenja mozga. Istražili smo utjecaj šest tag-SNP-ova; rs3918186, rs3918188 (-1474T/A), rs1800783, rs1808593 (-10G/T), rs3918227, rs1799983 (Glu298Asp) koji je ujedno i funkcionalni SNP te još dva dodatna funkcionalna SNP-a: rs2070744 (-786C/T), rs1800779 (-922A/G), gena za *NOS3* i/ili njihovih haploidnih kombinacija s nastankom i intenzitetom perinatalnog hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga.

Tag SNP-ovi su u pravilu nefunkcionalni polimorfizmi koji nemaju direktan utjecaj na kodiranje proteina, a pronađena povezanost npr. s nekom bolešću interpretira se preko LD veze između tih polimorfizama i nekih još do danas neutvrđenih funkcionalnih polimorfizama. Zbog toga se ovi polimorfizmi nazivaju biljezima za prave funkcionalne polimorfizme koji bi se trebali naknadnim istraživanjima utvrditi. Da bi se utvrdili funkcionalni polimorfizmi, buduće bi studije trebale istraživati produljene haplotipove koji će obuhvaćati čitavu regiju gena, promotore, egzone, introne i 3' kraj (123).

Ova studija uključila je 110 djece s hipoksično-ishemičnim oštećenjem mozga i kontrolnu skupinu od 128 djece rođenih u 16-godišnjem periodu na području Dalmacije – Hrvatska.

Na početku rasprave potrebno je osvrnuti se na neujednačenost između istraživanih skupina. Naime, već davno je poznata povezanost prijevremenog poroda s hipoksično-ishemičnim oštećenjem mozga i posljedičnim razvojem cerebralne paralize. Prevalencija cerebralne paralize među donošenom novorođenčadi je 0.1%, dok u nedonoščadi, prevalencija znatno raste i iznosi 9.1% za nedonoščad rođena između 23. i 27. tjedna gestacije (124).

I u našoj studiji je potvrđena veća učestalost hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga u nedonoščadi, posebno niže gestacijske dobi, ispod 32 tj. [OR 1,51 (95% CI 1,19-1,93) p=0,001]. Iz tog razloga i ispitanici kontrolne skupine trebali bi imati sličan rizik za oštećenje. Međutim, vrlo teško je naći odgovarajuću kontrolnu skupinu na ograničenom geografskom području Dalmacije, tako da je u ovoj studiji nedonoščad više zastupljena u

oboljeloj skupini nego u kontrolnoj, što može dovesti do pristranosti u raspodjeli genotipova među grupama. Kako bi pokušali izbjeći pristranost u raspodjeli genotipova istraživani genetski polimorfizmi nisu samo uspoređivani između oboljele i zdrave skupine, nego smo u korelaciju uključili i druge moguće čimbenike rizika (gestacijsku dob, spol, porođajnu masu i Apgar indeks) za razvoj perinatalnog oštećenja mozga zasebno za oboljelu i zasebno za kontrolnu skupinu, ali nismo uočili nikakve statistički značajne razlike (120).

Nadalje potrebno se osvrnuti na rezultate analize kvalitete genotipova prema kojima je genotipska distribucija polimorfizma rs1808593 (-10G/T) u intronu 23 neznatno odstupala od HW ravnoteže. Uzrok odstupanja rs1808593 (-10G/T) polimorfizma od HW ravnoteže, između ostalog mogao bi se objasniti postojanjem populacijske stratifikacije. Odstupanje od HW ravnoteže se dešava kada dio ispitanika i/ili kontrola pripada različitim subpopulacijskim skupinama u kojima je učestalost istraživanog polimorfizma različita. Tada se unutar neke od istraživanih skupina, s obzirom na istraživani polimorfizam mijenja populacijska ravnoteža što onda rezultira odstupanjem od HW ravnoteže. Prema mišljenju nekih znanstvenika populacijska stratifikacija može se spriječiti kontrolom ispitanika na porijeklo (bijelačko, afričko-američko, istočno azijsko i dr.) kada se radi o populacijama s jakim povijesnim migracijama. Također i u relativno homogenim europskim populacijama teško je uočiti rezidualne genetičke utjecaje koji su naslijeđeni od inicijalnih populacija (125). Ta djelovanja mogu utjecati na odstupanja u učestalostima alela te na dobivanje lažno pozitivnih rezultata. Nadalje, populacijska stratifikacija može biti uzrokovana rodbinskim vezama između istraživanih ispitanika. U ovoj studiji istraživana populacija dolazi iz male homogene regije u kojoj postoji mogućnost da su neki od ispitanika međusobno u bližoj ili daljoj rodbinskoj vezi koja bi onda mogla utjecati na učestalost rs1808593 (-10G/T) alela i poremećaj HW ravnoteže. Međutim, tada bi takva stratifikacija vjerojatno uzrokovala i odstupanja drugih alela koje u ovoj studiji ne uočavamo. Ova devijacija bi mogla utjecati na pronađeni pozitivni haplotipski rezultat, ali isto tako mogućnost pravog pozitivnog rezultata ne bi smjela biti isključena. Zbog toga smo povećanjem broja ispitanika kontrolne skupine smanjili odstupanje od HW ravnoteže, koje se i dalje zadržalo, ali sa graničnom statističkom značajnošću ( $p=0,0342$ ).

Drugo ograničenje studije je u veličini uzorka. Zbog razmjerno velike učestalosti rjeđeg alela statistička snaga studije je bila 80%. Snaga studije postignuta je uz OR od 1,69 do 2,1.

Puno je više pozitivnih aspekata ove studije. U studiji se analizira osam polimorfizma gena za *NOS3* u djece s hipoksično-ishemičnim oštećenjem mozga u subpopulaciji Hrvatske po prvi put. Od osam ispitivanih polimorfizama šest je tag polimorfizma. To je prva studija koja na ovakav način analizira tag polimorfizme cijelog gena. Upravo, jedan od najboljih pristupa u analizi utjecaja polimorfizma gena za *NOS3* na nastanak bolesti je analiza tag SNP-ova (engl. *tagging SNP*), koja u dosadašnjim objavljenim istraživanjima povezanosti genskih polimorfizama i hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga odnosno posljedične cerebralne paralize nije primijenjena. Ovim pristupom SNP-ovi se ne odabiru s obzirom na funkcionalnost već na temelju LD strukture gena. Dakle, ukoliko gen ima šest takvih blokova, dovoljno je analizirati šest tag SNP-ova. Genotipiziranjem tag SNP-ova jednog gena dobiva se informacija o čitavom genu. S obzirom da mnogobrojni polimorfizmi mogu pokazivati različite LD odnose u različitim populacijama bitno je utvrditi LD strukturu i haplotipove gena u istraživanoj populaciji da bi se uspješno mogla utvrditi njihova povezanost s npr. nekim oboljenjem (126). Odgovor na pitanje „zašto u različitim populacijama u istim genskim regijama postoje različite LD vrijednosti?“ krije se u složenom nastanku polimorfizama tijekom evolucije. Općenito, nakon što se unutar DNA molekule dogodi mutacija ona se tijekom vremena može proširiti u populaciji tj. može povećati svoju učestalost i tada dobiva naziv polimorfizam. Različita brzina širenja polimorfizama među različitim populacijama ili većim etničkim grupama zbog raznih čimbenika (okoliša, stope preživljavanja, pozitivne i negativne selekcije itd.) može objasniti razlike u učestalosti alela nekog polimorfizma među populacijama. U istom se krije odgovor i za nastanak različitih LD relacija među polimorfizmima u različitim populacijama. Ovakvi evolucijski procesi mogu dovesti do razvoja složenih odnosa među polimorfizmima, koji onda obično u bliskim populacijama budu slični, a u jako udaljenim i prostorno izoliranim populacijama znatno različiti (126). Jednom kada su pronađeni rizični haplotipovi tada se pronalazak odgovornih polimorfizama temelji na staničnim i molekularnim studijama koje traže funkcionalne razlike između rizičnih haplotipova (126, 127).

Naša studija je jedna od rijetkih studija dosada objavljenih koja se bavi utjecajem mutacija gena za *NOS3* na hipoksično-ishemično perinatalno oštećenje mozga. Do danas je nekoliko objavljenih studija koje su istraživale utjecaj mutacija raznih gena, ali u djece s cerebralnom paralizom bez jasno definirane etiologije nastanka cerebralne paralize. Nadalje, prednost ove studije je da se konačna potvrda hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga



temelji na slikovnoj pretrazi mozga, magnetskoj rezonaciji, dok je u ostalim studijama kriterij za uključivanje ispitanika bio samo klinički ne i morfološki.

Cilj studije je da utvrdi utjecaj gena za *NOS3* na hipoksično-ishemično perinatalno oštećenje mozga u našoj populaciji i da pridonese ukupnom znanju o njegovom značenju. Studija je dizajnirana na način da bude kompatibilna za uspoređivanje sa studijama koje su provedene u drugim populacijama i zbog toga može biti korisna u budućim meta-analizama gena za *NOS3*.

Najvažniji rezultat ove studije je povezanost TGT haplotipa polimorfizama rs1800783 (-1474T/A), rs1800779 (-922A/G) i rs2070744 (-786T/C) s hipoksično-ishemičnim oštećenjem mozga ( $p=0,001$ ). U poligenkim bolestima, informacija o haplotipu daje više uvida nego ona o genotipu. Utvrđeno je da neki polimorfizmi, iz promotorskih i 3' netranslatirajućih regija, tek zajedničkim međudjelovanjem mogu utjecati na razinu mRNA. Zbog toga je njihova kombinacija na jednom kromosomu vrlo važna za ispoljavanje funkcionalnog učinka. Tako dva pojedinca s potpuno istim genotipovima, ali različitim haplotipovima, mogu pokazivati različiti rizik za nastajanje neke bolesti (126). U ovom se krije važnost proučavanja ne samo genotipova nego i haplotipova u razumijevanju uzroka nastajanja složenih bolesti.

Cho i sur. su našli značajno nižu učestalost haplotipa AbT polimorfizama rs1799983 (Glu298Asp), VNTR u intronu 4 i rs2070744 (786T/C) u skupini s hipoksično-ishemičnom encefalopatijom u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p=0,029$ ) (128).

Moguće objašnjenje za klinički učinak naše TGT haplotipske kombinacije polimorfizmama rs1800779, rs2070744 i rs1800783 leži u činjenici da su smješteni u promotoru i regulatornoj regiji promotora (engl. *upstream repression sequence* - URS) gena za *NOS3*. Polimorfizmi rs1800779, rs2070744 već su prije prepoznati kao najvažnija funkcionalna mjesta za regulaciju gena za *NOS3*, oni utječu na mRNA transkripciju i redukciju genske ekspresije (114). Sva tri polimorfizma, rs1800779, rs2070744 i rs1800783, međusobno se nalaze se u potpunom LD-u ( $r^2=1$ ) stoga se gotovo uvijek nasljeđuju zajedno. Mi ne možemo sa sigurnošću tvrditi koji od njih tri je pravi funkcionalni polimorfizam. Istraživanje Veldmana i sur. polimorfizma rs2070744 (-786T/C) smještenog u 5'- regiji gena za *NOS3* pokazalo je da rjeđi C alel značajno smanjuje aktivnost *NOS3* genskog promotora te bi to moglo upućivati da je SNP rs2070744 (-786T/C) funkcionalan i odgovoran za promjenu ekspresije gena za *NOS3* (114, 129). To nas usmjerava na zaključak da će novorođenčad s TGT haplotipskom kombinacijom polimorfizmama rs1800779, rs2070744 i rs1800783, zbog

poremećene transkripcije i redukcije genske ekspresije, te posljedične smanjene bioraspoloživosti NO u odgovarajućim uvjetima imati veću mogućnost za razvoj hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga.

Poznato je da je primjena malih doza inhalacijskog NO smanjila stopu smrtnosti i potrebu za ekstrakorporealnom membranskom oksigenacijom. Dijelom objašnjenje za povoljan učinak inhalacijskog NO kod djece sa respiratornim distres sindromom i bronhopulmonalnom displazijom možda leži upravo u smanjenoj produkciji i bioraspoloživosti NO kao posljedicu smanjene genske ekspresije i poremećene sinteze enzima eNOS (130-132).

Pokazalo se također, da inhalirani NO ima i pozitivan učinak na određena neurološka stanja perinatalnog perioda. Male doze inhalacijskog NO smanjuju incidenciju opsežnog IVK-a, PVL-a. Također je pokazano da je neurorazvojni ishod bolji kod nedonoščadi koja su primala inhalacijski NO i da je kod te nedonoščadi smanjena učestalost cerebralne paralize. Stoga je NO kataliziran od strane eNOS, koju kodira gen za *NOS3* veoma značajan kako za razvoj pluća tako i za razvoj mozga nedonoščadi (132-134). Sve navedeno upućuje na pravovremenu primjenu inhalacijskog NO u djece s TGT haplotipom polimorfizama rs1800779, rs2070744 i rs1800783.

Analizirajući šest tag polimorfizama koji pokrivaju cijeli gen za *NOS3* (rs3918186, rs3918188, rs1800783, rs1808593, rs3918227, rs1799983), pokazali smo drugi značajan rezultat, genotipsku povezanost rs1808593 (-10G/T) tag SNP-a s hipoksično-ishemičnim oštećenjem mozga. Uočena je statistički veća učestalost TT genotipa polimorfizma rs1808593 (-10G/T) ( $p=0,03$ ) u djece s hipoksično-ishemičnim oštećenjem mozga, a manja učestalost TG genotipa istog polimorfizma.

Nadalje, analizom povezanosti distribucije alela svih osam ispitivanih polimorfizama; šest tag-SNP-ova: rs3918186, rs3918188 (-1474T/A), rs1800783, rs1808593 (-10G/T), rs3918227, rs 1799983 (Glu298Asp) koji je ujedno i funkcionalni SNP i još dva funkcionalna SNP-a: rs 2070744 (786C/T), rs1800779 (-922A/G) polimorfizma između oboljele skupine i kontrolne skupine nije dobivena statistički značajna razlika.

Do danas, nekoliko je studija istraživalo povezanost polimorfizama gena za *NOS3* s nastankom perinatalnog oštećenja mozga i cerebralne paralize u različitim populacijama

svijeta. Vrlo često pozitivni rezultati iz jedne populacije nisu bili ponovljeni u drugim populacijama. U tri dosadašnja istraživanja provedena na području Australije, nađena je povezanost polimorfizma rs1800779 (-922A/G) već spomenute promotorske regije gena za *NOS3* s cerebralnom paralizom u nedonoščadi (88, 120). Prva studija pokazala je povezanost polimorfizma rs1800779 (-922A/G) i to heterozigotnog AG genotipa i homozigotnog GG genotipa s kliničkom slikom cerebralne paralize u nedonoščadi, rođenih prije 32. tj. Također su pokazali sličnu povezanost i funkcionalnog polimorfizma rs1799983 (Glu298Asp) istog gena (88). Studije, Gibsona i sur. isto su potvrdile povezanost *NOS3* promotorskog polimorfizma rs1800779 (-922A/G) u nedonoščadi s cerebralnom paralizom, ali nisu našli korelaciju s drugim analiziranim polimorfizmom rs1799983 (Glu298Asp) (120, 135).

Miller i sur. su istraživali povezanost 31-og polimorfizma raznih gena s hipoksično-ishemičnim inzultom novorođenčadi s područja Kalifornije i nisu dokazali alelsku povezanost polimorfizama rs1799983 (-894G/T), rs1800779 (-922A/G) i -690C/T, gena za *NOS3* s hipoksično-ishemičnim inzultom (136).

Cho i sur. objavili su nedavno istraživanje na tri polimorfizma gena za *NOS3* (uključujući i 2 polimorfizma iz naše studije) s hipoksično-ishemičnim oštećenjem mozga u populaciji Koreje. Pronašli su povezanost već spomenutog AbT haplotipa polimorfizama rs1799983 (Glu298Asp, -894G/T), VNTR u intronu 4 i rs2070744 (786T/C) s hipoksično-ishemičnom encefalopatijom. Pokazali su da je učestalost G alela polimorfizma rs1799983 (Glu298Asp), češća u oboljeloj skupini nego u kontrolnoj, te su potvrdili da su TC genotip i C alel SNP-a rs2070744 (-786C/T) češći u pacijenata s HIE i perzistirajućom plućnom hipertenzijom (128). Međutim istraživani uzorak je bio malen i snaga studije je bila nedovoljna za utvrditi pravi učinak.

U najnovijoj studiji povezanosti polimorfizama gena *NOS3* s intraventrikularnim krvarenjem u populaciji Afričko-Američke dojenčadi Vannemreddy i sur. potvrdili su da se mutiran SNP rs2070744 (-786C/T) alel javlja 2-puta češće u nedonoščadi s respiratornim distres sindromom, bronhopulmonalnom displazijom i intraventrikularnim krvarenjem (121).

Rezultati dobiveni iz svih studija potvrđuju već uočeno pravilo da studije povezanosti rijetko repliciraju (potvrđuju) prijašnje rezultate, što smo uvidjeli i našom studijom. Hirschhorn i sur. su analizom 600 studija povezanosti pokazali da se u manje od 4% slučajeva pronađu isti rezultati koji potvrde prethodni rezultat (137). Dijelom se to može objasniti različitošću etničkih grupa, ali najčešći razlog je mali početni uzorak ispitanika zbog kojih studija nema dovoljno snage da bi utvrdila pravi učinak (138).

Do sada objavljene studije povezanosti te meta-analiza O'Callaghana i sur. još uvijek nisu razjasnile ulogu polimorfizama gena za *NOS3* u patogenezi hipoksično-ishemičnog perinatalnog oštećenja mozga i cerebralne paralize (86). Uloga gena za *NOS3* u nastanku hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga možda ovisi i o drugim kliničkim parametrima (gestacijska dob, porođajna masa, spol ...) i zbog toga bi u budućnosti trebalo provoditi studije na većem uzorku u različitim populacijama, a rezultati tih studija bi trebali biti interpretirani u svjetlu međudjelovanja svih čimbenika, kliničkih i genetičkih.

Stoga je napravljena analiza distribucije alela i genotipova ispitivanih polimorfizma s obzirom na kliničke parametre; spol, gestacijsku dob, Apgar indeks i porođajnu masu.

Uočena je češća pojava T alela rs1808593 (-10G/T) SNP-a u djece s nižim Apgar indeksom. Iako je T alel učestaliji u svim skupinama, razlika u učestalosti između T i G alela značajnija je što je Apgar indeks niži ( $p=0,015$ ). Drugi polimorfizmi nisu pokazali povezanost distribucije alela s obzirom na kliničke čimbenike u obje ispitivane skupine.

Istraživanjem genotipova i kliničkih parametara uočili smo da se AA genotip SNP-a rs3918186 sa dvostruko većom učestalošću javlja u djece s AS 10 ( $p=0,025$ ).

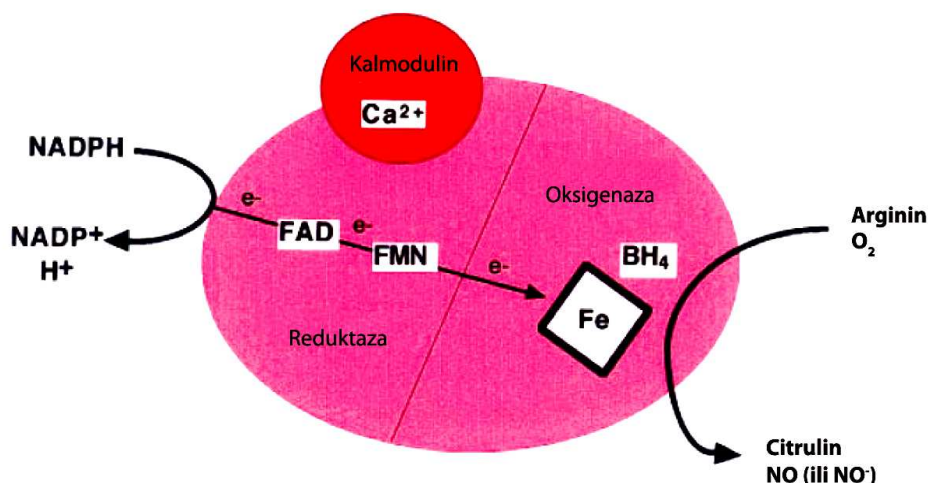
Moglo bi se reći da rezultati studije možda upućuju na moguću rizičnost odnosno zaštitnost nekih genotipova *NOS3* polimorfizama. Pravi utjecaj ovih genotipova i alela moći će se objasniti tek nakon što funkcionalne studije svih polimorfizama budu izvršene.

S obzirom na potvrđenu genotipsku povezanost rs1808593 (-10G/T) tag SNP-a s hipoksično-ishemičnim oštećenjem mozga, te veću učestalost TT genotipa polimorfizma rs1808593 (-10G/T) ( $p=0,03$ ) u oboljeloj skupini, a manju učestalost TG genotipa, logističkom regresijskom analizom izračunali smo koliki je omjer izgleda za pojavu hipoksično-ishemičnog oštećenja i dobili smo da je značajno veća mogućnost razvoja hipoksično-ishemičnog oštećenja u djece s TT genotipom SNP-a rs1808593 (-10G/T) nego s genotipovima ostalih ispitivanih polimorfizama [OR 1,06 (95%CI 1,0-1,1)  $p=0,025$ ]. Nadalje, uspoređujući TT i TG genotipove istog polimorfizma dobili smo da je vjerojatnost nastanka oštećenja mozga dva puta veća u djece s TT nego s TG genotipom tog polimorfizma [OR 1,9 (95%CI 1,15-3,1)  $p=0,012$ ]. Ovom analizom isključen je vrlo rijetki genotip GG.

Postavlja se pitanje „kako polimorfizam rs1808593 smješten u intronu 23 gena za *NOS3* je odgovoran za razvoj hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga?“ Iako je polimorfizam rs1808593 (-10G/T) gena za *NOS3* smješten u intronu 23 i ne pripada skupini

funkcionalnih polimorfizama koji kodiraju protein, ipak promjene u intronskim sekvencama mogu imati potencijalni učinak na transkripciju gena ili stabilnost mRNA, te naj taj način utjecati na razinu ekspresije samog gena, a time i na funkciju enzima. To potvrđuje i istraživanje Yoon i sur. koji su utvrdili povezanost SNP-a rs1808593 (-10G/T) u intronu 23 gena za *NOS3* s koncentracijom NO u plazmi i s koronarnom arterijskom bolešću (113). Također su ustanovili povezanost polimorfizama rs1799983 (-894G/T) i rs1808593 (-10G/T) u intronu 23, individualno i u haplotipskoj kombinaciji, sa sklonošću hipertenziji još od djetinstva, posebno u osoba ženskog spola (139).

Moguće objašnjenje za funkcionalni učinak ovog intronskog polimorfizma je njegova lokacija u području gena za *NOS3* koji kodira reduktaznu domenu eNOS enzima na koju se aktivno veže NADPH, a koji katalizira pretvorbu L-arginina u citrulin uz stvaranje NO (Slika 16).



**Slika 16.** Enzim endotelijalna sintaza dušikova monoksida (nikotin amid adenin dinukleotid – NADH, nikotin amid adenin dinukleotid fosfat -NADPH, tetra biopterin - BH<sub>4</sub>). Prilagođeno prema referenci (140).

Polimorfizam rs1808593 (-10G/T) je jedini polimorfizam koji je pokazao genotipsku povezanost s hipoksično-ishemičnim oštećenjem mozga, a nije u LD-u s nijednim drugim

polimorfizmom koji smo istraživali. Ovakvi polimorfizmi se mogu nazvati biljezima za prave funkcionalne polimorfizme koji bi se trebali naknadnim studijama utvrditi.

Pored utvrđivanja utjecaja osam istraživanih polimorfizama gena za *NOS3* i/ili njihovih haploidnih kombinacija s nastankom i intenzitetom perinatalnog hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga analizirani smo i povezanost kliničkih čimbenika s nastankom i intenzitetom perinatalnog hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga.

Potvrdili smo, pored već prije spomenute povezanosti gestacijske dobi i hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga, također i povezanost niskog AS, manjeg od 5 u petoj minuti nakon poroda, s hipoksično-ishemičnim oštećenjem [OR 1,92 (95%CI 1,36-2,5)  $p < 0,001$ ], što se slaže s dosada objavljenim istraživanjima. Nedavno objavljeno kohortno istraživanje (engl. *cohort study*). Lie i sur. pokazalo je da je prevalencija cerebralne paraliza u djece s AS < 3, 130-puta veća nego u djece s AS 10 (141).

Slično opažanje smo uočili kod djece s ekstremno niskom PM, < 1000g, koja imaju više izgleda za razvoj hipoksično-ishemičnog oštećenja nego djeca veće porođajne mase [OR 1,38 (95% CI 1,1-1,75)  $p = 0,008$ ]. Tu se treba naglasiti i činjenicu da su djeca niske PM uglavnom nedonoščad, gdje su GD i PM najčešće u uskoj korelaciji (142).

Utvdili smo da dječaci imaju veći rizik za razvoj hipoksično-ishemičnog oštećenja nego djevojčice [OR 1,98 (95% CI 1,18-3,34,  $p = 0,01$ ]. Ovi podaci se slažu s opažanjima drugih autora. Thorngren-Jerneck i sur. su također utvrdili da dječaci imaju veći rizik za razvoj cerebralne paralize nego djevojčice (1,36:1), posebice ako su rođeni prije vremena (1,55:1) (143). I druga epidemiološka istraživanja pokazala su i do 30% veću učestalost cerebralne paralize kod dječaka nego djevojčica, rizik za razvoj cerebralne paralize povećava se četverostruko za mušku dojenčad na 97-oj centili porođajne mase i 16 puta je veći rizik za mušku dojenčad na 3-oj centili (142, 144).

Razlika među spolovima najvjerojatnije ima genetičku podlogu. Novija istraživanja na miševima sugeriraju da bi razlike između mužjaka i ženki u signalnim putovima koji reguliraju apoptozu mogle, barem djelomično, objasniti ta epidemiološka opažanja. Hipoksični inzult dovodi do povišenog izražaja proapoptotičkog gena *PARP* u novookoćenih miševa oba spola. Međutim, genetička inaktivacija *PARP* sprječava hipoksično-ishemično oštećenje mozga u mužjaka, ali ne i u ženki. Precizni molekularni mehanizmi koji bi objasnili te razlike nisu razjašnjeni. Daljnja istraživanja ovog fenomena na molekularnoj razini mogla bi dovesti do boljeg razumijevanja patogeneze hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga i do

otkrića novih ciljeva za potencijalne neuroprotektivne lijekove (145).

Nadalje, analizom distribucije genotipova ispitivanih polimorfizama s obzirom na nalaz slikovne pretrage mozga, MR i stupnja oštećenja mozga utvrdili smo da je dvostruko veća zastupljenost TT genotipa SNP-a rs1808593 (-10G/T) u skupini djece srednje teškim oštećenjem mozga, Stupanj 2, i dva puta veća u skupini djece sa teškim oštećenjem mozga, Stupanj 3, ( $p=0,015$ ).

Dakle, statistički je značajno veća zastupljenost TT genotipa ( $p=0,01$ ) u oboljeloj skupini s patološkim nalazom MR bez obzira na stupanj oštećenja. Među djecom s urednim nalazom MR, dakle u kontrolnoj skupini prevladavao TG genotip. Drugi polimorfizmi nisu pokazali povezanost genotipske distribucije s obzirom na nalaz MR.

Na kraju smo usporedili povezanost težine oštećenja mozga, utvrđenog MR, i kliničke parametre te smo utvrdili da djeca niže GD i niže PM imaju 90% vjerojatnost za razvoj težeg stupnja oštećenja mozga. Međutim sličnu korelaciju nismo dobili uspoređivanjem stupnja oštećenja mozga s AS i spolom.

U cilju rasvjetljivanja djelovanja gena za *NOS3* biti će potrebno provesti studije na puno većem broju ispitanika koje će imati dovoljno snage za utvrditi i malene učinke koje ovaj gen može imati. Te bi studije trebale istovremeno analizirati i rizične čimbenike, kliničke parametre te sve dobivene rezultate potvrditi u funkcionalnim studijama. Tek tada ćemo sa sigurnošću moći objasniti ulogu gena za *NOS3*, ali i drugih gena s perinatalnim hipoksično-ishemičnim oštećenjem mozga i posljedičnog razvoja neuromotornog deficita i cerebralne paralize. Ta saznanja mogu nam pomoći u razvoju novih terapijskih mjera koje će spriječiti ili ublažiti posljedice perinatalnog oštećenja mozga.



## 6. ZAKLJUČCI

1. Analizom povezanosti šest tag SNP-ova gena za *NOS3* (rs3918186, rs3918188, rs1800783, rs1808593, rs3918227, rs1799983) kao i SNP-a rs1800779 i rs2070744 s nastankom perinatalnog hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga utvrdili smo genotipsku povezanost tag SNP-a rs1808593 (-10G/T) s hipoksično-ishemičnim oštećenjem mozga.
2. Utvrđena je veća učestalost TGT haplotipa polimorfizama rs1800783 (-1474T/A), rs1800779 (-922 A/G) i rs2070744 (-786T/C) u skupini djece s hipoksično-ishemičnim oštećenjem mozga. Tri polimorfizma gena za *NOS3* koji su pokazali povećanu učestalost TGT haplotipa su međusobno u snažnom LD-u rs1800783 (-1474T/A), rs1800779 (-922 A/G) i rs2070744 (-786T/C) što može značiti da je samo jedan polimorfizam odgovoran za povezanost ili da su sva tri polimorfizma biljezi za neki negenotipizirani funkcionalni polimorfizam. Povećana učestalost navedenog haplotipa, kojeg tvore polimorfizam regulatorne regije i dva promotorska polimorfizma gena za *NOS3*, može značiti da funkcionalni polimorfizmi mogu pojačati svoj učinak zajedničkim djelovanjem kada se nalaze u *-cis* položaju.
3. Uočena je veća učestalost TT genotipa polimorfizma rs1808593 (-10G/T intron 23) u djece s hipoksično-ishemičnim oštećenjem mozga, a manja učestalost TG genotipa istog polimorfizma. To može upućivati na rizičnu ulogu TT genotipa polimorfizma rs1808593 (-10G/T) u nastanku hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga. Rs1808593 (-10G/T intron 23) polimorfizam nema poznatu funkcionalnu ulogu, stoga njegova povezanost s hipoksično-ishemičnim oštećenjem mozga može odražavati utjecaj pravog funkcionalnog polimorfizma koji još nije pronađen, a koji se nalazi u LD-u zajedno s rs1808593 polimorfizmom. Prema tome, rs1808593 polimorfizam bi mogao biti biljeg za odgovorni polimorfizam negdje drugdje u genu.



4. Nekoliko polimorfizama gena za *NOS3* u populaciji Dalmacije međusobno je bilo u jakom LD-u (rs1800783, rs1800779 i rs2070744) što je u skladu s LD strukturom srednjoeuropske populacije.
  
5. Analizom distribucije genotipova ispitivanih polimorfizama s kliničkim parametrima utvrdili smo da je AA genotip SNP-a rs3918186 češći u djece s AS 10. Analizom alelske distribucije ispitivanih polimorfizama s obzirom na kliničke parametre utvrdili smo da je T alel SNP-a rs1808593 (-10G/T) učestaliji u djece s niskim AS. Drugi polimorfizmi nisu pokazali povezanost distribucije ni genotipova niti alela s kliničkim parametrima.

## 7. LITERATURA

1. Volpe JJ. Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: Clinical Aspects. U: Volpe JJ, editor. Neurology of the Newborn. 5th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2008; str. 400-80.
2. Bax M, Goldstein M, Rosenbaum P i sur. Proposed definition and classification of cerebral palsy, April 2005. Dev Med Child Neurol 2005;47(8):571-6.
3. Graham EM, Ruis KA, Hartman AL, Northington FJ, Fox HE. A systematic review of the role of intrapartum hypoxia-ischemia in the causation of neonatal encephalopathy. Am J Obstet Gynecol 2008;199(6):587-95.
4. Jensen FE. Developmental factors regulating susceptibility to perinatal brain injury and seizures. Curr Opin Pediatr 2006;18(6):628-33.
5. Blair E, Watson L. Epidemiology of cerebral palsy. Semin Fetal Neonatal Med 2006;11(2):117-25.
6. Alvarez-Diaz A, Hilario E, de Cerio FG, Valls-Soler A, Alvarez-Diaz FJ. Hypoxic-ischemic injury in the immature brain--key vascular and cellular players. Neonatology 2007;92(4):227-35.
7. Huppi PS, Amato M. Advanced magnetic resonance imaging techniques in perinatal brain injury. Biol Neonate 2001;80(1):7-14.
8. du Plessis AJ. Cerebrovascular injury in premature infants: current understanding and challenges for future prevention. Clin Perinatol 2008;35(4):609-41.
9. Distefano G, Pratico AD. Actualities on molecular pathogenesis and repairing processes of cerebral damage in perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. Ital J Pediatr 2010;16:36-63.
10. Lorek A, Takei Y, Cady EB i sur. Delayed ("secondary") cerebral energy failure after acute hypoxia-ischemia in the newborn piglet: continuous 48-hour studies by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. Pediatr Res 1994;36(6):699-706.
11. Volpe JJ. Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: Biochemical and Physiological Aspects. U: Volpe JJ, editor. Neurology of the Newborn. 5th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2008; str. 247-324.
12. Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. Necrosis: a specific form of programmed cell death? Exp Cell Res 2003;283(1):1-16.

13. Nakka VP, Gusain A, Mehta SL, Raghubir R. Molecular mechanisms of apoptosis in cerebral ischemia: multiple neuroprotective opportunities. *Mol Neurobiol* 2008;37(1):7-38.
14. Vannucci RC, Connor JR, Mauger DT i sur. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *J Neurosci Res* 1999;55(2):158-63.
15. Perlman JM. Summary proceedings from the neurology group on hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 2006;117(3 Pt 2):S28-33.
16. Johnston MV. Excitotoxicity in perinatal brain injury. *Brain Pathol* 2005;15(3):234-40.
17. Matute C, Domercq M, Sanchez-Gomez MV. Glutamate-mediated glial injury: mechanisms and clinical importance. *Glia* 2006;53(2):212-24.
18. Johnston MV. Plasticity in the developing brain: implications for rehabilitation. *Dev Disabil Res Rev* 2009;15(2):94-101.
19. Loeliger M, Watson CS, Reynolds JD i sur Extracellular glutamate levels and neuropathology in cerebral white matter following repeated umbilical cord occlusion in the near term fetal sheep. *Neuroscience* 2003;116(3):705-14.
20. Deng W, Wang H, Rosenberg PA, Volpe JJ, Jensen FE. Role of metabotropic glutamate receptors in oligodendrocyte excitotoxicity and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(20):7751-6.
21. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000;157(5):1415-30.
22. Liu F, McCullough LD. Middle cerebral artery occlusion model in rodents: methods and potential pitfalls. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:1-9.
23. Khwaja O, Volpe JJ. Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2008;93(2):F153-61.
24. Lai MC, Yang SN. Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:1-6.
25. Mattson MP, Bazan N. Apoptosis and Necrosis. U: Siegel GJ Albers RW, Brady ST i sur. Editor. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical aspects*. 7th ed. New York: Elsevier, 2006; str. 603-16.
26. Verklan MT. The chilling details: hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Perinat Neonatal Nurs* 2009;23(1):59-68.
27. Perlman JM. Intervention strategies for neonatal hypoxic-ischemic cerebral injury. *Clin Ther* 2006;28(9):1353-65.

28. Saugstad OD. Oxidative stress in the newborn--a 30-year perspective. *Biol Neonate* 2005;88(3):228-36.
29. Blomgren K, Hagberg H. Free radicals, mitochondria, and hypoxia-ischemia in the developing brain. *Free Radic Biol Med* 2006;40(3):388-97.
30. Moncada S, Higgs A, Furchgott R. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev* 1997;49(2):137-42.
31. Forstermann U, Schmidt HH, Pollock JS i sur. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol* 1991;42(10):1849-57.
32. Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2002;277(41):38079-86.
33. Mungrue IN, Bredt DS, Stewart DJ, Husain M. From molecules to mammals: what's NOS got to do with it? *Acta Physiol Scand* 2003;179(2):123-35.
34. Hirst DG, Robson T. Nitric oxide physiology and pathology. *Methods Mol Biol* 2011;704:1-13.
35. Olivier P, Loron G, Fontaine RH i sur. Nitric oxide plays a key role in myelination in the developing brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 2010;69(8):828-37.
36. Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol* 2003;199(1):8-17.
37. Chiueh CC, Rauhala P. The redox pathway of S-nitrosoglutathione, glutathione and nitric oxide in cell to neuron communications. *Free Radic Res* 1999;31(6):641-50.
38. Bolanos JP, Almeida A. Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. *Biochim Biophys Acta* 1999;1411(2-3):415-36.
39. Guix FX, Uribesalgo I, Coma M, Munoz FJ. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol* 2005;76(2):126-52.
40. Rosenberg PA, Li Y, Ali S, Altiok N, Back SA, Volpe JJ. Intracellular redox state determines whether nitric oxide is toxic or protective to rat oligodendrocytes in culture. *J Neurochem* 1999;73(2):476-84.
41. Haynes RL, Baud O, Li J, Kinney HC, Volpe JJ, Folkerth DR. Oxidative and nitrative injury in periventricular leukomalacia: a review. *Brain Pathol* 2005;15(3):225-33.
42. Haynes RL, Folkerth RD, Trachtenberg FL, Volpe JJ, Kinney HC. Nitrosative stress and inducible nitric oxide synthase expression in periventricular leukomalacia. *Acta Neuropathol* 2009;118(3):391-9.

43. Baud O, Li J, Zhang Y, Neve RL, Volpe JJ, Rosenberg PA. Nitric oxide-induced cell death in developing oligodendrocytes is associated with mitochondrial dysfunction and apoptosis-inducing factor translocation. *Eur J Neurosci* 2004;20(7):1713-26.
44. Moro MA, Cardenas A, Hurtado O, Leza JC, Lizasoain I. Role of nitric oxide after brain ischaemia. *Cell Calcium* 2004;36(3-4):265-75.
45. Yue X, Mehmet H, Penrice J i sur. Apoptosis and necrosis in the newborn piglet brain following transient cerebral hypoxia-ischaemia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1997;23(1):16-25.
46. Volpe JJ. Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: Neuropathology and Pathogenesis. U: Volpe JJ, editor. *Neurology of Newborn*. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2008; str. 347-99.
47. Takashima S, Tanaka K. Development of cerebrovascular architecture and its relationship to periventricular leukomalacia. *Arch Neurol* 1978;35(1):11-6.
48. Inage YW, Itoh M, Takashima S. Correlation between cerebrovascular maturity and periventricular leukomalacia. *Pediatr Neuro* 2000;22(3):204-8.
49. Nonaka H, Akima M, Hatori T, Nagayama T, Zhang Z, Ihara F. The microvasculature of the cerebral white matter: arteries of the subcortical white matter. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62(2):154-61.
50. Chao CP, Zaleski CG, Patton AC. Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: multimodality imaging findings. *Radiographics* 2006;26 Suppl 1:S159-72.
51. Takashima S, Itoh M, Oka A. A history of our understanding of cerebral vascular development and pathogenesis of perinatal brain damage over the past 30 years. *Semin Pediatr Neurol* 2009;16(4):226-36.
52. Back SA, Luo NL, Borenstein NS, Levine JM, Volpe JJ, Kinney HC. Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury. *J Neurosci* 2001;21(4):1302-12.
53. Folkerth RD, Haynes RL, Borenstein NS i sur. Developmental lag in superoxide dismutases relative to other antioxidant enzymes in premyelinated human telencephalic white matter. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63(9):990-9.
54. Volpe JJ. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *Lancet Neurol* 2009;8(1):110-24.
55. Folkerth RD. Periventricular leukomalacia: overview and recent findings. *Pediatr Dev Pathol* 2006;9(1):3-13.

56. Roland EH, Hill A. Germinal matrix-intraventricular hemorrhage in the premature newborn: management and outcome. *Neurol Clin* 2003;21(4):833-51.
57. Ghazi-Birry HS, Brown WR, Moody DM, Challa VR, Block SM, Reboussin DM. Human germinal matrix: venous origin of hemorrhage and vascular characteristics. *AJNR Am J Neuroradiol* 1997;18(2):219-29.
58. Osborn DA, Evans N, Kluckow M. Hemodynamic and antecedent risk factors of early and late periventricular/intraventricular hemorrhage in premature infants. *Pediatrics* 2003;112(1 Pt 1):33-9.
59. Sarkar S, Bhagat I, Dechert R, Schumacher RE, Donn SM. Severe intraventricular hemorrhage in preterm infants: comparison of risk factors and short-term neonatal morbidities between grade 3 and grade 4 intraventricular hemorrhage. *Am J Perinatol* 2009;26(6):419-24.
60. Gould SJ, Howard S, Hope PL, Reynolds EO. Periventricular intraparenchymal cerebral haemorrhage in preterm infants: the role of venous infarction. *J Pathol* 1987;151(3):197-202.
61. Folkerth RD. Neuropathologic substrate of cerebral palsy. *J Child Neurol* 2005;20(12):940-9.
62. Mejaški-Bošnjak V. Dijagnostički pristup ranom otkrivanju neurorazvojnih odstupanja. *Paediatr Croat* 2007;51:105-10.
63. Shalak L, Perlman JM. Hypoxic-ischemic brain injury in the term infant-current concepts. *Early Hum Dev* 2004;80(2):125-41.
64. Miller SP, Ramaswamy V, Michelson D i sur. Patterns of brain injury in term neonatal encephalopathy. *J Pediatr* 2005;146(4):453-60.
65. Downen M, Zhao ML, Lee P, Weidenheim KM, Dickson DW, Lee SC. Neuronal nitric oxide synthase expression in developing and adult human CNS. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999;58(1):12-21.
66. Florio P, Abella R, Marinoni E i sur. Biochemical markers of perinatal brain damage. *Front Biosci (Schol Ed)* 2010;2:47-72.
67. Roland EH, Hill A. Clinical aspects of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Semin Pediatr Neurol* 1995;2(1):57-71.
68. Nelson KB, Ellenberg JH. Apgar scores as predictors of chronic neurologic disability. *Pediatrics* 1981;68(1):36-44.

69. Low JA. Intrapartum fetal asphyxia: definition, diagnosis, and classification. *Am J Obstet Gynecol* 1997;176(5):957-9.
70. Sarnat HB, Sarnat MS. Neonatal encephalopathy following fetal distress. A clinical and electroencephalographic study. *Arch Neurol* 1976;33(10):696-705.
71. Nagdyman N, Komen W, Ko HK, Muller C, Obladen M. Early biochemical indicators of hypoxic-ischemic encephalopathy after birth asphyxia. *Pediatr Res* 2001;49(4):502-6.
72. Ashdown H, Joita S, Luheshi GN, Boksa P. Acute brain cytokine responses after global birth hypoxia in the rat. *J Neurosci Res* 2008;86(15):3401-9.
73. van Wezel-Meijler G, Steggerda SJ, Leijser LM. Cranial ultrasonography in neonates: role and limitations. *Semin Perinatol* 2010;34(1):28-38.
74. Mejaški-Bošnjak V, Rešić B, Đuranović V, Babić-Polak J, Huzjan R, Gojmerac T. Uloga ultrasonografije u dijagnostici i prognozi perinatalnog oštećenja mozga. *Paediatr Croat* 2000;44:23-31.
75. Đuranović V. Uloga doplerskih ispitivanja u neurorizične dojenčadi. Kupešić S, Stanojević M, ur. U:Odabrana poglavlja iz ultrazvuka u ginekologiji i perinatologiji. Varaždinske Toplice: Tonimir, 2005; str. 183-7.
76. Leijser LM, de Bruine FT, Steggerda SJ, van der Grond J, Walther FJ, van Wezel-Meijler G. Brain imaging findings in very preterm infants throughout the neonatal period: part I. Incidences and evolution of lesions, comparison between ultrasound and MRI. *Early Hum Dev* 2009;85(2):101-9.
77. Rutherford M, Biarge MM, Allsop J, Counsell S, Cowan F. MRI of perinatal brain injury. *Pediatr Radiol* 2010;40(6):819-33.
78. Miletić D, Prpić I. Magnetska rezonancija u procjeni razvoja i ranog oštećenja mozga. *Medicina* 2005;42:56-63.
79. Kostovic I, Jovanov-Milosevic N. The development of cerebral connections during the first 20-45 weeks' gestation. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006;11(6):415-22.
80. Kesler SR, Ment LR, Vohr Bi sur. Volumetric analysis of regional cerebral development in preterm children. *Pediatr Neurol* 2004;31(5):318-25.
81. Barkovich AJ, Miller SP, Bartha A i sur. MR imaging, MR spectroscopy, and diffusion tensor imaging of sequential studies in neonates with encephalopathy. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006;27(3):533-47.

82. Mahoney MC. Genetic polymorphisms and disease prevention. *Pediatr Blood Cancer* 2007;48(7):742-7.
83. Roden DM, Brown NJ. Preprescription genotyping: not yet ready for prime time, but getting there. *Circulation* 2001;103(12):1608-10.
84. Prokunina L, Alarcon-Riquelme ME. Regulatory SNPs in complex diseases: their identification and functional validation. *Expert Rev Mol Med* 2004;6(10):1-15.
85. Suh Y, Vijg J. SNP discovery in associating genetic variation with human disease phenotypes. *Mutat Res* 2005;573(1-2):41-53.
86. O'Callaghan ME, MacLennan AH, Haan EA, Dekker G. The genomic basis of cerebral palsy: a HuGE systematic literature review. *Hum Genet* 2009;126(1):149-72.
87. Baier RJ. Genetics of perinatal brain injury in the preterm infant. *Front Biosci* 2006;11:1371-87.
88. Nelson KB, Dambrosia JM, Iovannisci DM, Cheng S, Grether JK, Lammer E. Genetic polymorphisms and cerebral palsy in very preterm infants. *Pediatr Res* 2005;57(4):494-9.
89. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC i sur. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001;409(6822):928-33.
90. Dordelmann M, Kerk J, Dressler F i sur. Interleukin-10 high producer allele and ultrasound-defined periventricular white matter abnormalities in preterm infants: a preliminary study. *Neuropediatrics* 2006;37(3):130-6.
91. Gibson CS, MacLennan AH, Goldwater PN, Haan EA, Priest K, Dekker GA. The association between inherited cytokine polymorphisms and cerebral palsy. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194(3):674 e1-11.
92. Yanamandra K, Boggs P, Loggins J, Baier RJ. Interleukin-10 -1082 G/A polymorphism and risk of death or bronchopulmonary dysplasia in ventilated very low birth weight infants. *Pediatr Pulmonol* 2005;39(5):426-32.
93. Wang XL, Mahaney MC, Sim AS i sur. Genetic contribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(11):3147-53.
94. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW i sur. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1993;268(23):17478-88.



95. Cooke JP, Dzau VJ. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med* 1997;48:489-509.
96. Saidi S, Mallat SG, Almawi WY, Mahjoub T. Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp, 4b/a, and -786T>C gene polymorphisms and the risk of ischemic stroke. *Acta Neurol Scand* 2010;121(2):114-9.
97. Munshi A, Rajeshwar K, Kaul S i sur. VNTR polymorphism in intron 4 of the eNOS gene and the risk of ischemic stroke in a South Indian population. *Brain Res Bull* 2010;82(5-6):247-50.
98. Li R, Lyn D, Lapu-Bula R i sur. Relation of endothelial nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide level, endothelial function, and blood pressure in African Americans. *Am J Hypertens* 2004;17(7):560-7.
99. Tsukada T, Yokoyama K, Arai T i sur. Evidence of association of the ecNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;245(1):190-3.
100. De Vries LS, Van Haastert IL, Rademaker KJ, Koopman C, Groenendaal F. Ultrasound abnormalities preceding cerebral palsy in high-risk preterm infants. *J Pediatr* 2004;144(6):815-20.
101. Weisglas-Kuperus N, Baerts W, Fetter WP, Sauer PJ. Neonatal cerebral ultrasound, neonatal neurology and perinatal conditions as predictors of neurodevelopmental outcome in very low birthweight infants. *Early Hum Dev* 1992;31(2):131-48.
102. Jovanov-Milosevic N, Culjat M, Kostovic I. Growth of the human corpus callosum: modular and laminar morphogenetic zones. *Front Neuroanat* 2009;3:3-6.
103. Kostovic SM, Brozović B, Rados M, Gojmera T. Corpus callosum thinning and specific neurocognitive deficits: a case study of perinatal brain lesion. *Cogniție Creier Comportament IX* 2005;2:403-21.
104. Krageloh-Mann I, Horber V. The role of magnetic resonance imaging in elucidating the pathogenesis of cerebral palsy: a systematic review. *Dev Med Child Neurol* 2007;49(2):144-51.
105. Inder TE, Wells SJ, Mogridge NB, Spencer C, Volpe JJ. Defining the nature of the cerebral abnormalities in the premature infant: a qualitative magnetic resonance imaging study. *J Pediatr* 2003;143(2):171-9.
106. Šuvak N. Hardy-Weinbergov model ravnoteže. *Osječki matematički list* 2005;5:91-9.

107. Wigginton JE, Abecasis GR. PEDSTATS: descriptive statistics, graphics and quality assessment for gene mapping data. *Bioinformatics* 2005;21(16):3445-7.
108. International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005;27:1299-320.
109. Evans DM, Cardon LR. A comparison of linkage disequilibrium patterns and estimated population recombination rates across multiple populations. *Am J Hum Genet* 2005;76(4):681-7.
110. Gauderman WJ. Sample size requirements for matched case-control studies of gene-environment interaction. *Stat Med.* 2002;21:35-50.
111. Iadecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci* 1997;20(3):132-9.
112. Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke* 1997;28(6):1283-8.
113. Yoon Y, Song J, Hong SH, Kim JQ. Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease. *Clin Chem* 2000;46(10):1626-30.
114. Veldman BA, Spiering W, Doevendans PA i sur. The Glu298Asp polymorphism of the NOS 3 gene as a determinant of the baseline production of nitric oxide. *J Hypertens* 2002;20(10):2023-7.
115. Casas JP, Bautista LE, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation* 2004;109(11):1359-65.
116. Berger K, Stogbauer F, Stoll M i sur. The glu298asp polymorphism in the nitric oxide synthase 3 gene is associated with the risk of ischemic stroke in two large independent case-control studies. *Hum Genet* 2007;121(2):169-78.
117. Wang XL, Wang J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Mol Genet Metab* 2000;70(4):241-51.
118. Ko NU, Rajendran P, Kim H i sur. Endothelial nitric oxide synthase polymorphism (-786T->C) and increased risk of angiographic vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 2008;39(4):1103-8.
119. Djordjevic V, Stankovic M, Brankovic-Sreckovic V, Rakicevic L, Radojkovic D. Genetic risk factors for arterial ischemic stroke in children: a possible MTHFR and eNOS gene-gene interplay? *J Child Neurol* 2009;24(7):823-7.

120. Gibson CS, MacLennan AH, Dekker GA i sur. Genetic polymorphisms and spontaneous preterm birth. *Obstet Gynecol* 2007;109(2 Pt 1):384-91.
121. Vannemreddy P, Notarianni C, Yanamandra K, Napper D, Bocchini J. Is an endothelial nitric oxide synthase gene mutation a risk factor in the origin of intraventricular hemorrhage? *Neurosurg Focus* 2010;28(1):E11.
122. Yanamandra K, Napper D, Pramanik A, Bocchini JA, Dhanireddy R. Endothelial nitric oxide synthase genotypes in the etiology of retinopathy of prematurity in premature infants. *Ophthalmic Genet* 2010;31(4):173-7.
123. Reis AF, Hauache OM, Velho G. Vitamin D endocrine system and the genetic susceptibility to diabetes, obesity and vascular disease. A review of evidence. *Diabetes Metab* 2005;31(4 Pt 1):318-25.
124. Moster D, Lie RT, Markestad T. Long-term medical and social consequences of preterm birth. *N Engl J Med* 2008;359(3):262-73.
125. Freedman ML, Reich D, Penney KL i sur. Assessing the impact of population stratification on genetic association studies. *Nat Genet* 2004;36(4):388-93.
126. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 2004;338(2):143-56.
127. Johnson GC, Esposito L, Barratt BJ i sur. Haplotype tagging for the identification of common disease genes. *Nat Genet* 2001;29(2):233-7.
128. Cho M, Hyun KS, Chung DC, Choi IY. eNOS Gene Polymorphisms in Perinatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Korean J Pathol* 2009;43(4):306-11.
129. Min J, Jin YM, Moon JS, Sung MS, Jo SA, Jo I. Hypoxia-induced endothelial NO synthase gene transcriptional activation is mediated through the tax-responsive element in endothelial cells. *Hypertension* 2006;47(6):1189-96.
130. Dani C, Bertini G. Inhaled nitric oxide for the treatment of preterm infants with respiratory distress syndrome. *Neonatology* 2008;94(2):87-95.
131. Su PH, Chen JY. Inhaled nitric oxide in the management of preterm infants with severe respiratory failure. *J Perinatol* 2008;28(2):112-6.
132. Kinsella JP, Cutter GR, Walsh WF i sur. Early inhaled nitric oxide therapy in premature newborns with respiratory failure. *N Engl J Med* 2006;355(4):354-64.
133. Marks JD, Schreiber MD. Inhaled nitric oxide and neuroprotection in preterm infants. *Clin Perinatol* 2008;35(4):793-807.

134. Tanaka Y, Hayashi T, Kitajima H, Sumi K, Fujimura M. Inhaled nitric oxide therapy decreases the risk of cerebral palsy in preterm infants with persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatrics* 2007;119(6):1159-64.
135. Gibson CS, Maclennan AH, Dekker GA i sur. Candidate genes and cerebral palsy: a population-based study. *Pediatrics* 2008;122(5):1079-85.
136. Miller SP, Wu YW, Lee J i sur. Candidate gene polymorphisms do not differ between newborns with stroke and normal controls. *Stroke* 2006;37(11):2678-83.
137. Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med* 2002;4(2):45-61.
138. Guo SW, Magnuson VL, Schiller JJ, Wang X, Wu Y, Ghosh S. Meta-analysis of vitamin D receptor polymorphisms and type 1 diabetes: a HuGE review of genetic association studies. *Am J Epidemiol* 2006;164(8):711-24.
139. Chen W, Srinivasan SR, Li S, Boerwinkle E, Berenson GS. Gender-specific influence of NO synthase gene on blood pressure since childhood: the Bogalusa Heart Study. *Hypertension* 2004;44(5):668-73.
140. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N i sur. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 1998;32(1):3-8.
141. Lie KK, Groholt EK, Eskild A. Association of cerebral palsy with Apgar score in low and normal birthweight infants: population based cohort study. *BMJ* 2010;341:c4990.
142. Hintz SR, Kendrick DE, Vohr BR, Kenneth Poole W, Higgins RD. Gender differences in neurodevelopmental outcomes among extremely preterm, extremely-low-birthweight infants. *Acta Paediatr* 2006;95(10):1239-48.
143. Thorngren-Jerneck K, Herbst A. Perinatal factors associated with cerebral palsy in children born in Sweden. *Obstet Gynecol* 2006;108(6):1499-505.
144. Jarvis S, Glinianaia SV, Arnaud C i sur. Case gender and severity in cerebral palsy varies with intrauterine growth. *Arch Dis Child* 2005;90(5):474-9.
145. Johnston MV, Hagberg H. Sex and the pathogenesis of cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol* 2007;49(1):74-8.

## TUMAČ ZNAKOVA I KRATICA

HIE	- hipoksično-ishemična encefalopatija
MR	- magnetska rezonancija
MS	- magnetska spektroskopija
ATP	- adenzin trifosfat
NMDA	- N-metil-D-aspartat
AMPA	- alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina (engl. <i>alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i> )
KA	- kainatni receptor (engl. <i>kainate receptor</i> )
PARP	- poli-ADP-riboza polimeraza
DNA	- deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
ROS	- reaktivni metaboliti kisika (engl. <i>reactive oxygen species</i> )
RNS	- reaktivni metaboliti dušika (engl. <i>reactive nitrogen species</i> )
NOS	- sintaza dušikova monoksida (engl. <i>nitric oxide synthase</i> )
iNOS	- inducibilna sintaza dušikova monoksida
cNOC	- konstitutivna sintaza dušikova monoksida
eNOS	- endotelna sintaza dušikova monoksida (engl. <i>endothelial nitric oxide synthase</i> )
nNOS	- neuralna sintaza dušikova monoksida (engl. <i>neuronal nitric oxide synthase</i> )
mtNOS	- mitohondrijalna NOS (engl. <i>mitochondrial NOS</i> )
NO	- dušikov monoksid (engl. <i>nitric oxide</i> )
NADH	- nikotin amid adenin dinukleotid
NADPH	- nikotin amid adenin dinukleotid fosfat
GTP	- gvanozin trifosfat
cGMP	- ciklički gvanozin monofosfat
TNF- $\alpha$	- tumor-nekrotski faktor-alfa.
IL	- interleukin
pre-OL	- pre-oligodendrocit
PVL	- periventrikularna leukomalacija
DWMG	- difuzna gliozna bijele tvari (engl. <i>diffuse white matter gliosis</i> )

PVK	- periventrikularno krvarenje
IVK	- intraventrikularno krvarenje
ACA	- prednja moždana arterija (engl. <i>anterior cerebral arteries</i> )
MCA	- srednja moždana arterija (engl. <i>middle cerebral arteries</i> )
PCA	- stražnja moždana arterija (engl. <i>posterior cerebral arteries</i> )
AS	- Apgar indeks (engl. <i>Apgar score</i> )
UZV	- intrakranijska ultrasonografija
SNP	- polimorfizam u jednom nukleotidu (engl. <i>single nucleotide polymorphisms</i> )
bp	- parovi baza (engl. <i>base pairs – bp</i> )
RT PCR	- polimeraza lančane reakcije u stvarnom vremenu (engl. <i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i> )
MGB	- molekula koja se veže za 3' kraj novorastućeg lanca (engl. <i>minor grow binder</i> )
HW	- Hardy-Weinberg
MAF	- učestalost rjeđeg alela (engl. <i>minor allele frequency</i> )
LD	- neravnoteža vezanosti (engl. <i>linkage disequilibrium</i> )
OR	- omjer izgleda (engl. <i>odds ratio</i> )
URS	- regulatorna regija promotora (engl. <i>upstream repression sequence</i> )

# ŽIVOTOPIS

## **Opći podaci:**

Ime i prezime: Radenka Kuzmanić-Šamija

Ime oca i majke: Ante i Roza

Datum rođenja: 27.10.1962.

Mjesto rođenja: Vinež, Labin, Hrvatska

Državljanstvo: hrvatsko

Narodnost: Hrvatica

Bračno stanje: udata

Adresa i telefon: Trstenik 2a, Split, 021/388829

## **Školovanje:**

1977. završila osnovnu školu.

1981. završila srednju školu – Zdravstveni obrazovni centar - Split

1987. završila Medicinski fakultet u Zagrebu – Studij u Splitu

1987. – 1988. Poslijediplomski studij «Majka i dijete», Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2001. – 2003. Poslijediplomski studij «Biomedicina», Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci.

1997. - 2001. Specijalizacija iz pedijatrije.

2007. - 2009. Subspecijalizacija iz pedijatrijske neurologije.

## **Popis stručnih usavršavanja:**

Poslijediplomski tečaj individualnog usavršavanja «Intrakranijska ultrasonografija dojenčadi», Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 1999. god.

Poslijediplomski tečaj individualnog usavršavanja «Elektromioneurografije», KBC Rebro

## **Zaposlenje:**

Liječnički staž od 1987. do 1988 god KB Split.

Dom zdravlja Split od 1989. do 1993.

Pričuvni sastav Hrvatske vojske od 1992. do 1993.

Djelatni sastav Hrvatske vojske od ožujka 1993. do svibnja 1994.

Klinika za dječje bolesti, KBC Split od 1994. -

### **Nastavna djelatnost:**

2009. Asistent na Katedri za Pedijatriju Sveučilišta u Splitu, Medicinski fakultet.

Sudjelujem u izvođenju dodiplomske nastave (vježbe i seminari) - Studij za fizioterapeute

Poslijediplomski tečaj stalnog medicinskog usavršavanja: „Ultrazvuk u kliničkoj praksi:

Ultrasonografska dijagnostika središnjeg živčanog sustava“.

### **Članstvo u znanstvenim i stručnim društvima:**

Hrvatski liječnički zbor

Hrvatsko pedijatrijsko društvo

Hrvatskog društva za dječju neurologiju

Hrvatska Akademija za Razvojnu Rehabilitaciju

Udruga za borbu protiv epilepsije,

Hrvatsko društvo za humanu genetiku,

Hrvatski institut za istraživanje mozga

European Paediatric Neurologic Society

International Child Neurology Association (ICNA)

### **Popis radova publiciranih u časopisima indeksiranim u *Current Contents*:**

1. **Kuzmanić-Šamija R**, Primorac D, Rešić B, Lozić B, Krželj V, Tomasović M, Stoini E, Šamanović Lj, Benzon B, Pehlić M, Boraska V, Zemunik T. Association of NOS3 tag polymorphisms with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Croat Med J* 2011;52(3):396-402.
2. Lozić B, Primorac D, Glavinić R, **Šamija RK**, Zemunik T. Analysis of the C609T polymorphism of NQO1 gene in South Croatian patients with hematological malignancies. *Coll Antropol.* 2011 Jun;35(2):385-8.
3. **Kuzmanić-Šamija R**, Rešić B, Tomasović M, Gabrić-Pandurić D, Lozić B, Lozić M, Rešić J. West Syndrome with Periventricular Leukomalacia: Ten-year Clinical Study. *Collegium Antropologicum* 2007; 31( Suppl.3): 105-113.
4. Rešić B, Tomasović M, **Kuzmanić-Šamija R**, Lozić M, Rešić J, Solak M. Neurodevelopmental Outcome in Children with Periventricular Leukomalacia *Collegium Antropologicum* 2007; 31( Suppl.3): 143-149.
5. Tomasović M, Rešić B, Ivelja N, **Kuzmanić-Šamija R**, Rešić J, Gabrić-Pandurić D, Božić J, Markotić A. Glycosphingolipid Expression in Cerebrospinal Fluid of Infants



with Neurological Abnormalities: Report of Three Cases. Collegium Antropologicum 2007; 31( Suppl.3): 189-195.

**Radovi objavljeni u časopisima koji se indeksiraju u drugim međunarodnim indeksnim publikacijama:**

1. Rešić B, Saraga M, Čulić V, Tomasović M, **Kuzmanić-Šamija R**. The occurrence of nephrocalcinosis and urolithiasis during the treatment with adrenocorticotrophic hormones (ACTH ) in children with West's syndrome – a preliminary report. Neurolog Croat 1996; 45:67–75.
2. Rešić B, Tomasović M, **Kuzmanić-Šamija R**, Marušić E. Treatment with lamotrigin children with EEG epileptic abnormalities without clinical manifestation of epilepsy. Neurolog Croat 2004:30.
3. Tomasović M, Rešić B, Sršen S, Kalajžić J, Čulić V, **Kuzmanić-Šamija R**. Developmental cortical disorders: Magnetic resonance imaging and clinical correlations. Neurolog Croat 2003;52 (Suppl 4) :81
4. Rešić B, Tomasović M, Valić I, Meštrović M, **Kuzmanić Šamija R**, Olujčić I. Zlosudne epileptičke encefalopatije dječje dobi Paediatr Croat 46 (Supl 1): 173-181
5. Rešić B, Solak M, Kuzmanić Šamija R, Rešić J, Ursić A, Lozić M. Učinkovitost topiramata u liječenju djece sa Westovim sindromom. Paediatr Croat **2009**;53: 3
6. **Kuzmanić-Šamija R**, Lozić B, Rešić B, Tomasović M, Vlastelica Ž, Metličić V, Sedlačkova J. Early-onset facioscapulohumeral muscular dystrophy. Paediatr Croat, **2009**;53: 3